

109

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

"PAPEL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SEMEJANTE A  
INSULINA TIPO I (IGF-II) EN LA PRODUCCION DE  
TESTOSTERONA DURANTE EL DESARROLLO FOLICULAR  
TEMPRANO DEL RATON B6.Y"<sup>TM</sup>

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G A**  
P R E S E N T A :  
**LAURA ANGELICA JIMENEZ MONTES**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA IRMA VILLALPANDO FIERRO



MEXICO, D. F.

2002

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:  
"Papel del factor de crecimiento semejante a insulina tipo I (IGF-I) en la producción  
de testosterona durante el desarrollo folicular temprano del ratón B6.Y<sup>TIR</sup>"

realizado por **Laura Angélica Jiménez Montes**

con número de cuenta **8807990-1**, quien cubrió los créditos de la carrera de: **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

**Dra. María Irma Villalpando Fierro**

Propietario

**Dra. María del Carmen Uribe Aranzábal**

Propietario

**M. en C. José Alejandro Marmolejo Valencia**

Suplente

**Biól. José Aquiles Bernal Moreno**

Suplente

**Dra. Maricela Villagrán SantaCruz**

*J. Fierro*

*M. del Carmen Uribe*

*J. A. Marmolejo*

*J. A. Bernal*

*M. Villagrán*

FACULTAD DE CIENCIAS  
U N A M.

Consejo Departamental de

*Juan Manuel Rodríguez Chávez*

**M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez**



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

*A mi mami*

A la memoria de mis tías  
Aurorita, Lica, Mary y Merceditas.

## AGRADECIMIENTOS

Aunque oficialmente la autora de esta tesis sea yo, este trabajo también representa el esfuerzo de muchas personas que contribuyeron directa o indirectamente a su elaboración, por lo que quiero agradecer a quienes con su ayuda lo hicieron posible:

A Dios y a mi infalible ángel de la guarda. MUCHAS, MUCHAS GRACIAS.

Mami: Agradezco inmensamente que nunca hayas declinado el apoyo y confianza que me diste cuando decidí ser bióloga. Esto jamás habría sido posible sin ti.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme dado la oportunidad a una educación profesional de manera gratuita, especialmente a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Investigaciones Biomédicas.

A mis profesores, compañeros y amigos de la Facultad de Ciencias, por ser parte esencial en mi formación profesional y personal.

A la Dra. María Irma Villalpando Fierro, directora de esta tesis, por el apoyo y paciencia brindadas para la realización de este trabajo.

A DGAPA, que me proporcionó una beca para la realización de esta tesis como parte del proyecto "Regulación de la esteroidogénesis en el ovario del ratón B6.Y1N" (IN-215296).

Al Dr. Pedroza y al técnico Omar Medina del Laboratorio 209 de la Facultad de Química, que amablemente me permitieron el uso de su contador de centelleo gamma.

Sra. Gloria: El excelente desempeño en su trabajo no sólo fue una pieza fundamental en esta tesis, sino que me dio algo mucho más valioso, una gran enseñanza: el amor a la chamba.

HOVIMO: Le entraste sin quejarte al sexado, al cultivo, a la estadística, asesoría, tiempo... Pero lo que más te agradezco es el haberme permitido conocerte y considerarte un gran amigo.

Dorys y Lolita: Ambas me ayudaron un chorro y en especial, me brindaron su amistad.

A mis compañeros de laboratorio Amanda, Gabriel, Yetzi, Carlos, Miguel y Vicy, por sus valiosas ideas, sugerencias y por haberme permitido compartir momentos tan padres con ustedes.

Alejandro: Por la generosidad de compartir tus conocimientos y experiencia conmigo, por el tiempo que dedicaste a la revisión de este trabajo y por tus muy acertados y valiosos comentarios.

Al personal del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, porque siempre tuvieron una gran disposición para auxiliarme y enseñarme el manejo de mis ratoncitos.

A la Dra. María del Carmen Uribe Aranzábal, a la Dra. Maricela Villagrán Santacruz y al Biol. José Aquiles Fernal Moreno, quienes amablemente revisaron y evaluaron este trabajo.

Renita: El SPSS que me pasaste me fue de gran utilidad, al igual que las ideas, sugerencias y explicaciones que me diste del paquete.

A la Mat. Margarita Elvira Chávez Cano, por las asesorías impartidas en el diseño de experimentos.

Almís y Carlin: Por ser los hermanos más chidos que Dios me pudo haber dado. Los amo.

Guille: Por compartir tu vida conmigo y por todo lo que esto implica.

Cuñis: Por la disposición y tiempo que dedicaste a la toma de mis dispositivas.

Finalmente quiero agradecer a todos aquellos que de alguna u otra manera influyeron a lo largo de este periodo de mi vida y que, sin menospreciar su importancia, omito su nombre.

-Adiós -le dijo.

-Adiós -le contestó el zorro-. Este es mi secreto, muy sencillo: sólo se ve bien con el corazón, lo esencial es invisible a los ojos.

-Lo esencial es invisible a los ojos -repitió el principito para recordarlo.

-El tiempo que perdiste con tu rosa es lo que la hace tan importante.

-El tiempo que perdí con mi rosa -repitió el principito a fin de recordarlo.

-Los hombres han olvidado esta verdad -dijo el zorro- Pero tú no debes olvidarla. Te haces responsable para siempre de lo que has domesticado. Eres responsable de tu rosa...

-Soy responsable de mi rosa... -repitió el principito a fin de recordarlo.

Antoine de Saint-Exupéry  
Fragmento de "El principito"



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Embriología Molecular del Departamento de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. María Irma Villalpando Fierro.

## ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
Ab	Anticuerpo
AD	Androstendiona
Ag	Antígeno no marcado
Ag*	Antígeno marcado
AMH	Hormona anti-Mülleriana
b	Ordenada al origen
%B/B0	Porcentaje de unión del antígeno marcado
B0	Unión máxima
B <sub>n</sub>	Muestras
cpm	Cuentas por minuto
dATP	Desoxiadenosin-trifosfato
DAX1	Gen <i>DAX1</i>
dCTP	Desoxicitosin-trifosfato
DEPC	Di-etilpírocarbonato
dGTP	Desoxiguanidin-trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxirribonucleótidos-trifosfatos
dpp	Días <i>postpartum</i>
dTTP	Desoxitimidin-trifosfato
E <sub>1</sub>	Estrona
E <sub>2</sub>	17β-Estradiol
FSH	Hormona estimulante del folículo
GH	Hormona de crecimiento
HMG	Grupo de alta movilidad electrónica
<sup>125</sup> I	Isótopo Yodo <sup>125</sup>
IGFBP	Proteínas acarreadoras de los IGF's
IGF-I	Factor de crecimiento semejante a insulina tipo uno
IGF-II	Factor de crecimiento semejante a insulina tipo dos
IGFr	Receptor de los IGF's
kb	Kilobases

kDa	Kilodaltones
LH	Hormona luteinizante
LSD	Prueba estadística de comparación múltiple por pares de la mínima deferencia significativa
m	Pendiente
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NSB	Unión no específica
OH	sustituyentes hidroxilo
P <sub>4</sub>	Progesterona
P450 <sub>17α</sub>	Enzima citocromo P450 17α hidroxilasa
P450 <sub>AROM</sub>	Enzima citocromo P450 aromataasa
P450 <sub>SCC</sub>	Enzima citocromo P450 20,22 desmolasa
P <sub>5</sub>	Pregnenolona
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGC	Células germinales primordiales
RIA	Radioinmunoanálisis
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SF1	Gen <i>SF1</i>
SRY	Gen <i>SRY</i>
T	Testosterona
T <sup>125</sup> I	Testosterona marcado con el isótopo yodo <sup>125</sup>
TC	Cuentas totales
Tdf	Factor determinante del desarrollo testicular
TGF-β	Factor de crecimiento como factor de crecimiento transformante β
U	Unidades
UI	Unidades internacionales
Wnt4	Gen <i>Wnt4</i>
WT1	Gen <i>WT1</i>

## CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. <i>Desarrollo y diferenciación de la gónada en el ratón</i>	2
1.1. <i>Formación de la cresta genital</i>	2
(a) <i>Morfogénesis</i>	2
(b) <i>Genes involucrados en la formación de la cresta genital</i>	3
1.2. <i>Establecimiento de la gónada indiferenciada</i>	3
1.3. <i>Diferenciación testicular</i>	4
(a) <i>Histogénesis</i>	4
(b) <i>Genes involucrados en la formación del testículo</i>	4
1.4. <i>Diferenciación ovárica</i>	6
(a) <i>Organogénesis</i>	6
(b) <i>Genes involucrados en la formación del ovario</i>	7
2. <i>Ovario postnatal</i>	8
2.1. <i>Histología</i>	8
2.2. <i>Foliculogénesis</i>	9
2.3. <i>Esteroides ováricos</i>	9
(a) <i>Precursor</i>	10
(b) <i>Biosíntesis y clasificación</i>	10
2.4. <i>Control de la función ovárica</i>	12
2.5. <i>Ovario murino prepúber</i>	14
3. <i>Ratón B6.Y<sup>TIR</sup></i>	15
3.1. <i>Origen</i>	15
3.2. <i>Desarrollo y características de la hembra XY<sup>TIR</sup></i>	18
4. <i>IGF-I</i>	20
4.1. <i>Generalidades</i>	20
4.2. <i>Papel del IGF-I en la esteroidogénesis</i>	21
4.3. <i>Expresión del IGF-I en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup></i>	23

<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>24</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>24</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>
1. <i>Reactivos</i>	26
2. <i>Animales</i>	26
3. <i>Identificación del sexo cromosómico</i>	26
3.1. <i>Fundamento de la técnica de PCR</i>	26
3.2. <i>Procedimiento</i>	27
(a) <i>Aislamiento del DNA</i>	27
(b) <i>Amplificación del Sry</i>	27
(c) <i>Visualización del producto amplificado</i>	27
4. <i>Cuantificación de T</i>	28
4.1. <i>Cultivo organotípico por rotación</i>	28
(a) <i>Medios de cultivo</i>	28
(b) <i>Procedimiento</i>	29
4.2. <i>RIA</i>	29
(a) <i>Fundamento de la técnica de RIA</i>	29
(b) <i>Procedimiento</i>	30
5. <i>Análisis estadístico de los datos</i>	31
<b>RESULTADOS</b>	<b>32</b>
1. <i>Identificación de las hembras XY<sup>TIR</sup></i>	32
2. <i>Producción de T</i>	32
2.1. <i>Efecto del IGF-I</i>	34
2.2. <i>Efecto de la FSH</i>	35
2.3. <i>Efecto del IGF-I/FSH</i>	36
2.4. <i>Efecto entre tratamientos</i>	36

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>38</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>42</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>43</b>
<b>APÉNDICE</b>	<b>53</b>

## RESUMEN

La biosíntesis de esteroides en el ovario adulto es un proceso complejo que involucra la proliferación y la diferenciación de las células foliculares, la cual es regulada por gonadotropinas y otras moléculas de origen gonadal, como los factores de crecimiento. Sin embargo, se desconocen los mecanismos que controlan la producción de hormonas sexuales en el ovario de los roedores, cuando aún no se ha establecido el eje hipotálamo-hipófisis gónada. En la presente investigación se analizó el efecto del factor de crecimiento semejante a insulina tipo I (IGF-I) y la hormona folículo estimulante (FSH) en la producción de testosterona (T) durante el desarrollo postnatal del ovario durante el periodo juvenil temprano al prepúber del ratón B6.Y<sup>TIR</sup>. En esta cepa, el 50% de los individuos XY presentan alteraciones durante el proceso de diferenciación testicular provocando incluso una reversión sexual completa. Estudios previos proponen que las hembras XY mantienen funcional el eje hipotálamo-hipófisis-gónada y que la anomalía endocrina es a nivel de la gónada.

Para los fines de este trabajo se emplearon ratones hembras de 10 a 18 días *postpartum* (dpp) de la primera generación, obtenidas de la cruce de machos B6.Y<sup>TIR</sup> con hembras pertenecientes a la cepa C57BL/6J (*Mus musculus musculus*). El sexo genético de las hembras XY se determinó por amplificación del gen *Sry* a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. Los ovarios se aislaron, se seccionaron a la mitad y se sometieron a tres condiciones experimentales por 24 horas en medio de cultivo suplementado con IGF-I (10 ng/ml), FSH (100 UI/ml) e IGF-I/FSH a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. La producción hormonal fue cuantificada por radioinmunoanálisis. Los datos se analizaron estadísticamente con la prueba F del análisis de varianza. Después se realizó una prueba de comparaciones múltiples por el método de la mínima diferencia significativa con un nivel de significancia del 5%. Se observó que el IGF-I inhibe la producción de T en los ovarios XX a los 12 dpp, mientras que la FSH aumentó la producción de este andrógeno, especialmente a los 14 dpp. Se detectó sinergismo del IGF-I/FSH en los ovarios XX de los 10 a los 16 dpp, pero a los 18 dpp no se observó efecto. En los ovarios XY los niveles de T fueron en general menores y no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. Únicamente se encontró un efecto positivo de la FSH a los 18 dpp y no se observó sinergismo entre el IGF-I y la FSH. Se propone que el IGF-I tiene un efecto dual ya que inhibe la biosíntesis de T y, en presencia de FSH, estimula en fases tempranas del desarrollo ovárico en el ratón.

## INTRODUCCIÓN

### 1. *Desarrollo y diferenciación de la gónada en el ratón*

El desarrollo sexual en los mamíferos involucra tres etapas sucesivas: la primera se inicia con el establecimiento del sexo cromosómico cuando el espermatozoide, que puede aportar un cromosoma X o Y, fertiliza al ovocito, el cual posee un cromosoma X. En la segunda fase, se produce el sexo gonadal donde el par de primordios gonadales del embrión se transformarán en ovarios si el producto es XX o en testículos si es XY. En la última etapa ocurre la diferenciación sexual fenotípica en la que las estructuras primordiales del tracto genital interno (conductos de Wolff y de Müller) y externo (o seno urogenital compuesto por engrosamientos labioescrotales, tubérculo y pliegues genitales), presentes en ambos sexos, se diferencian (Kofman-Alfaro y col., 1982).

El fenotipo masculino deriva de dos hormonas secretadas por los testículos recién formados, la testosterona (T) y la hormona anti-Mülleriana (AMH). La primera promueve la diferenciación de los conductos de Wolff en el epidídimo, los vasos deferentes y las vesículas seminales, mientras que su biotransformación a 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona induce la formación del pene y el escroto. La segunda produce la regresión de los conductos de Müller (Kofman-Alfaro y col., 1982; Gilbert, 1998). En la hembra, por el contrario, la ausencia de T y de AMH provoca la involución de los conductos de Wolf y favorece el desarrollo de los oviductos, útero y cervix a partir de los conductos de Müller, así como la formación del clítoris, labios mayores y menores (Kofman-Alfaro y col., 1982; Gilbert, 1998).

#### 1.1. *Formación de la cresta genital*

##### (a) *Morfogénesis*

El primordio gonadal se forma a partir de dos tipos celulares: las células germinales primordiales (CGP's) de origen extraembrionario y por células somáticas (mesenquimáticas y mesoteliales) de origen mesodérmico (Merchant-Larios, 1991).

El primer evento durante el desarrollo gonadal es la migración de las CGP's desde la base del alantoides posterior y del epitelio dorsal del saco vitelino hasta la región urogenital donde se formarán las gónadas. Entre los 7.5 y 9.0 días *postcoitum* (dpc), las CGP's inician su migración al incorporarse al intestino en formación (transporte pasivo) y entre los 9.5 y



12.5 dpc, éstas desarrollan pseudópodos y otras estructuras características de células con movimiento ameboideo para transportarse por sí mismas (transporte activo) (Buehr, 1997).

La siguiente fase en la formación de la cresta genital principia cuando, una vez en su destino final, las CGP's empiezan a ser rodeadas por células mesenquimáticas y mesoteliales las cuales, al comenzar una gran actividad proliferativa, forman el primordio gonadal. Éste aparece a los 9.0 dpc como un engrosamiento en la parte ventral del mesonefros (Merchant-Larios, 1991) (Fig. 1).

#### **(b) Genes involucrados en la formación de la cresta genital**

- ♦ *SF1* (*Sf1* en ratón). Este gen, que codifica para un receptor nuclear huérfano, fue inicialmente identificado como el responsable de la expresión tisular de genes involucrados en la biosíntesis de hormonas esteroides. Específicamente regula la expresión de genes que codifican para las hidroxilasas de esteroides (citocromo P450) mediante el reconocimiento de los sitios promotores de dichos genes (Parker y Schimmer, 1997).
- ♦ *WT1* (*Wt1* en ratón). Mutaciones en este gen producen un fenotipo femenino o ambigüedad en los genitales externos en pacientes XY con síndrome de Denys-Drash (Pelletier y col., 1991).

Se ha propuesto que los productos del *SF1* y *WT1*, los cuales funcionan como factores de transcripción, actúan como promotores del desarrollo y mantenimiento temprano del tejido gonadal debido a que su expresión se ha registrado a partir de los 9.0 dpc en la gónada de ratón en ambos sexos (Armstrong y col., 1993; Ikeda y col., 1994) (Fig. 1). Además, en ratones con anulación génica dirigida al *Sf1* y *Wt1* induce agenesia gonadal embrionaria por apoptosis (Kreidberg y col., 1993; Luo y col., 1994).

#### **1.2. Establecimiento de la gónada indiferenciada**

La gónada indiferenciada se identifica entre los 9.5 a los 11.5 dpc y se constituye a partir de la formación gradual de los cordones sexuales, producto del depósito de una lámina basal alrededor de agregados epiteliales, así como por la conformación del tejido estromático (Merchant y Taketo, 1991). Al interior de los cordones sexuales quedan inmersas las CGP's, mientras que en el estroma se distinguen los primeros vasos sanguíneos, las células

precursoras del tejido conectivo y las células intersticiales esteroideogénicas, todos ellos elementos histológicos precursores del testículo si la gónada es XY o del ovario si es XX (Merchant-Larios, 1991) (Fig. 1).

### 1.3. Diferenciación testicular

#### (a) Histogénesis

En el ratón, los primeros cambios morfogenéticos de la diferenciación sexual gonadal se detectan a partir de los 12.0 dpc en la gónada XY. Éstos comienzan con la separación de los cordones gonadales del epitelio celómico del testículo en formación como consecuencia de la invasión gradual de las células mesenquimáticas y endoteliales de la región mesonéfrica. Una vez en la médula de la gónada masculina, estos cordones reciben el nombre de cordones seminíferos. Dichas estructuras quedan conformadas por células somáticas epiteliales o preSertoli y por proespermatogonias (antes CGP's), separadas del estroma por láminas basales. Posteriormente, el tejido estromático se diferenciará en los vasos sanguíneos, las células mioides, fibroblastos y las células de Leydig. (Merchant-Larios, 1991; Merchant y Taketo, 1991) (Fig. 1).

#### (b) Genes involucrados en la formación del testículo

- ♦ **SRY** (*Sry* en el ratón). En los mamíferos, el sexo es determinado por el cromosoma Y ya que en éste se localiza el factor determinante del testículo (*Tdf*). Como su nombre lo indica, este factor induce que la gónada indiferenciada se desarrolle como testículo si el embrión es XY (Eicher y Washburn, 1986). En 1990, el *Tdf* fue identificado y nombrado *Sry*. Este gen fue ubicado en la zona pseudoautosomal del brazo corto 'p' del cromosoma Y, con un tamaño aproximado de 35 kilobases (kb) (Gubbay y col., 1990; Sinclair y col., 1990). El *Sry* codifica una proteína que actúa como factor de transcripción y que se caracteriza por tener un dominio de unión al ácido desoxirribonucleico (DNA) conocido como caja HMG, el cual le confiere la capacidad de alterar la estructura del DNA. Esto sugiere una función regulatoria del *Sry*, ya sea promoviendo y/o reprimiendo la expresión de otros genes (Pontiggia y col., 1994). El *Sry* se expresa específicamente en las células de la gónada de ratón entre los 10.5 y los 12.5 dpc (Koopman y col., 1991), lapso que comprende el periodo de diferenciación testicular de las cepas de ratón estudiadas (Fig. 1). Principalmente son dos las evidencias que confirman la identidad de este gen como el *Tdf*: La primera proviene del

análisis de genomas de mujeres XY quienes desarrollaron mutaciones de *novus* en la secuencia del *SRY* (Jäger y col., 1990). La segunda se obtuvo en 1991 cuando Koopman y colaboradores lograron el desarrollo de ratones XX con fenotipo masculino, mediante la inserción de un fragmento de 14 kb del *Sry* en el genoma de estos animales.

Estudios clínicos en pacientes con anomalías en la diferenciación sexual gonadal así como experimentos genéticos realizados en ratón, han permitido la identificación de genes autosómicos los cuales codifican para factores de transcripción, necesarios para el adecuado desarrollo testicular:

- ♦ *SF1*. Al hacer la detección de los transcritos del *Sf1* en la gónada embrionaria de ratón, se identificó un patrón dimórfico de expresión entre machos y hembras: durante el estadio indiferenciado (de los 9 a los 12 dpc) todos los embriones lo expresan. No obstante, al formarse los cordones gonadales (aproximadamente a los 12.5 dpc), el transcrito empieza a declinar únicamente en el ovario hasta que desaparece por completo a los 13.5 dpc (Ikeda y col., 1994). Este patrón coincide espacio-temporalmente con la expresión de la *AMH* en las células de Sertoli (Fig. 1). Además, se ha demostrado que el *Sf1* regula la síntesis de esta hormona al unirse a su promotor (Shen y col., 1994).
- ♦ *SOX9* (*Sox9* para ratón). Se ha asociado al *SOX9* con procesos de determinación sexual debido a que la mayoría de pacientes XY con displasia campomética, patología producida por mutaciones puntuales en este gen, presentan reversión sexual parcial o completa (Hovmöller y col., 1997). Independientemente del sexo, su expresión se detecta en la gónada indiferenciada de ratón alrededor de los 10.5 dpc pero a los 11.5 dpc se incrementa en los testículos y desaparece en los ovarios. Debido a este patrón, se ha relacionado directamente a este gen con el *Sry*. (Morais da Silva y col., 1996) (Fig. 1).
- ♦ *Dmrt1*. Se le ha identificado como un gen homólogo al *dsx* y *mab-3*, involucrados en la determinación sexual de *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* respectivamente, debido a que estos tres genes codifican una proteína con un motivo de unión al DNA denominado dominio DM (Raymond y col., 1998). El *Dmrt1* ha sido

implicado en la reversión sexual parcial o total sufrida en personas XY con monosomía de este locus (Veitia y col., 1997). En un principio, este gen se expresa de manera similar en las gónadas murinas de embriones XX y XY. Sin embargo, cuando aparecen los primeros signos morfológicos de dimorfismo sexual (12.5 dpc), su expresión se ve favorecida en los cordones gonadales del macho en desarrollo mientras que en las hembras muestra un patrón puntual. Finalmente, alrededor de los 15.0 dpc el *Dmrt1* declina en el ovario pero en el testículo permanece incluso durante la vida adulta (Fig. 1). Por tal motivo, y a pesar de que pudiera tener cierta importancia en el desarrollo gonadal de ambos sexos, se ha sugerido que este gen restringe su función al testículo en desarrollo (Raymond y col., 1999).

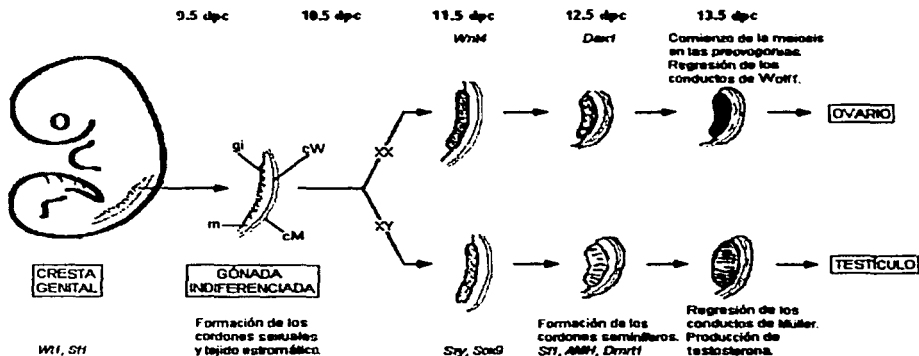


Figura 1. Desarrollo y diferenciación de la gónada en el ratón. En la parte superior se muestra la edad aproximada de gestación en que se suscitan los principales eventos morfológicos durante la formación del ovario y del testículo murino. gi: gónada indiferenciada; cw: conducto de Wolff; cm: conductos de Müller; m: mesonefros. (Modificado de Nordqvist K. 1995. Sex differentiation – gonadogenesis and novel genes. Int J Dev Biol 39: 727-736).

#### 1.4. Diferenciación ovárica

##### (a) Organogénesis

Durante la diferenciación testicular, el ovario prácticamente no muestra cambios con respecto a la estructura de la gónada indiferenciada (Fig. 1), excepto por una cierta proliferación de las células epiteliales y de las CGP's. Debido a que no hay una invasión de

células mesenquimáticas, los cordones gonadales permanecen asociados al epitelio superficial celómico del ovario en formación (Merchant-Larios, 1991; Merchant y Taketo, 1991). El proceso de foliculogénesis inicia cuando el tejido estromal y epitelial han sido separados por una lámina basal (Merchant-Larios y Chimal-Monroy, 1989).

En 1989, Merchant y Chimal hicieron un estudio morfológico donde clasificaron a los ovocitos en tres estadios para describir la ontogenia de los folículos primordiales. La fase de ovocito (I) se reconoce a los 15 dpc por la presencia de grupos de ovocitos estrechamente unidos dentro de los cordones sexuales. La etapa epitelial (II) inicia después del comienzo de la meiosis (alrededor de los 16 dpc) y se caracteriza por la formación de una delgada capa de células epiteliales que rodean cada ovocito. Finalmente, cuando la meiosis se detiene en el diploteno de la primera división (aproximadamente a los 17.5 dpc), los ovocitos entran a la fase estromal (III) en la cual los cordones gonadales se fragmentan. Como resultado, aparecen los primeros folículos cada uno conformado por un ovocito rodeado por una capa de células epiteliales y una membrana basal, separados de otros folículos por tejido intersticial.

#### **(b) Genes involucrados en la formación del ovario**

Al igual que en el testículo, estudios clínicos y genéticos han permitido la identificación de otros genes que codifican factores de transcripción, necesarios para el adecuado desarrollo ovárico:

- ◆ *DAX1* (referido en ratón como *Dax1*). Localizado en la región conocida como sensible a dosis génica del cromosoma X, este gen provoca reversión sexual fenotípica hacia hembra o desarrollo sexual ambiguo si se encuentra por duplicado en individuos XY con hipoplasia adrenal congénita (Bardoni y col., 1994). También se ha observado una expresión diferencial durante el periodo crítico de diferenciación gonadal en el ratón: aunque en ambos sexos se detecta a los 11.5 dpc, a los 12.5 dpc desaparece solamente en el testículo (Swain y col., 1996) (Fig. 1). Por lo tanto, se ha propuesto que *DAX1/Dax1* compite con el *SRY/Sry* y que tiene un papel importante en el desarrollo ovárico ya que pudiera inducir su formación (Bardoni y col., 1994; Swain y col., 1996).
- ◆ *Wnt-4*. Éste es un gen autosómico que tiene un papel crítico en la diferenciación ovárica: a pesar de que se expresa en la gónada indiferenciada de ratón en ambos

sexos desde los 9.5 dpc, se hace indetectable a partir de los 11.5 dpc únicamente en aquellos embriones XY (Fig. 1). Además, al provocar una mutación nula sobre este locus se induce la masculinización de los genitales internos de ratones XX (Vainio y col., 1999).

## **2. Ovario postnatal**

### **2.1. Histología**

El ovario, el cual está rodeado por un epitelio superficial, se conforma de una zona medular y una cortical donde se distinguen los siguientes componentes histológicos:

- ◆ El estroma. Éste está constituido por tejido conectivo y ocupa el espacio entre los folículos, el cuerpo lúteo, las células de la glándula intersticial, vasos sanguíneos y linfáticos y nervios que conforman al ovario (Duke, 1978).
- ◆ El folículo. Durante la ontogenia de los folículos, unidad funcional del ovario, se forman varias capas de células que rodean al ovocito. La primera está compuesta por las células de la granulosa, la cual queda envuelta por una membrana basal. Entre el ovocito y la granulosa se encuentra la zona pelúcida. Por fuera de la membrana basal se distingue la vascularizada teca interna (Fig. 4) y la última capa está integrada por tejido conectivo, denominado teca externa (Anderson y col., 1978; Domínguez y col., 1991)
- ◆ Cuerpo lúteo. Después de la ovulación, las células de la granulosa y de la teca que conformaban el folículo preovulatorio, se transforman en células luteínicas que componen al cuerpo lúteo (Domínguez y col., 1991).
- ◆ Células de la glándula intersticial. La glándula intersticial es un componente esteroideogénico que se forma a partir de los folículos atrésicos característicos de etapas tempranas del desarrollo ovárico (Merchant-Larios, 1979; Merchant-Larios y col., 1982).

## **2.2. Folliculogénesis**

La folliculogénesis es un fenómeno continuo, en el cual se distinguen cuatro etapas sucesivas que culminan en la ovulación (Makabe y col., 1991):

- ◆ **Folículos primordiales:** El ovocito, el cual aún se encuentra en arresto meiótico, está rodeado por una sola capa de células epiteliales aplanadas y una lámina basal (fase estromal) (Merchant-Larios y Chimal-Monroy, 1989). Posteriormente estas células se diferencian en células de la granulosa.
- ◆ **Folículos primarios o preantrales:** Las células foliculares se hacen cuboidales o ligeramente columnares y se dividen mitóticamente hasta formar una capa multiestratificada de células de la granulosa (Anderson y col., 1978). La teca comienza a formarse.
- ◆ **Folículos antrales:** Cuando aparecen entre las células de la granulosa áreas llenas de fluido que confluyen unas con otras, se forma el antro folicular. Esta cavidad se desarrolla a partir de secreciones de las células foliculares y se compone principalmente de proteínas, polipéptidos y hormonas (Anderson, 1978; Domínguez y col., 1991).
- ◆ **Folículos de Graaf o preovulatorios:** Esta etapa se presenta por primera vez poco antes de la madurez sexual, cuando el crecimiento folicular se hace dependiente de gonadotropinas. Los folículos presentan todas las capas de células foliculares que característicamente disminuyen su actividad mitótica. Además, el ovocito reinicia la meiosis (Makabe y col., 1991).

## **2.3. Esteroides ováricos**

Además de ser fundamentales en la diferenciación sexual en etapas embrionarias, los esteroides sexuales también juegan un papel muy importante en la vida postnatal de ambos sexos. Intervienen en diversos aspectos del crecimiento, desarrollo y diferenciación morfológica, así como el desarrollo y regulación del comportamiento y ciclos reproductores (Eckert y col., 1990).

### (a) Precursor

La molécula precursora de los esteroides es el colesterol. Éste se caracteriza por presentar un núcleo ciclopentanoperihidrofenantreno constituido de tres anillos de ciclohexano (Fig. 2, letras A, B y C) y uno de ciclopentano (Fig. 2, letra D) (Gorbman y Bern, 1962). Este lípido se sintetiza principalmente a partir del acetato en la forma de acetilcoenzima A (síntesis de *novo*), de lipoproteínas y de ésteres de colesterol intracelulares. El colesterol entra a las células esteroideogénicas acoplado a lipoproteínas de baja densidad en el caso del hombre y otros vertebrados y de alta densidad específicamente en los roedores. Estas lipoproteínas interactúan con receptores de membrana. Una vez internalizados estos complejos, el colesterol se libera rápidamente para ser utilizado o se almacena en forma de ésteres en el citoplasma de las células de la teca (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

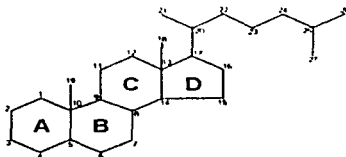


Figura 2. Estructura química del colesterol, precursor de los esteroides sexuales (Tomado de Gore-Langton RE, Armstrong DT, 1988. Follicular steroidogenesis and its control. En *Physiology of reproduction*, Cap 11. Knobil E, Neil JD, Edwing LL, Greenwald GS, Markert CL and Pfaff DW (eds). Raven Press Co, New York, 571-615).

### (b) Biosíntesis y clasificación

La síntesis de las hormonas esteroides (Fig. 3) requiere la eliminación de átomos de carbono de su precursor, lo cual ocurre mediante una serie de reacciones de hidroxilación que son catalizadas a través de tres enzimas: la 20,22 desmolasa (P450<sub>SCC</sub>), la 17 $\alpha$  hidroxilasa (P450<sub>17 $\alpha$</sub> ) y la P450 aromatasa (P450<sub>AROM</sub>) (Nelson y col., 1993). De esta forma, los pregnanos, de 21 átomos de carbono, se forman cuando se escinde la cadena lateral localizada entre el C-20 y el C-22; mientras que la ruptura de aquella ubicada entre el C-17 y el C-20, origina a los esteroides C<sub>19</sub> o androstanos. Finalmente, con la separación del grupo metilo unido al C-10 se sintetizan los estranos, cuya estructura química está conformada por 18 átomos de carbono (Gore-Langton y Armstrong, 1988). Además de estas modificaciones estructurales, la esteroideogénesis implica la introducción de dobles enlaces entre átomos de carbono de los anillos de ciclohexano o en la cadena lateral, de sustituyentes hidroxilo (OH)



y de grupos carbonilo derivados de la oxidación de los grupos OH (Fig. 3) (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

En cuanto a sus efectos biológicos, existen tres tipos de esteroides (Gore-Langton y Armstrong, 1988):

- ◆ **Progesterinas (C-21).** La progesterona ( $P_4$ ) es la progestina ovárica más abundante y es sintetizada principalmente por el cuerpo lúteo y por las células de la granulosa de folículos preovulatorios. Su función principal es preparar al útero para la posible implantación del blastocisto y para sostener la preñez. Sin embargo, la pregnenolona ( $P_5$ ) es el metabolito con mayor importancia ya que actúa como intermediario de todas las hormonas esteroides.

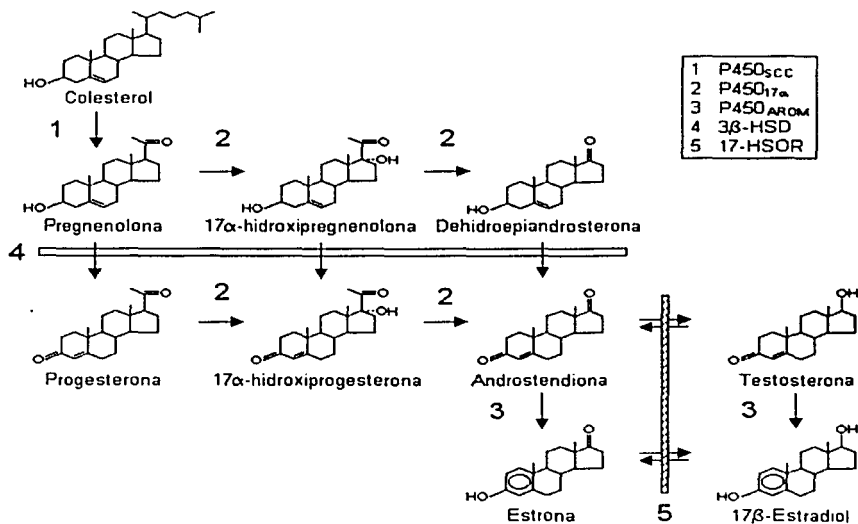


Figura 3. Ruta metabólica en la biosíntesis de hormonas esteroides a partir del colesterol, en la cual se observan las principales enzimas involucradas en este proceso: 1. Enzima 20,22 desmolasa (P450<sub>SCC</sub>), 2. Enzima 17α hidroxilasa (P450<sub>17α</sub>), 3. P450 aromatasa (P450<sub>AROM</sub>), 4. Enzima hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD) y 5. 17β-hidroxiesteroide (17-HSOR) (Modificado de Hinshelwood y col., 1993. Molecular Biology of genes encoding steroidogenic enzymes in the ovary. In The ovary, Cap. 9. Adashi EY and Leung CK (ed). Raven Press Inc. New York. Pag 165-183).

- ◆ **Andrógenos (C-19).** La T y la androstendiona (AD) son producidas principalmente por los testículos y son las responsables de la masculinización de los embriones XY, así como del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios en los machos. No obstante, en las hembras tienen un papel clave en la esteroidogénesis ovárica ya que actúan como precursores biosintéticos inmediatos de los esteroides estrogénicos. Las células de la teca es el sitio de producción folicular de andrógenos.
- ◆ **Estrógenos (C-18).** Estos esteroides foliculares son de gran relevancia ya que estimulan el crecimiento y maduración postnatal de los órganos sexuales femeninos, son responsables del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y regulan el ciclo estral. La AD y la T son convertidas a estrona ( $E_1$ ) y  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) respectivamente en las células de la granulosa a través de la aromatización de los andrógenos producidos en las células de la teca.

#### **2.4. Control de la función ovárica**

Cuando se alcanza la madurez sexual, el control de la función ovárica se lleva a cabo a través del denominado eje hipotálamo-hipófisis-gónada. La hipófisis se ubica en el hueso esfenoides en la silla turca y está dividida en adenohipófisis o lóbulo anterior y neurohipófisis o lóbulo posterior. En la adenohipófisis se producen diferentes tipos de hormonas, entre las que se encuentran la hormona de crecimiento (GH), prolactina, la estimulante de la tiroides, la adrenocorticotrópica, la estimulante de los melanocitos, la estimulante del folículo (FSH) y la luteinizante (LH). La actividad endocrina de la hipófisis anterior es regulada a través de hormonas secretadas por neuronas hipotalámicas, las cuales son nombradas como factores de liberación e inhibitoras de la liberación de acuerdo a la acción específica que ejerzan. Dichas hormonas viajan a través de los vasos sanguíneos del sistema porta-hipofisiario hasta el intersticio de la adenohipófisis, donde controlan su actividad secretoria (Eckert y col., 1990).

De manera particular, la FSH y LH reciben el nombre de gonadotropinas debido a que ejercen acciones modulatorias directamente sobre los ovarios y los testículos. (Eckert y col., 1990). Estructuralmente, estas proteínas están compuestas por dos cadenas de polipéptidos glucosilados ( $\alpha$  y  $\beta$ ). Mientras que la secuencia de la subunidad  $\alpha$  de la FSH y LH es común,

la composición de la cadena  $\beta$  es única para cada hormona (Stewart y Stewart, 1977; Pierce y Parson, 1981).

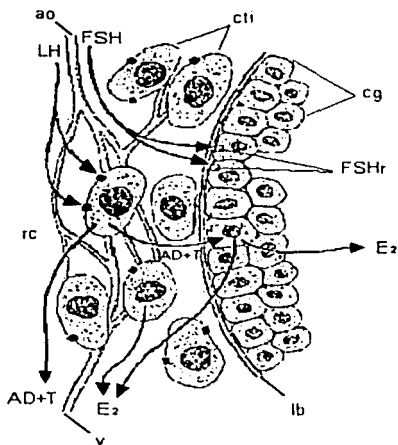


Figura 4. Acción de las gonadotropinas (FSH y LH) en la esteroidogénesis ovárica.

cti: Células de la teca interna; cg: células de la granulosa; lb: lámina basal; ao: arteria ovárica; rc: red capilar; v: vena; FSH: hormona folículo estimulante; FSHr: receptores a FSH; LH: hormona luteinizante; E<sub>2</sub>: 17 $\beta$ -estradiol; T: testosterona; AD: androstendiona. (Tomado de: Baird T. 1982. The ovary. En *Reproduction in mammals. Hormonal control of reproduction*. Book 3. Austin CR y Short RV (ed). Segunda edición, Cambridge University Press. US).

Con el establecimiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónada durante la pubertad, la proliferación y diferenciación de los constituyentes foliculares es inducida por las gonadotropinas (especialmente por FSH) (Hisaw, 1947). Las células de la granulosa de folículos preantrales sólo tienen receptores a FSH mientras que las células de la teca poseen exclusivamente receptores a LH. No obstante, la FSH induce la formación no sólo de sus propios receptores, si no también a LH y cuando los folículos desarrollan una cavidad antral, las células de la granulosa poseen ambos receptores (Richards, 1980; Richards, 1987).

El primer paso en la síntesis de hormonas estrogénicas se produce cuando las células de la teca (y quizá también las células intersticiales) son estimuladas por la LH para producir andrógenos (AD y T) (Erickson y col., 1985). Posteriormente, éstos atraviesan la lámina basal del folículo para ser transformados en las células de la granulosa a E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> a través de la enzima P450<sub>AROM</sub>, como respuesta a la influencia de la FSH (Fig. 4) (Baird, 1982; Gore-

Langton y Armstrong, 1988). Las elevadas concentraciones de este esteroide provocan la secreción de FSH/LH-RH (factor de liberación de FSH/LH hipotalámico), estimulando a su vez mayor liberación FSH con lo que se acelera el desarrollo de los folículos de Graaf. La hormona ovárica inhibina, sintetizada por las células de la granulosa, disminuye la secreción hipofisiaria de FSH (pero no de la LH) (Franchimont y col., 1979). Esta oleada de LH aunada con la concentración existente de FSH, producen la ovulación. En este momento, la concentración de  $E_2$  disminuye y, bajo la influencia de la LH, las células foliculares se transforman en el cuerpo lúteo, el cual segrega principalmente  $P_4$ . En ausencia de fecundación, este tejido endocrino degenera, iniciándose el ciclo nuevamente (Eckert y col., 1990).

### **2.5. Ovario murino prepúber**

Como ya se mencionó, la foliculogénesis comienza durante la vida intrauterina pero su duración difiere con la especie. En algunas, el desarrollo folicular se observa ya durante el período fetal (humano, mono, yegua, cerdo, etc.), mientras que otras se lleva a cabo fundamentalmente en la etapa postnatal (roedores). Particularmente en el ratón, la morfología de la gónada femenina cambia considerablemente desde que nace hasta el inicio de la madurez 5 semanas después (Frawley y Henricks, 1979; Domínguez y col., 1991; Peters 1969 y 1978;). El ovario del recién nacido está constituido por estroma y ovocitos que se encuentran en los tres estadios previamente descritos (I, II y III). La etapa II es la más abundante, mientras que los folículos primordiales (III) se encuentran distribuidos principalmente en la región medular del órgano (Merchant-Larios y Chimal-Monroy, 1989).

El desarrollo postnatal del ratón hembra puede ser dividido en tres categorías (Ben-Or, 1963). Desde que nace hasta los 7 días se considera que el animal se encuentra en la etapa infantil, el período juvenil temprano se extiende hasta los 15 días de edad y fase prepúber o juvenil finaliza a los 30 dpp. Al final de la primera semana de edad, la mayoría de los ovocitos se encuentran ya en el estadio III, que se extienden a todo el ovario, y se inicia el desarrollo folicular. Los primeros folículos preantrales, los cuales presentan una capa de células de la granulosa y una de la teca formada de células aplanadas, se distinguen principalmente en la zona cortical del ovario. Una semana después, la actividad mitogénica se incrementa formando dos a tres capas de células de la granulosa y se desarrolla una clara teca interna multiestratificada compuesta por células escamosas. Durante el período juvenil, los folículos que comienzan a desarrollar un antro ocupan la mayor parte del cortex,

mientras que los primordiales se distribuyen en la parte externa esta zona (Peters, 1969). De esta manera, es posible observar simultáneamente folículos en varias etapas de desarrollo (primordiales, preantrales y antrales), aunque los folículos primordiales son todavía con mucho la mayoría. Sin embargo, debido a que el control hipotalámico de la foliculogénesis en los roedores principia a los 35 dpp (Frawley y Henricks, 1979), frecuentemente los folículos que alcanzan cierto tamaño son invariablemente destinados a degenerar (Peters, 1969). Aunque la atresia es un fenómeno constante, el establecimiento de un balance hormonal, que se suscita con la pubertad, determina el número y selección de folículos que madurarán hasta llegar a ovular (Ireland, 1987).

### 3. Ratón B6.Y<sup>TIR</sup>

#### 3.1. Origen

En 1982, Eicher y colaboradores reportaron que la transferencia del cromosoma Y proveniente de la cepa *Mus musculus domesticus* al genoma de la cepa C57BL/6J o B6 (*M. m. musculus*) produce una reversión completa o parcial de los individuos (cepa conocida como B6.Y<sup>POS</sup> -Poschiavo- o B6.Y<sup>TIR</sup> -Tirano- dependiendo de la variante específica de *M. m. domesticus*). A pesar de que la diferenciación testicular es normal tanto en los progenitores como en la descendencia de la primera generación (F1), las crías XY obtenidas particularmente de la F6 de retrocruza se diferencian fenotípicamente como hembras con ovarios bilaterales (Fig. 6A) o como hermafroditas que desarrollan ovotestis bilaterales (gónada con tejido ovárico y testicular) o un ovario y un ovotestis contralateral (Fig. 6B). Por lo tanto, ningún individuo XY desarrolla testículos normales. Sin embargo, la cantidad de tejido testicular de estas gónadas puede ser el suficiente para dar origen a machos con testículos funcionales capaces de fertilizar hembras B6, con lo cual se logra mantener la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> (Eicher y col. 1982; Eicher y Washburn, 1986) (Fig. 5).

Se cree que el desarrollo de hembras XY en esta cepa se produce por una interacción anormal del cromosoma X y/o genes autosomales de la cepa B6 con el gen *Sry* perteneciente a la cepa *M. m. domesticus* (Eicher y Washburn, 1983, 1986 y 2001; Eicher y col., 1995 y 1996; Nagamine y col., 1999; Lee y Taketo, 1994 y 2001; Palmer y Burgoyne,

---

\* La cepa empleada como modelo biológico en esta investigación fue la B6.Y<sup>TIR</sup>, ya que provino de la cruce de una hembra B6 con un macho *M. m. domesticus* capturado originalmente en la Villa de Tirano, Italia. En esta sección se usará la terminología DOM, POS o TIR dependiendo de como fue referido en las publicaciones que aquí se citan.

1991; Taketo y col., 1991). Diversas investigaciones han propuesto diferentes mecanismos para explicar dicha incompatibilidad:

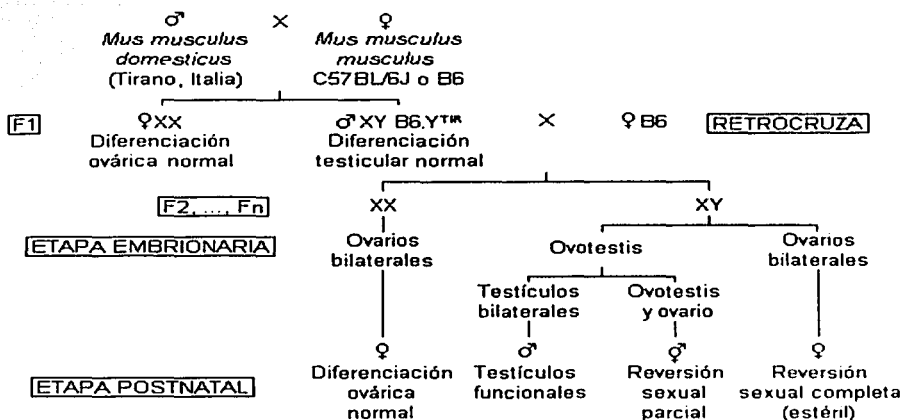


Figura 5: Diagrama que muestra el origen de las hembras XY en la cepa B6.Y<sup>Tm</sup>.

- Debido a que la reversión sexual se presenta sólo hasta la F2, se deduce que se trata de un rasgo recesivo. Eicher y Washburn (1983) propusieron que la condición homociga recesiva del gen autosomal *Tda* derivado de la cepa B6, en presencia del cromosoma Y<sup>DOM</sup>, produce el desarrollo de tejido ovárico. En contraste, la diferenciación de tejido testicular se observa cuando el alelo *Tda*, proveniente del *M. domesticus*, se encuentra en estado homocigo dominante o heterocigo (*Tda*<sup>DOM</sup>/*Tda*<sup>DOM</sup> y *Tda*<sup>DOM</sup>/*Tda*<sup>B6</sup> respectivamente). Sin embargo, el estado homocigo recesivo de estos genes no garantizan la manifestación de una reversión sexual. Por lo tanto, se sugirió que esta condición únicamente predispone la formación de tejido ovárico en los fetos XY (Eicher y col., 1996).
- La hipótesis de "la no correspondencia temporal" propuesta originalmente por Eicher y Washburn en 1986, sugiere que un alelo del *Sry*<sup>DOM</sup> actúa tardíamente con el programa genético de diferenciación ovárica (autosomal) de acción temprana del B6. Esta

hipótesis fue apoyada por Palmer y Burgoyne (1991), quienes encontraron un retraso de aproximadamente 14 horas en el inicio del desarrollo testicular en los fetos XY<sup>POS</sup> con respecto a la cepa B6. Por otro lado, mediante el análisis ontogenético de la *AMH*, Taketo y colaboradores (1991) también observan que la diferenciación testicular en las ovotestis Y<sup>DOM</sup> inicia después que en los testículos B6.

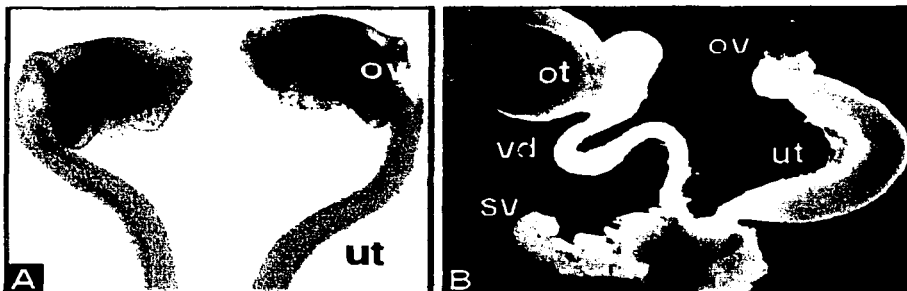


Figura 6: Fenotipos de reversión sexual observados en la cepa B6.Y<sup>TR</sup>. (Tomado de: Nagamine CM, Morohashi K, Carlisle C, Chang DK. 1999. Sex reversal caused by *Mus musculus domesticus* Y chromosomes linked to variant expression of the testis-determining gene *Sry*. *Dev Biol* 216: 182-194).

(A) Genitales internos de una hembra XY de 18 dpc. (ov: ovario, ut: útero)  
 (B) Genitales internos de un hermafrodita XY de 6 semanas de edad, donde se puede observar del lado izquierdo un ovotestis (ot), vaso deferente (vd), vesícula seminal (sv) y un ovario y útero contralateral.

- ♦ Al analizar los transcritos de genes involucrados en fases tempranas de la diferenciación gonadal, Lee y Taketo (1994) encontraron que la expresión del *Sry* se prolonga por más de un día. Demostraron además la ausencia de los transcritos de las enzimas P450<sub>17α</sub> y 3β-HSD, así como una expresión posterior de la P450<sub>AROM</sub> en los ovarios XY. Estas autoras concluyeron que la ruta de determinación testicular en la cepa B6.Y<sup>DOM</sup> se encuentra alterada después de la transcripción del *Sry*.
- ♦ En 1995, Eicher y su grupo lograron crear un ratón B6.Y<sup>POS</sup> transgénico sin reversión sexual al introducir un fragmento de 14.6 kb del *Sry* de la cepa 129 (de origen *M. m. musculus*). Además, Lee y Taketo (1994) obtuvieron descendencia XY sin reversión sexual al cruzar un macho B6.Y<sup>TR</sup> con una hembra *M. m. domesticus*, lo cual sugiere que el *Sry*<sup>DOM</sup> es compatible con sus propios cofactores (Eicher y Washburn, 2001).

- ◆ Nagamine y colaboradores (1999) propusieron un modelo en el cual, un dominio represivo (heterocromatina) inhibe a un potenciador del *Sry*, cuya función es garantizar la expresión oportuna de este gen en la gónada fetal para la subsecuente diferenciación testicular. Esta inhibición provoca una expresión insuficiente del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) del *Sry*, esto a su vez disminuye la producción de proteína SRY, y por consiguiente, ocurre la reversión sexual. No obstante dos años después, Lee y Taketo (2001) demostraron que los individuos XY de la cepa B6, la cual desarrolla testículos normales, también producen bajos niveles de los transcritos de este gen, por lo cual concluyeron que ésta no podía ser la única causa de la reversión sexual observada en la cepa B6.Y<sup>TH</sup>.

A pesar de que estos hallazgos han enriquecido el conocimiento sobre la diferenciación sexual en los mamíferos, en la actualidad aún no se han esclarecido completamente la(s) causa(s) específica(s) del origen del desarrollo de tejido ovárico en los individuos XY, pero los estudios continúan.

### **3.2. Desarrollo y características de la hembra XY<sup>TH</sup>**

Al inicio de la diferenciación gonadal (12-14 dpc), el ovario XY es morfológicamente indistinguible del XX; en ambos se observan abundantes células germinales en la primera división meiótica. No obstante, entre los 17 a los 19 dpc, se produce una muerte masiva de los ovocitos ubicados en la región medular, de tal forma que durante la segunda semana de edad sólo quedan los remanentes de los cordones sexuales estériles rodeados de tejido estromático. En contraste, los ovocitos corticales continúan su desarrollo, alcanzando la zona central del ovario. Por lo tanto, la cantidad de folículos es menor a la que caracteriza al ovario XX (Taketo-Hosotani y col., 1989).

Por otra parte, a pesar de que las hembras XY tienen un ciclo estral irregular porque presentan periodos cortos y anestros prolongados, pueden ser preñadas al aparearlas con machos B6 fértiles. Sin embargo, no llevan a término la gestación ya que los embriones mueren durante el periodo de preimplantación (Taketo-Hosotani y col., 1989; Merchant-Larios y col., 1994; Amleh y col., 1996). Debido a que al realizar injertos de ovarios ectópicos u ortotópicos XX a hembras XY, éstas regularizan su ciclo estral, se hacen fértiles e incluso desarrollan un comportamiento materno, se ha sugerido que las hembras B6.Y<sup>TH</sup> mantienen



funcional el eje hipotálamo-hipófisis-gónada y que su infertilidad se debe principalmente a defectos ováricos (Taketo-Hosotani y col., 1989; Marmolejo-Valencia y col., 1999).

Aunque en la etapa neonatal ambos producen niveles semejantes de hormonas esteroides ( $P_4$  60-70 ng/ml,  $E_2$  20-30 pg/ml y T indetectable), a los 14 dpp el ovario XY produce mayor cantidad de  $P_4$  (200 ng/ml) y menor cantidad T y  $E_2$  (0.2 pg/ml y 180 ng/ml respectivamente) que el ovario XX (120 y 310 ng/ml y 0.5 pg/ml respectivamente). Estas observaciones indican que la esteroidogénesis temprana es independiente de la presencia de ovocitos, folículos y del control hormonal. Además, la formación de tejido semejante a los cuerpos luteos, provocada por la degeneración temprana de los ovocitos de esta zona, producen niveles anormales de hormonas esteroides (Taketo-Hosotani y col., 1989; Villalpando y col., 1993). Durante la pubertad (35 dpp), el ovario XY disminuye su producción de  $P_4$  (140 ng/ml) pero la cantidad de T y  $E_2$  continúa incrementándose (2.1 ng/ml y 260 pg/ml) sin sobrepasar a la producida por la hembra XX (240 y 4 ng/ml y 470 pg/ml respectivamente) (Villalpando y col., 1993). Se ha visto que al agregar gonadotropina proveniente del suero de yegua preñada (PMSG) en cultivo de órgano, la producción de T a los 14 y 35 dpp se incrementa en aquellos ovarios XX, no así en los XY. A los 14 dpp, la PMSG reduce la producción de  $P_4$  en el ovario XY, pero no afecta al XX aunque a los 35 dpp induce un incremento en la biosíntesis de este esteroide. En contraste con lo observado para la T y la  $P_4$ , la producción de  $E_2$  es similar a los 35 dpp en ambos ovarios en presencia de PMSG. Es probable que todo lo anterior se deba a la existencia a una aparente insensibilidad a las gonadotropinas para la producción de T y  $P_4$  en las células esteroidogénicas intersticiales derivadas de los folículos atrésicos de origen cortical característicos del ovario XY, mientras que los cuerpos lúteos tal vez sí respondan a este estímulo (Villalpando y col., 1993).

Por tal motivo, se ha propuesto que el desarrollo neonatal y la atresia folicular son esenciales para el establecimiento de un perfil normal de esteroidogénesis, especialmente de la producción de T, aunque no se descarta la posibilidad de la existencia de una baja eficiencia o errores en la cascada metabólica en el ovario XY (Villalpando, y col., 1993). Estudios posteriores proponen que la causa de esta respuesta se deba probablemente a un retraso en la expresión del gen del factor de crecimiento semejante a insulina tipo I (IGF-I), péptido involucrado en la esteroidogénesis (Villalpando-Fierro y col., 1996).

## **4. IGF-I**

### **4.1. Generalidades**

Los factores de crecimiento semejantes a insulina (IGF's) fueron purificados y secuenciados a partir del plasma humano por Rinderknecht y Humble en 1978 (a y b). Los IGF's son péptidos de bajo peso molecular relacionados estructural y funcionalmente a la insulina, los cuales están constituidos por los dominios A, B, C, D y E. Las regiones A y B son homólogas a las cadenas A y B de la molécula de proinsulina, el dominio C es análogo al péptido conector C de la proinsulina, mientras que la cadena D es exclusiva de estos factores de crecimiento (Zapf y Froesch, 1986).

Se ha dividido a los IGF's en dos grupos: El tipo I está formado por una cadena sencilla de 70 aminoácidos (aa) y tiene un peso molecular de 7.6 kilodaltones (kDa), mientras que el tipo II está constituido por 67 aa con un peso molecular de 7.4 kDa. (Zapf y Froesch, 1986; Daughaday y Rotwein, 1989). El gen que codifica para el IGF-I consiste de seis exones, 5 intrones y al menos dos sitios promotores, mientras que el IGF-II se compone de 6 exones y 4 promotores. Por lo tanto, se han descrito múltiples mRNA de ambos IGF's en diferentes tejidos tanto fetales como postnatales, lo cual se debe a los "splicing" y/o sitios promotores alternativos (Daughaday y Rotwein, 1989). En general, la compleja regulación génica de estos péptidos puede suscitarse a nivel transcripcional, transduccional y post-transduccional (Sara y Hall, 1990; Guidice, 1992).

La principal fuente de secreción postnatal del IGF-I es el hígado, en respuesta a la GH. Sin embargo, otros órganos como el riñón, el útero, el ovario y el pulmón también lo producen, aunque en menor cantidad (Adamo y col., 1994; Daughaday y Rotwein, 1989). En contraste, los niveles mas altos del IGF-II se observan en la vida embrionaria pero disminuyen después del nacimiento (Daughaday y Rotwein, 1989) y se encuentra en mayor cantidad en el sistema nervioso central. Lo anterior sugiere que los IGF's no sólo actúan como hormonas endocrinas, sino que también tienen una función paracrina y autocrina (Sara y Hall, 1990)

Otra característica importante de estos factores de crecimiento es el hecho de que no se encuentran libres en el plasma, sino asociados a un grupo especial de proteínas conocidas como proteínas acarreadoras (IGFBP's), de las cuales se han identificado seis especies distintas (Sara y Hall, 1990). Se ha propuesto que la formación de este complejo tiene por objeto coordinar y regular las actividades biológicas de los IGF's, ya que al unirse a éstos los transporta y libera cerca de sus células blanco, prolonga su vida media al limitar su

acceso a receptores específicos, así como potenciar o inhibir sus efectos (Jones y Clemmons, 1995).

Los efectos celulares de los IGF's son controlados por la unión de éstos a receptores específicos (IGFr) de la superficie de la membrana celular. Hasta el momento se han identificado dos tipos de receptores: IGFr-1, el cual muestra una mayor afinidad al IGF-I y el IGFr-2 al IGF-II (Nissley y Lopaczynski, 1991). No obstante, la acción fisiológica de ambos factores se lleva a cabo principalmente por su interacción con el receptor tipo I (Lui y col., 1993). Éste es una glicoproteína heterotetramérica (formada por dos cadenas  $\alpha$  y dos  $\beta$ ) (Werner y col., 1991) que actúa como transductor de las acciones mitogénicas mediante la fosforilación de tirosinas de un sustrato proteico llamado IRS-1 (Nisseley y Lopaczynski, 1991). La función principal del receptor tipo II es unir a su ligando con el objeto de degradarlo (Sklar y col., 1989).

Las función más conocida de los IGF's es la de estimular el crecimiento y diferenciación de una gran variedad de tipos celulares, ya que actúan como péptidos mitogénicos que inducen la expresión celular del protooncogen c-fos (Merriman y col., 1990). Por tal motivo, se les ha asociado a procesos patológicos como el cáncer (Macaulay, 1992). Además, producen diferentes efectos que dependerán de la respuesta específica de la célula blanco en que actúen (Sara y Hall, 1990; Guidice, 1992). Ejemplos de lo anterior son la síntesis de aa y proteínas que se observan en el cartilago de rata (Sara y Hall, 1990) o la producción de esteroides ováricos (Adashi y col., 1985c), ambos por la influencia del IGF-I.

*In vitro* se ha comprobado que el IGF-I estimula la síntesis de DNA y la proliferación, al actuar como un factor de progresión del ciclo celular (Lu y Campisi, 1992), llegando incluso a inhibir la apoptosis en células hematopoyéticas humanas (Muta y Krantz, 1993).

#### **4.2. Papel del IGF-I en la esteroidogénesis ovárica**

Recientemente se ha propuesto que, además de la FSH y LH, otras moléculas de origen ovárico tienen una participación importante en la esteroidogénesis. Entre éstas se encuentran la inhibina, activina, las mismas hormonas esteroides ( $E_2$  y  $P_4$ ) y factores de crecimiento como el IGF-I (Hammond y col., 1991). A través de la identificación de su mRNA, se ha confirmado la síntesis de IGF-I en las células de la granulosa y del IGF-II en las células de la teca en el ovario de rata y ratón (Adashi y col., 1997; Cohick y Clemmons, 1993).

Estudios realizados en células de la granulosa de rata han evidenciado la posibilidad de que el IGF-I actúe de manera autocrina en la regulación de la esteroidogénesis ovárica mediante cuatro mecanismos complementarios:

- ◆ Estimulando la unión de las lipoproteínas de baja densidad a su receptor celular y la utilización del colesterol que las conforman (Veldhuis y col., 1987).
- ◆ Incrementando la síntesis de novo del colesterol en las células ováricas mediante la estimulación de  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril CoA reductasa (Veldhuis y Rodgers, 1987).
- ◆ Acelerando la formación y degradación de los ésteres de colesterol debido a que estimula la actividad enzimática de la acil CoA colesterol acil transferasa (Veldhuis y col., 1985).
- ◆ Estimulando la síntesis de proteínas que rompen la cadena lateral del colesterol como la citocromo P450<sub>scc</sub> y la adrenodoxina (Veldhuis y col., 1986; Veldhuis y Rodgers, 1987).

Por otro lado, se ha especulado que el IGF-I también participa en la síntesis de andrógenos debido a la existencia de concentraciones fisiológicas de este factor en células teco-intersticiales; por lo que se puede deducir que probablemente se trate de un sitio de recepción y acción del IGF-I. Aunque la significancia fisiológica de estos hallazgos es incierta, se cree que el IGF-I proveniente de las células de la granulosa pudiera interactuar con las células teco-intersticiales adyacentes. De esta forma, modula el flujo de andrógenos dependiendo de las necesidades del folículo ovárico en desarrollo (Hernández y col. 1988).

Se han realizado experimentos *in vitro* donde las hormonas hipofisarias FSH, LH y GH parecen ser fundamentales para amplificar los efectos del IGF-I en células del ovario de diferentes especies de mamíferos. En el caso de la rata, este factor de crecimiento sinergiza con la FSH y estimula directamente la producción de P<sub>4</sub> (Adashi y col., 1985a), potencia la actividad de la aromatasa (Adashi y col., 1985b y d), así como incrementa la acción estimuladora del AMPc en la biosíntesis de P<sub>4</sub> (Adashi y col. 1986). En las células de la teca eleva la biosíntesis de andrógenos inducido por la LH (Hernández y col. 1988; Cara y

Rosenfield, 1988) ya que estimula selectivamente la expresión del gen de la enzima P450<sub>scc</sub> (Magoffin y col., 1990).

#### **4.3. Expresión del IGF-I en la cepa B6.Y<sup>TM</sup>**

Villalpando y colaboradores (1996) examinaron la ontogenia de la expresión del gen que codifica para el IGF-I y su inmunoreactividad en los ovarios XX y XY de la cepa B6.Y<sup>TM</sup> durante el desarrollo postnatal (1-40 dpp). Estos autores encontraron que la expresión del mRNA de este gen está retrasado en el ovario XY ya que los transcritos fueron detectados hasta los 15 dpp, mientras que en el XX se encontraron desde el primer día de nacimiento. Además, identificaron la proteína de este factor a partir de los 14 dpp en las células de la teca que rodean al folículo y en las células intersticiales localizadas en todo el ovario XX de 14 dpp. Por el contrario, en el ovario XY únicamente se observa en la zona cortical y en menor cantidad en las células semejantes a las células de la teca y en las células intersticiales que rodean a los cordones estériles medulares.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque la función endocrina del ovario adulto en los mamíferos es un proceso complejo regulado por LH y FSH, recientemente se ha propuesto que otras moléculas de origen gonadal, como el IGF-I, tienen una participación importante en la esteroidogénesis. Esta proteína ha sido estudiada en diferentes especies de mamíferos. En ratón B6.Y<sup>TIR</sup>, el IGF-I ha sido detectado principalmente en las células de la teca de la zona cortical. En los antecedentes se planteó que el 50% de los individuos XY pertenecientes a esta cepa, presentan alteraciones durante el proceso de diferenciación testicular provocando incluso una reversión sexual completa. A pesar de que las hembras XY<sup>TIR</sup> tienen una apariencia fenotípica normal, tienen un ciclo estral irregular y presentan problemas de esterilidad. En comparación con los ovarios XX, las hembras XY<sup>TIR</sup> producen niveles bajos de P<sub>4</sub>, T y E<sub>2</sub> debido a que tienen una disminución en la expresión de las enzimas que participan en la biosíntesis de las hormonas esteroideas gonadales. Además, la expresión ovárica postnatal del mRNA del IGF-I se encuentra retrasada. Estudios previos *in vitro* han demostrado que este péptido sinergiza con gonadotropinas para incrementar la producción de esteroides en los ovarios adultos de cerdo, conejo, rata y humano. Sin embargo, hasta el presente no se conoce el papel que el IGF-I tiene durante la foliculogénesis, ni cómo participa en el control de la producción de esteroides en el ratón en etapas tempranas del desarrollo postnatal cuando no se ha establecido el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Con base en lo antes mencionado, se plantea la siguiente hipótesis y objetivos:

## HIPÓTESIS

El IGF-I incrementa la producción *in vitro* de T en los ovarios XX y XY<sup>TIR</sup> durante el desarrollo folicular temprano en el ratón. Asimismo, se postula un efecto sinérgico entre el IGF-I y la FSH.

## OBJETIVOS

### **Objetivo general:**

Establecer si el IGF-I y la FSH tienen un efecto en la síntesis del andrógeno T en cultivo organotípico de ovarios XX y XY<sup>TIR</sup>, durante el período juvenil temprano al prepúber (de los 10 a los 18 dpp) en el ratón, cuando no está establecido aún el sistema hipotálamo-hipófisis-gónada.

### **Objetivos particulares:**

1. Determinar si el IGF-I tiene un efecto en la producción *in vitro* de T en ovarios XX y XY<sup>TIR</sup>.
2. Evaluar el efecto de la FSH en la síntesis de T en cultivo organotípico de ovarios XX y XY<sup>TIR</sup>.
3. Analizar si la combinación del IGF-I / FSH incrementa la producción *in vitro* de T en ovarios XX y XY<sup>TIR</sup>.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. *Reactivos*

Todos los reactivos utilizados en el presente trabajo fueron de grado analítico. La preparación de las soluciones se describe en el apéndice (Pág. 53).

### 2. *Animales*

Se emplearon ratones hembras de 10 a 18 dpp (lactantes), obtenidas a partir de la cruce de machos B6.Y<sup>Tm1</sup> y hembras B6. Los animales se mantuvieron en períodos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, fueron alimentados con Teklad S-2335 Mouse Breeden Diet 7004 y agua *ad libitum*.

### 3. *Identificación del sexo cromosómico*

#### 3.1. *Fundamento de la técnica de PCR*

Debido a que no existen diferencias fenotípicas en la etapa postnatal entre las hembras XX y XY de la cepa B6.Y<sup>Tm1</sup>, se usó la técnica denominada reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para determinar el sexo genético. El PCR es un método enzimático que produce múltiples copias de un segmento preseleccionado de DNA mediante ciclos repetidos de desnaturalización térmica, alineamiento e hibridación de dos oligonucleótidos sintéticos (o segmentos cebadores) a la secuencia complementaria blanco y extensión de los mismos por una DNA polimerasa. En este caso, se amplificó un fragmento del gen *Sry* ubicado en el cromosoma Y, por lo tanto, presente únicamente en las hembras XY. Los oligonucleótidos utilizados fueron los denominados *Sry* K1 y K2, diseñados por Jeske y colaboradores (1996), los cuales delimitan un fragmento de 226 pares de bases (pb) de este gen:

*Sry* K1: 5' gagagcatggaggccat 3'

*Sry* K2: 5' ccactcctctgtgacact 3'



### **3.2. Procedimiento**

#### **(a) Aislamiento del DNA**

El código empleado para la identificación de las crías apreciadas fenotípicamente como hembras se hizo de acuerdo a la amputación de un dedo del miembro posterior. El DNA se aisló de la punta de la cola de estos animales entre los 6 y 8 dpp. Cada muestra se trituró en 100  $\mu$ l de amortiguador SET, se le agregó SDS al 5% y 5  $\mu$ g de proteinasa K, se mezcló con vortex por 10 segundos y se incubó por 2 horas a 60 °C en una incubadora termomixer Brinkman Instruments modelo 5436. Después se centrifugó a 12000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos a 4 °C en una centrifuga Eppendorf modelo 5402. El sobrenadante se diluyó 1:20 con agua tratada con di-etilpirocarbonato (DEPC), dilución de la cual se tomaron 2.5  $\mu$ l como templado.

#### **(b) Amplificación del Sry**

Las reacciones de desnaturalización, alineamiento y amplificación del DNA se realizaron en un termociclador marca PERKIN ELMER modelo 9600.

Para la reacción de amplificación se preparó una mezcla maestra con 17.6 pmol del oligonucleótido Sry K1 y 18.4 pmol del Sry K2, 1.5 mM de cada uno de los de desoxi-nucleótidos-trifosfatados (dNTP's) (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), MgCl<sub>2</sub> 7 mM, TRIS-HCl 50 mM (pH 9.0), 1.7  $\mu$ g de albúmina sérica bovina, NONIDET P-40 al 0.05%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 15 mM y 0.2 unidades (U) de amplitaq DNA polimerasa por muestra.

El templado se desnaturalizó 5 minutos a 94 °C y posteriormente se adicionaron 7.5  $\mu$ l de mezcla maestra (volumen final de reacción por muestra: 10  $\mu$ l). Finalmente las muestras se sometieron a 30 ciclos, cada uno con los siguientes tiempos y temperaturas: 30 segundos a 94° C (desnaturalización), 1 minuto a 60° C (alineamiento de los oligonucleótidos) y 1 minuto a 72° C (síntesis).

#### **(c) Visualización del producto amplificado**

Para identificar los productos amplificados se preparó un gel de agarosa al 2% en amortiguador TBE 0.5X, pH 8.0.

Se tomó una alícuota de 5  $\mu$ l del producto amplificado y se mezcló con 2  $\mu$ l de amortiguador de carga. Para estimar el peso molecular de los mismos, se utilizó el marcador

de bajo peso molecular "Low DNA Mass™ Ladder" de GIBCO-BRL, el cual define un intervalo de 100 a 2000 pb.

La electroforesis se corrió en amortiguador TBE 1X (pH 8.0) y se aplicaron 100 volt por un tiempo aproximado de 40 minutos. Posteriormente el gel se tiñó 10 minutos con una solución de bromuro de etidio 1.25 µg/ml y se lavó con agua bidestilada. Los productos amplificados se visualizaron con un transiluminador de luz ultravioleta marca Sigma.

#### **4. Cuantificación de T**

La comparación de la actividad endocrinológica entre las hembras XX y XY durante el desarrollo postnatal fue medida a través de la producción de T ovárica *in vitro*.

##### **4.1. Cultivo organotípico por rotación**

###### **(a) Medios de cultivo**

###### **◆ Medio de cultivo básico**

El medio de cultivo básico fue preparado bajo una campana de flujo laminar con Medio 199 (con sales Earle, L-glutamina y amortiguador HEPES 25 mM) de los laboratorios IN VITRO, el cual se suplementó con bicarbonato de sodio al 0.21%, 110 µg/ml de piruvato de sodio, amortiguador HEPES 2.5 mM, L-glutamina 0.2 M, 50 µg/ml de sulfato de estreptomina y 50 U/ml de penicilina G sódica.

###### **◆ Medios de cultivo experimentales**

Se emplearon tres medios de cultivo experimentales y un control. Todos se elaboraron en una campana de flujo laminar y se filtraron con filtros Millipore de 0.22 µm de diámetro de poro:

<b>Control:</b>	Medio de cultivo básico suplementado con 1 µg/ml de progesterona.
<b>Medio IGF-I+:</b>	Al medio de cultivo básico se le adicionó 1 µg/ml de progesterona y 10 ng/ml de IGF-I.
<b>Medio FSH+:</b>	Se le añadió al medio de cultivo básico 1 µg/ml de progesterona y 100 UI/ml de FSH.
<b>Medio IGF-I/FSH+:</b>	Al medio de cultivo básico se le agregó 1 µg/ml de progesterona, 10 ng/ml de IGF-I y 100 UI/ml de FSH.

## **(b) Procedimiento**

Se sacrificaron hembras XX y XY B6.Y<sup>TR</sup> de 10, 12, 14, 16 y 18 dpp por dislocación cervical. Se les aplicó una solución 1:1 de benzal-etanol absoluto en el abdomen y se les realizó un corte en V para extraer los ovarios. Bajo una campana de flujo laminar, éstos se aislaron y fueron puestos en una caja de Petri con medio de cultivo básico para eliminar el tejido graso y los oviductos. Los ovarios se partieron a la mitad y se transfirieron en tubos de ensayo debidamente identificados, cada uno con 500 µl de las distintas soluciones experimentales. Estos se incubaron en un aparato de rotación en una estufa de cultivo National Appliance Co modelo 8941-2 a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Posteriormente, las muestras se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta su evaluación por radioinmunoanálisis (RIA). De cada edad/tratamiento se hicieron de 5 a 8 muestras.

### **4.2. RIA**

#### **(a) Fundamento de la técnica de RIA**

El RIA es una técnica inmunológica altamente sensible que permite detectar cantidades menores a 1 ng/ml de antígeno (Ag), en este caso la hormona esteroide sexual T, presente en el medio de cultivo. Esta metodología se fundamenta en una reacción de competencia de dos antígenos, uno marcado con <sup>125</sup>I (Ag\*) y otro no marcado (Ag), por un anticuerpo específico (Ab primario). Si la concentración de la muestra problema es mayor a la del marcador, entonces se incrementará la cantidad de Ag\* que será desplazado de los sitios de unión al Ab primario. Por lo tanto, las emisiones gamma emitidas por el radionúclido serán inversamente proporcionales a la concentración de hormona que se desea conocer. Dichas concentraciones pueden ser determinadas mediante una curva estándar hecha a partir del porcentaje de unión del Ag\* (%B/B0) *versus* concentraciones conocidas del Ag. También es necesario conocer la unión no específica (NSB) o unión producida entre el Ag\* y una molécula ajena al Ab primario; así como la realizada entre el Ag\* y el Ab primario, ocupando todos los sitios de unión posibles, definida como unión máxima (B0).

El %B/B0 empleada para determinar la concentración problema se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$\%B/B0 = \frac{B_0 - NSB}{B0 - NSB} \times 100$$

Donde %B/B0: Porcentaje de unión al Ag\*  
 B<sub>n</sub>: Media de las cuentas por minuto (cpm) del duplicado de cada muestra  
 NSB: Media de las cpm del duplicado de la NSB  
 B0: Media de las cpm del duplicado de la B0

**(b) Procedimiento**

Las concentraciones estándares de T utilizadas para la realización de la curva estándar comprendieron un intervalo de 0.1 a 10 ng/ml.

Para cuantificar la T producida por los ovarios XX y XY en los diferentes tratamientos, se empleó el estuche comercial Testosterone Double Antibody de ICN Biomedicals Inc. Todas las muestras (B<sub>n</sub>), los estándares de T, la B0, la NSB y las cuentas totales (TC) se hicieron por duplicado en tubos de ensayo debidamente identificados, de acuerdo al siguiente diseño general:

No. de tubo	Contenido
1 – 2	TC: Se agregaron 500 µl del trazador T <sup>125</sup> I.
3 – 4	NSB: Se agregaron 550 µl de medio de cultivo básico, 100 µl de D-PBS 0.1 M (pH 7.3) y 500 µl de T <sup>125</sup> I.
5 – 6	B0: Se agregaron 50 µl de medio de cultivo básico, 100 µl de D-PBS 0.1 M (pH 7.3), 500 µl de T <sup>125</sup> I y 500 µl de Ab primario (anti-T).
7 – 20	Curva estándar: Se agregaron 50 µl de cada estándar de T (0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 y 10.0 ng/ml), 100 µl de D-PBS 0.1 M (pH 7.3), 500 µl de T <sup>125</sup> I y 500 µl anti-T.
21 – 100	B <sub>n</sub> : Se agregaron 50 µl de cada muestra, 100 µl de D-PBS 0.1 M (pH 7.3), 500 µl de T <sup>125</sup> I y 500 µl de anti-T.

El contenido de los tubos fue mezclado con vortex y se incubó por dos horas en baño María (Scientific Product Durabath). Para precipitar el complejo Ag<sup>+</sup>/Ab, se adicionaron 100 µl de Ab secundario a todos los tubos, excepto a los correspondientes al TC (tubos 1 y 2), se agitó y se incubó por otra hora bajo las mismas condiciones. Posteriormente se centrifugaron los tubos del 3 al 100 a 2500 rpm por 30 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se midieron las cpm en un contador de centelleo gamma (ICN ISOMEDIC, modelo 4/600).

Para hacer un cálculo más exacto de las concentraciones de T de las muestras, la curva estándar se ajustó por medio de la siguiente ecuación:

$$Y = m \log_{10} X + b$$

Donde Y: %B/B0

m: Pendiente

X: Concentraciones de los estándares de T

b: Ordenada al origen

### ***(c) Análisis estadístico de los datos***

Para determinar si las edades analizadas mostraban diferencias estadísticamente significativas en cada tratamiento y entre tratamientos, se realizó una prueba de F del análisis de varianza de una sola vía. Si el resultado señalaba la existencia de diferencias entre las medias, se procedió a realizar de una prueba de comparación múltiple por pares por el método de la mínima diferencia significativa (LSD) para identificar cuáles edades eran diferentes.

Para establecer si los tratamientos aplicados a cada sexo eran estadísticamente distintos entre sí, se realizó una prueba de F del análisis de varianza de una sola vía, utilizando un diseño de mediciones repetidas (edades). Posteriormente se efectuó la prueba de LSD para identificar cuáles medias de tratamientos eran diferentes. El mismo procedimiento fue empleado para determinar las diferencias entre las hembras XX y las XY de cada grupo.

El intervalo de confianza usado en todas las pruebas estadísticas utilizadas fue al 95.0% y todas se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 10.0 para Windows.

## RESULTADOS

### 1. Identificación de hembras XY

El sexo cromosómico de las crías apreciadas fenotípicamente como hembras se determinó mediante la amplificación del gen *Sry* por PCR. Los productos de 266 pb fueron visualizados solamente en aquellas muestras que correspondían a machos genéticos con reversión fenotípica completa ya que dicho gen está ubicado en el cromosoma Y. Como control positivo y negativo se utilizó el DNA obtenido de gónada de macho y hembra adultos respectivamente, pertenecientes a la cepa B6 (Fig. 7).

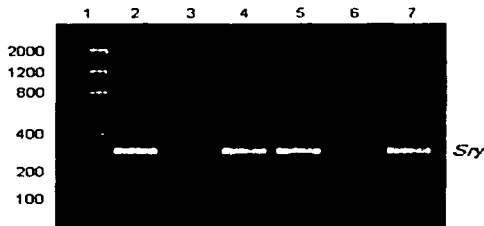


Fig. 7. Productos de PCR del gen *Sry* de tejido postnatal (10 a 18 dpp) de las crías apreciadas fenotípicamente como hembras obtenidas de la cruce de machos B6.Y<sup>flm</sup> con hembras B6. Carril 1, marcador de peso molecular; 2 y 3, controles positivo y negativo respectivamente; 4 al 7, muestras experimentales. Nótese que los carriles 4, 5 y 7 pertenecen a hembras XY, mientras la ausencia de banda en el carril 6 indica que la muestra corresponde a una hembra XX.

### 2. Producción de T

En el grupo control, la sensibilidad del RIA no permitió cuantificar los niveles de T sintetizados a los 10 dpp en el ovario XX. No obstante, a los 12 dpp se registró un ascenso rápido en la concentración de T (1.35 ng/ml) que decrece a más de la mitad en la siguiente etapa para hacerse indetectable a los 18 dpp ( $P < 0.05$ ) (Fig. 8). En contraste, en las hembras XY prácticamente no se observa producción de esta hormona durante las edades aquí estudiadas, excepto a los 16 dpp donde se observó un ligero incremento en la concentración de T (0.44 ng/ml) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 9).

Al realizar las comparaciones múltiples (LSD) utilizando el diseño de mediciones repetidas (cuantificación de T a diferentes edades), no se encontraron diferencias

estadísticamente significativas en la T producida entre los ovarios XX y XY cultivados en este medio ( $P < 0.05$ ).

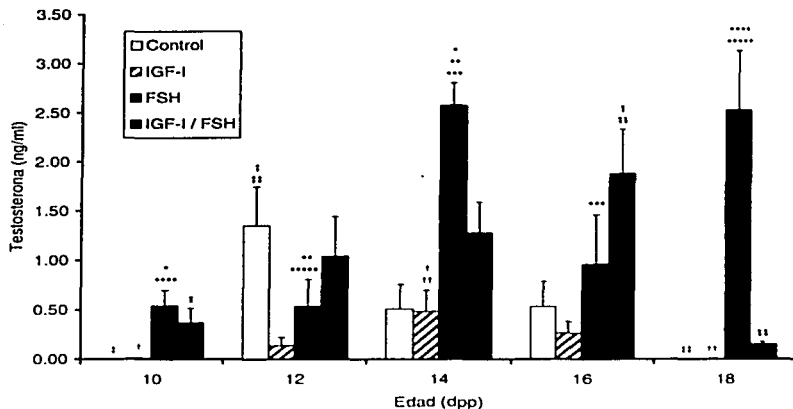


Figura 8. Producción de T en ovarios XX de 10 a 18 dpp, cultivados en presencia de IGF-I, FSH e IGF-I/FSH. Las barras representan las medias obtenidas y el error estándar. El IGF-I inhibe la producción de T a 12 dpp, mientras que la FSH aumentó la producción de este andrógeno a los 14 dpp. Se detectó sinergismo del IGF-I/FSH de los 10 a los 16 dpp, pero a los 18 dpp no se observó efecto.

- ‡ Indica diferencias estadísticamente significativas entre las edades 10 y 12 dpp del grupo control
  - ‡‡ Indica diferencias estadísticamente significativas entre las edades 12 y 18 dpp del grupo control
  - † Indica diferencias estadísticamente significativas entre las edades 10 y 14 dpp del tratamiento suplementado con IGF-I
  - †† Indica diferencias estadísticamente significativas entre las edades 14 y 18 dpp del tratamiento suplementado con IGF-I
  - Indica diferencias estadísticamente significativas entre las edades 10 y 14 dpp del tratamiento enriquecido con FSH
  - Indica diferencias estadísticamente significativas entre las edades 12 y 14 dpp del tratamiento enriquecido con FSH
  - Indica diferencias estadísticamente significativas entre las edades 14 y 16 dpp del tratamiento enriquecido con FSH
  - Indica diferencias estadísticamente significativas entre las edades 14 y 16 dpp del tratamiento enriquecido con FSH
  - Indica diferencias estadísticamente significativas entre las edades 14 y 16 dpp del tratamiento enriquecido con FSH
  - ¥ Indica diferencias estadísticamente significativas entre las edades 10 y 16 dpp del tratamiento suplementado con IGF-I / FSH
  - ¥¥ Indica diferencias estadísticamente significativas entre las edades 16 y 18 dpp del tratamiento suplementado con IGF-I / FSH
- ( $P < 0.05$ )

## 2.1. Efecto del IGF-I

A excepción de los 12 dpp, en el que se observa un efecto inhibitorio, la producción de T de los ovarios XY no se ve afectado al suplementar el medio de cultivo con IGF-I ( $P < 0.05$ ) (Fig. 8). De manera similar, el IGF-I no tuvo ningún efecto en las gónadas XY ya que se cuantificaron cantidades semejantes de T a las registradas en el grupo control ( $P < 0.05$ ) (Fig. 9).

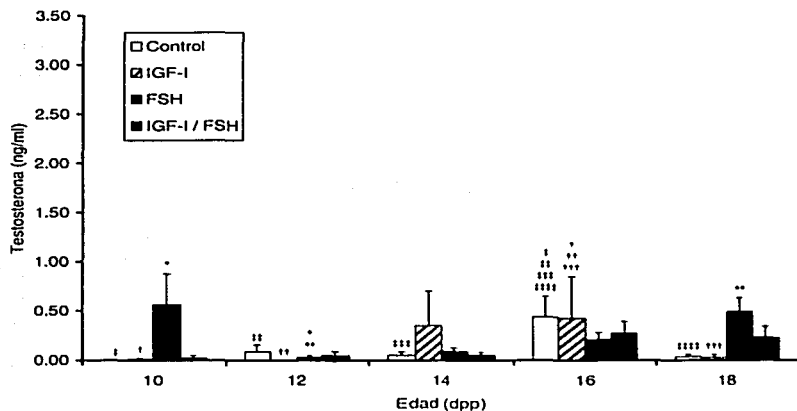


Figura 9. Producción de T en ovarios XY de 10 a 18 dpp, cultivados en presencia de IGF-I, FSH e IGF-I/FSH. Las barras representan las medias obtenidas y el error estándar. En los ovarios XY los niveles de testosterona fueron en general monótonos y no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. El efecto de la FSH se encontró sólo a los 18 dpp y no se observó sinergismo entre el IGF-I y la FSH.

- ‡ Indica diferencias estadísticamente significativas entre las edades 10 y 16 dpp del grupo control
- ‡‡ Indica diferencias estadísticamente significativas entre las edades 12 y 16 dpp del grupo control
- ‡‡‡ Indica diferencias estadísticamente significativas entre las edades 14 y 16 dpp del grupo control
- ‡‡‡‡ Indica diferencias estadísticamente significativas entre las edades 16 y 18 dpp del grupo control
- † Indica diferencias estadísticamente significativas entre las edades 10 y 16 dpp del tratamiento suplementado con IGF-I
- †† Indica diferencias estadísticamente significativas entre las edades 12 y 16 dpp del tratamiento suplementado con IGF-I
- ††† Indica diferencias estadísticamente significativas entre las edades 16 y 18 dpp del tratamiento suplementado con IGF-I
- Indica diferencias estadísticamente significativas entre las edades 10 y 12 dpp del tratamiento enriquecido con FSH
- Indica diferencias estadísticamente significativas entre las edades 12 y 18 dpp del tratamiento enriquecido con FSH



En este tratamiento tampoco se encontraron diferencias estadísticamente considerables entre la T producida por los ovarios XX y XY cultivados en presencia del IGF-I durante el período aquí analizado ( $P < 0.05$ ).

## 2.2. Efecto de la FSH

El efecto de la FSH en la producción de este andrógeno en los ovarios XX se pudo apreciar desde la primera edad examinada. La concentración de T cuantificada a los 10 dpp fue de 0.75 ng/ml, la cual se mantuvo dos días después. A los 14 dpp se incrementó a 2.73 ng/ml pero decae en la siguiente etapa para posteriormente sintetizarse a niveles similares a los registrados a los 14 dpp ( $P < 0.05$ ) (Fig. 8). Aunque los valores de T en las hembras XY de 10 días de edad son semejantes a los observados en las XX, la FSH no produce ningún efecto en la síntesis de este esteroide en los ovarios XY ( $P < 0.05$ ) (Fig. 9). Sin embargo, dichas concentraciones son notablemente inferiores a los encontrados en las hembras XX a lo largo de las etapas estudiadas ( $P < 0.05$ ) (Fig. 10).

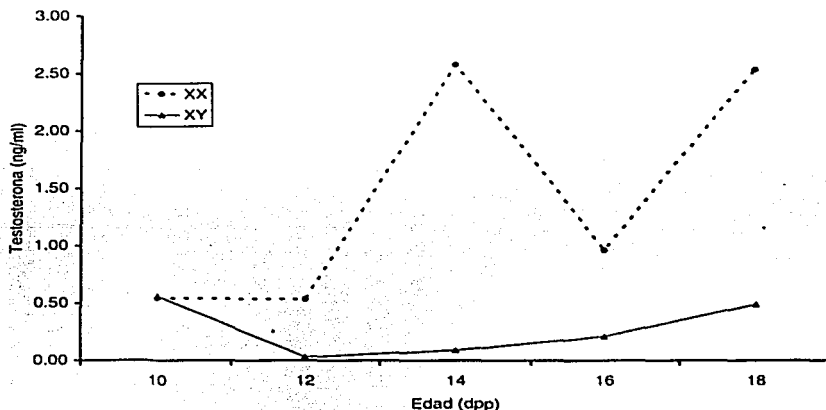


Figura 10. Producción de T en ovarios XX y XY de los 10 a 18 dpp cultivados en presencia de FSH. La síntesis de T entre las hembras XX y XY resultó estadísticamente significativa durante las etapas analizadas ( $P < 0.05$ ).

### 2.3. Efecto del IGF-I / FSH

La figura 11 muestra el efecto que tiene IGF-I / FSH en la producción de T en los ovarios XX y XY. A los 10 dpp la hembras XX sintetizaron 0.33 ng/ml de este andrógeno, cantidad que fue aumentando paulatinamente hasta llegar a 1.87 ng/ml a los 16 dpp (Fig. 8). Sin embargo, a los 18 dpp la concentración de esteroide decrece y regresa a la misma concentración registrada a los 10 dpp ( $P < 0.05$ ). Por el contrario, la producción de esta hormona en los ovarios XY fue prácticamente indetectable ya que no se encontraron diferencias significativas a lo largo del período analizado ( $P < 0.05$ ) (Fig. 9).

La producción de T en las hembras XX fue estadísticamente distinta a la registrada en las XY durante las etapas de desarrollo estudiadas ( $P < 0.05$ ) (Fig. 11).

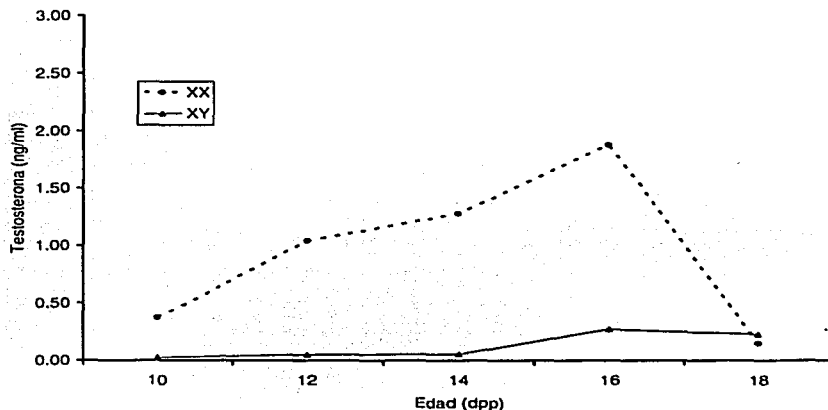


Figura 11. Producción de T en ovarios XX y XY de los 10 a 18 dpp cultivados en presencia de IGF-I / FSH. La síntesis de T entre las hembras XX y XY resultó estadísticamente diferente a lo largo de las etapas estudiadas ( $P < 0.05$ ).

### 2.4. Efecto entre tratamientos

El análisis estadístico de comparaciones múltiples reveló diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los tratamientos aplicados a las gónadas XX, excepto entre el grupo control y el IGF-I ya que no se encontró efecto alguno entre estos dos tratamientos ( $P < 0.05$ ) (Fig. 8). Por el contrario, tanto la FSH como el IGF-I / FSH incrementan la síntesis de T principalmente a los 14 y 18 dpp (2.73 y 2.20 ng/ml respectivamente) en el caso de la

FSH, mientras que el IGF-I / FSH la eleva paulatinamente entre los 10 y 16 dpp. Sin embargo, al comparar el efecto de la FSH con respecto al registrado por el IGF-I / FSH se observó la inversión de la síntesis de T en cada edad, de tal forma que forman un patrón completamente distinto.

Por otra parte, no se encontraron diferencias que resultaran estadísticamente considerables entre los tratamientos experimentales (IGF-I, FSH e IGF-I/FSH) y control a los que fueron sometidos los ovarios XY ( $P < 0.05$ ) (Fig. 9).

En resumen,

1. El IGF-I no tuvo efecto en la biosíntesis de T en los ovarios XX, excepto a los 12 dpp ya que, dentro del intervalo de tiempo analizado, se observó que a esta edad se inhibe la producción de este andrógeno.
2. La FSH aumenta la producción de T en los ovarios XX a los 14 dpp.
3. El IGF-I sinergiza con la FSH e incrementa la producción de T en los ovarios XX de los 10 a los 16 dpp, pero a los 18 dpp no se observó efecto.
4. En los ovarios XY los niveles de testosterona fueron en general menores y no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.
5. El IGF-I no tuvo ningún efecto en la biosíntesis de T en los ovarios XY.
6. Únicamente se encontró un efecto positivo de la FSH a los 18 dpp.
7. No se observó sinergismo entre el IGF-I y la FSH en los ovarios XY.

## DISCUSIÓN

En la presente tesis se analizó el efecto del IGF-I y la FSH en la producción del andrógeno T durante el desarrollo postnatal de ovarios XX y XY<sup>TIR</sup> en el periodo juvenil temprano al prepúber en el ratón.

La maduración del folículo y la producción de esteroides sexuales en las células del ovario adulto de los mamíferos dependen de la interacción coordinada de gonadotropinas, factores de crecimiento y de otros péptidos (Hammond y col., 1991). La acción de las gonadotropinas en el ovario es modulada por receptores ubicados en las células foliculares. Las células de la teca tienen receptores principalmente a LH, mientras que las células de la granulosa a FSH. Las células de la granulosa de folículos preantrales poseen receptores a LH hasta que desarrollan un antro folicular (Richards, 1980; Richards y col., 1987). Sin embargo, la regulación de la actividad secretora de hormonas esteroides en etapas tempranas del desarrollo ovárico en el ratón, es un aspecto que hasta la fecha no se ha abordado.

La organización folicular en el ovario de ratón empieza después del nacimiento. Durante la etapa infantil, que abarca la primera semana de vida, el folículo está conformado por una capa de células de la granulosa. Al final de esta fase, se desarrolla la teca primaria compuesta por una capa de células aplanadas. Durante la segunda semana, período conocido como juvenil temprano (7 a los 15 dpp), los folículos están formados de 2 a 3 capas de células de la granulosa. En esta etapa se establece la teca interna y se inicia la formación de la cavidad antral. Del día 15 al 30 se conoce como período juvenil o prepúber y se caracteriza por una gran actividad mitogénica y consecuente engrosamiento del compartimiento tecal y la irrigación de la teca interna por capilares (Ben-Or, 1963; Peters, 1969). La T detectada en el presente estudio es producida por las células tecales que se encuentran presentes en los ovarios en cada etapa analizada. También es probable que provenga de la glándula intersticial, cuya formación sea inducida a partir de folículos atrésicos, característicos de etapas tempranas del desarrollo ovárico, la cual produce principalmente andrógenos. Se ha planteado que durante el desarrollo normal, la producción temprana de hormonas esteroides sexuales es independiente del control hipofisiario debido a que el eje hipotálamo-hipófisis-gónada en los roedores se establece a los 35 dpp (Frawley y Henricks, 1979). Sin embargo, recientemente O'Shaughnessy y colaboradores (1997)

demostraron que durante el desarrollo temprano del ovario de ratón, los niveles del mRNA del receptor a la FSH y la LH son independientes a la presencia de gonadotropinas.

En esta investigación se observó que en los ovarios XX, comparado con el grupo control, el IGF-I inhibe la producción de T a los 12 dpp (periodo juvenil). El efecto negativo del IGF-I sugiere que los mecanismos que controlan la producción de hormonas sexuales en esta etapa podrían ser diferentes o que haya uno o varios factores que inhiban al IGF-I. La ausencia de efecto (positivo o negativo) observada de la síntesis de T en la mayoría de las etapas analizadas podría deberse a la presencia de otras moléculas que regulan al IGF-I. Se sabe que durante la esteroidogénesis convergen otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que también regulan esta función. Éste se expresa en las células de la teca durante la vida postnatal y se ha visto que tiene un efecto inhibitorio en la producción de hormonas esteroides *in vitro* (Lobb y Dorrington, 1989). También se ha observado que el producto del gen *Ob* llamado leptina, la cual es secretada en los adipocitos, requerida para la fertilidad en el ratón, inhibe del 30 al 50% el efecto sinérgico del IGF-I/FSH en las células de la granulosa (Zachow y Magoffin, 1997). Por otro lado, en estudios recientes realizados *in vitro* en testículos fetales de rata se vio que el efecto del IGF-I únicamente se podía medir después de cinco días de cultivo (Rouiller-Fabre y col., 1998), aunque el posible mecanismo debe ser investigado. Otro factor que pudiera estar influyendo sobre la síntesis de andrógenos podría deberse a la concentración, ya que sólo se evaluó la dosis 10 ng/ml de IGF-I y no se experimentó con una concentración más elevada. Experimentos realizados en folículos aislados de ratas de 26 dpp cultivados con 30 ng/ml IGF-I, en presencia de FSH, aumentaron los niveles de  $E_2$  (Zachow y Magoffin, 1997). En otros trabajos se emplearon dosis de 50 ng/ml (Rouiller-Fabre y col., 1998) donde no se observó efecto y de 100 ng/ml en el cual fue posible detectar mayor sinergismo (Villalpando y col., 2002, en prensa). También investigaciones realizadas principalmente en roedores (ratón) demostraron que en el ovario de estos animales se expresan diferentes mRNA, así como diversas especies de proteínas maduras del IGF-I (Villalpando-Fierro y col., 1996; Rouiller-Fabre y col., 1998). Es probable que la biosíntesis de esteroides *in vitro* pueda ser regulada por dos o más isoformas del IGF-I que difieran en estructura y función; sin embargo, estas funciones deben ser determinadas. Además, experimentos realizados *in vitro* en folículos preantrales de 11 dpp en el ratón demostraron que la secreción de esteroides es también controlado por GH y por la activina A (hormona estimulante de la actividad de la FSH) (Liu y col., 1998). Estos autores no observaron ningún efecto del IGF-I administrado

solo a los folículos ováricos. Por lo tanto, tampoco se descarta la posibilidad de que, entre otras moléculas, la activina sinergice con las gonadotropinas activando esta vía en el mecanismo de control hormonal.

También se encontró que la FSH incrementa la producción de T en los ovarios XX, en particular a los 14 dpp. Si las células de la granulosa son las únicas que pueden ser estimuladas por la FSH, ¿Cómo es que las células de la teca responden a esta hormona sintetizando T?. En estudios previos se ha observado que la FSH tiene en general un efecto estimulador en la síntesis de andrógenos en etapas tempranas de la foliculogénesis en células de la teca (Villalpando y col., 1993). Se ha planteado que la FSH promueve la síntesis y mantenimiento de sus propios receptores y que su presencia es necesaria para inducir la formación de receptores a la LH (Richards, 1980). Otra posible explicación sería que la hormona (FOLLIGON) no esté completamente pura y una pequeña cantidad de contaminación con LH podría haber estimulado al compartimiento tecal. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que en este trabajo la hormona FSH se haya unido a las células foliculares, induciendo proliferación y diferenciación, así como la aromatización de los compuestos androgénicos (biosíntesis de estrógenos). Aunque en esta investigación no se evaluó conjuntamente la producción de E<sub>2</sub>, estudios previos realizados a los 20 dpp en células foliculares y tecales aisladas en la cepa control *Mus musculus musculus* demostraron que en estas fases, el IGF-I en presencia de FSH incrementa tres veces la producción de E<sub>2</sub> (Villalpando y Granados, datos sin publicar).

En cuanto a la acción del IGF-I y FSH en la producción de T en los ovarios XX de los 10 a los 16 dpp, se observó un efecto sumatorio. Estos datos están de acuerdo con estudios realizados *in vitro* en células de la teca y de la granulosa en diferentes especies de mamíferos en donde se demostró sinergismo entre el IGF-I y la FSH en ovarios en etapas adultas (Frawley y Henricks, 1979; Gooneratne y col., 1990; Hernández y col., 1988; Magoffin y col., 1990; Urban y col., 1990; Sahaw y col., 1993). El efecto sinérgico del IGF-I parece ser mediado a través de la interacción de este factor con el DNA, induciendo la síntesis de mRNA de enzimas que participan en la biosíntesis de enzimas claves del metabolismo de esteroides (Rouiller-Fabré y col., 1998; Villalpando y col., en prensa). Investigaciones hechas en células aisladas de folículos de 20 dpp, en los cuales se emplearon inhibidores de la actividad de la enzima P450<sub>AROM</sub> y de la P450<sub>17 $\alpha$</sub> , así como inhibidores de la síntesis de RNA plantean que, después de cinco días de cultivo, el IGF-I incrementa la expresión del mRNA y la síntesis de las enzimas empleadas en la producción

de P<sub>4</sub>, T y E<sub>2</sub> (Villalpando y col., 2002, datos sin publicar). Asimismo, el efecto del IGF-I en diversas líneas celulares (3T3 y P6) arroja resultados diferentes: el IGF-I sólo en células 3T3 no tiene ningún efecto a menos que se adicione el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); mientras que en células P6 responde al factor de crecimiento epidermal (EGF) y PDGF. La presencia de un nucleótido antisentido contra el receptor del IGF-I también inhibe al EGF. Estas observaciones plantean que el IGF-I necesita sinergizar, en ausencia de FSH, con otros factores que se producen en las células somáticas para regular la producción de esteroides gonadales (Baserga, 1993).

Los resultados de esta investigación indican que los ovarios XY en etapas tempranas de la foliculogénesis no poseen la misma capacidad para sintetizar el esteroide sexual T y alcanzar los niveles encontrados en la cepa control (*Mus musculus musculus*). Aparentemente esta respuesta no se debe a una deficiencia en el número de receptores a FSH. Estudios de autorradiografía realizados para identificar a los receptores a FSH, no detectaron diferencias en el número de receptores a esta gonadotropina entre ovarios XX y XY (Amhle y col., 2000). Tampoco se ha encontrado una mayor cantidad de *Sry* en etapas de desarrollo temprano (Lee y Taketo, 2001), lo cual podría explicar la producción anormal de esteroides. El desarrollo endocrino anormal de las hembras XY probablemente se debe a defectos intrínsecos del ovario XY, aunque los mecanismos deben ser aún determinados. Curiosamente, la FSH induce la secreción de moléculas localizadas en la teca interna y células intersticiales (Ben-Or, 1963). Este autor observó que en los ovarios de 18 dpp, después de 24 horas de cultivo, la FSH provoca la hipertrofia de las células de la teca.

Finalmente, aunque en el ovario de los roedores convergen diferentes factores que regulan la actividad endocrinológica de este órgano y por consiguiente su fertilidad, podemos concluir que el IGF-I tiene un papel dual ya que estimula e inhibe la producción de testosterona en fases tempranas de la foliculogénesis en el ovario del ratón B6.Y<sup>TIR</sup>. Queda por determinar el papel del IGF-I en el crecimiento y desarrollo de los folículos primordiales, así como el mecanismo empleado en la sinergización de éste con gonadotropinas.

## **CONCLUSION**

**El IGF-I tiene un efecto dual ya que inhibe la biosíntesis de T y, en presencia de FSH, estimula en fases tempranas del desarrollo ovárico en el ratón.**



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adamo ML, Neuenschwauder S, Le Roith D, Roberts CT Jr. 1994. Structure, expression and regulation of the IGF-I gene. En *Current directions in insulin-like growth factor research*. Le Roith D y Raizada MK (eds). Plenum Press, New York.
2. Adashi EY, Resnick CE, Brodie AM, Svoboda ME, Van Wyk JJ. 1985b. Somatomedin-C-mediated potentiation of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 117: 2313-2320.
3. Adashi EY, Resnick CE, D'Ercole AJ, Svoboda ME, Van Wyk JJ. 1985c. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev* 6: 400-420.
4. Adashi EY, Resnick CE, Payne DW, Rosenfeld RG, Matsumoto T, Hunter MK, Gargosky SE, Zhou J, Bondy CA. 1997. The mouse intraovarian insulin-like growth factor I system: departures from rat paradigm. *Endocrinology* 138 :3881-3890.
5. Adashi EY, Resnick CE, Svoboda ME, Van Wyk JJ. 1986. Somatomedin-C as an amplifier of follicle-stimulating hormone action: enhanced accumulation of adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 118:149-155.
6. Adashi EY, Resnick CE, Svoboda ME, Van Wyk JJ. 1985a. Somatomedin-C synergizes with follicle-stimulating hormone in the acquisition of progesterin biosynthetic capacity by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 116: 2135-2142.
7. Adashi EY, Resnick CE, Svoboda ME, Van Wyk JJ. 1985d. Somatomedin-C synergizes with follicle-stimulating hormone in the acquisition of progesterin biosynthetic capacity by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 116: 2135-2142.
8. Amleh A, Smith L, Chen HY, Taketo T. 2000. Both nuclear and cytoplasmic components are defective in oocytes of B6.Y<sup>TIR</sup> sex reversed female mouse. *Dev Biol* 219: 277-286.
9. Amleh A, Ledee N, Saeed J, Taketo T. 1996. Competence of oocytes from the B6.YDOM sex-reversed female mouse for maturation, fertilization, and embryonic development in vitro. *Dev Biol* 178: 263-275.
10. Anderson E, Wilkinson RF, Lee G, Meller S. 1978. A correlative microscopical analysis of differentiating ovarian follicles of mammals. *J Morphol* 156: 339-366.
11. Armstrong JF, Pritchard-Jones K, Bickmore WA, Hastie ND, Bard JB. 1993. The expression of the Wilms' tumor gene, WT-1, in the developing mammalian embryo.

- Mech Dev 40: 85-97. Citado en Nordqvist K. 1995. Sex differentiation – gonadogenesis and genes. *Int J Dev Biol* 39: 727-736.
12. Baird T. 1982. The ovary. En *Reproduction in mammals. Hormonal control of reproduction. Book 3.* Austin CR y Short RV (ed). Segunda edición, Cambridge University Press. US.
  13. Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Florida G, Worley KC, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McCabe ER, Fraccaro M, Zuffardi O, Camerino G. 1994. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet* 7, 497-501.
  14. Baserga R. 1993. Gene regulation by IGF-I. *Mol Reprod Dev* 35:353-357
  15. Ben-Or S. 1963. Morphological and functional development of the ovary of the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 11:1-11.
  16. Buehr M. 1997. The primordial germ cells of mammals: some current perspectives.
  17. Cara JF, Rosenfield RL. 1988. Insulin-like growth factor I and insulin potentiate luteinizing hormone-induced androgen synthesis by rat ovarian thecal-interstitial cells. *Endocrinology* 123:733-739.
  18. Cohick WS, Clemmons DR. 1993. The Insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 55:131-153.
  19. Daughaday WH, Rotwein PS. 1989. Insulin-like growth factors I y II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocr Rev* 10:68-91.
  20. Domínguez R, Chávez R, Cruz ME. 1991. La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En *Tópicos selectos de biología de la reproducción, Cap 7.* Coord. R. Domínguez. Programa Universitario de Investigación en Salud de la Coordinación de Investigación Científica, UNAM y Grupo Editorial Porrúa, México. Pag 161-192.
  21. Duke KL. 1978. Nonfollicular ovarian components. En *The vertebrate ovary, Cap 16.* Jones RE (ed), Plewnum Publishing Corp. Pag 563-582.
  22. Eckert R, Randal D y Augustine G. 1990. Mensajeros químicos y reguladores. En *Fisiología animal. Mecanismos y adaptaciones, Cap. 9.* Interamerican McGraw-Hill. España. Pag 266-328.
  23. Eicher EM, Washburn LL. 1983. Inherited sex reversal in mice: Identification of a new primary sex-determining gene. *J Exp Zool* 228 :297-304.

24. Eicher EM, Washburn LL. 2001. Does one gene determine whether a C57BL/6J-Y(POS) mouse will develop as a female or as an hermaphrodite?. *J Exp Zool* 290 :322-326.
25. Eicher EM, Shown EP, Washburn LL. 1995. Sex reversal in C57BL/6J-Y<sup>POS</sup> mice corrected by a Sry transgene. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 350 :263-268.
26. Eicher EM, Washburn LL, Schork NJ, Lee BK, Shown EP, Xu X, Dredge RD, Pringle MJ, Page DC. 1996. Sex-determining genes on mouse autosomes identified by linkage analysis of C57BL/6J-YPOS sex reversal. *Nat Genet* 14:206-209.
27. Eicher EM, Washburn LL, Whitney JB 3rd, Morrow KE. 1982. Mus poschiavinus Y chromosome in the C57BL/6J murine genome causes sex reversal. *Science* 217:535-537.
28. Eicher EM, Washburn LL. 1986. Genetic control of primary sex determination in mice. *Annu Rev Genet* 20: 327-360.
29. Eicher EM, Washburn LL. 1986. Genetic control of primary sex determination in mice. *Annu Rev Genet* 20:327-60
30. Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C. 1985. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocr Rev* 6:371-399.
31. Franchimont P, Verstraelen-Proyard J, Hazee-Hagelstein MT, Renard C, Demoulin A, Bourguignon JP, Hustin J. 1979. Inhibin: from concept to reality. *Vitam Horm* 37: 243-302.
32. Frawley LS, Henricks DM. 1979. Mode of gonadotropin secretion in infantile female rats and the role of estrogen in feedback regulation. *Endocrinology* 105: 1064-1072.
33. Gilbert SF. 1998. Sex determination. En *Developmental Biology*, Cap. 20. Sinaver Associates Inc Publishers, USA. Pag 773-804.
34. Giudice LC. 1992. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocr Rev* 13:641-669.
35. Gooneratne AD, Thacker PA, Laarveld B, Murphy BD, Rajkumar K. 1990. Comparative effects of insulin and insulin-like growth factor-1 on follicle-stimulating hormone-induced responses in porcine granulosa cells. *Steroids* 55:105-108.
36. Gorbman A, Bern H. 1962. Steroid hormones and steroidogenesis. En *A textbook of comparative endocrinology*. Wileg J and SMS Inc. New York USA. Pag 230-246.
37. Gore-Langton RE, Armstrong DT. 1988. Follicular steroidogenesis and its control. En *Physiology of reproduction*, Cap 11. Knobil E, Neil JD, Edwing LL, Greenwald GS,

Markert CL and Pfaff DW (eds). Raven Press De, New York. Pag 571-615.

38. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346: 245-250.
39. Hammond JM, Mondschein JS, Samaras SE, Canning SF. 1991. The ovarian insulin-like growth factors, a local amplification mechanism for steroidogenesis and hormone action. *Steroid Biochem Mol Biol* 40: 411-416.
40. Hernández ER, Resnick CE, Svoboda ME, Van Wyk JJ, Payne DW, Adashi EY. 1988. Somatomedin-C/insulin-like growth factor-I (Sm-C/IGF-I) as an enhancer of androgen biosynthesis by cultured rat ovarian cells. *Endocrinology* 122:1603-1612.
41. Hinshelwood MM, Demeter-Arlotto M, Means GD, Simpson ER. 1993. Molecular Biology of genes encoding steroidogenic enzymes in the ovary. En *The ovary*, Cap. 9. Adashi EY and Leung CK (ed). Raven Press Inc. New York. Pag 165-183.
42. Hisaw FL. 1947. Development of the Graafian follicle and ovulation. *Physiol Rev* 27:95-119. Citado en Ireland JJ. 1987. Control of follicular growth and development. *J Reprod Fert* 34: 39-54.
43. Hovmoller ML, Osuna A, Eklof O, Fredga K, Hjerpe A, Linsten J, Ritzen M, Stanescu V, Svenningsen N. 1977. Camptomelic dwarfism. A genetically determined mesenchymal disorder combined with sex reversal. *Hereditas* 86 :51-62.
44. Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA, Parker KL. 1994. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol* 8: 654-662.
45. Ireland JJ. 1987. Control of follicular growth and development. *J Reprod Fertl Suppl* 34: 39-54.
46. Jäger RJ, Anvret M, Hall K, Scherer G. 1990. A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature* 348: 452-454.
47. Jeske YW, Mishina Y, Cohen DR, Behringer RR, Koopman P. 1996. Analysis of the role of Amh and Fra1 in the Sry regulatory pathway. *Mol Reprod Dev* 44:153-158.
48. Jones JI, Clemmons DR. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16:3-34.
49. Kofman-Alfaro-Alfaro S, Merchant-Larios H, Perez-Palacios G. 1982. Diferenciación sexual. I. Bases biológicas del dimorfismo sexual. *Rev Invest Clin* 34: 349-359.

50. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351: 117-121.
51. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. 1993. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74: 679-691.
52. Lee CH, Taketo T. 1994. Normal onset, but prolonged expression of Sry gene, in the B6.Y<sup>DOM</sup> sex-reversed mouse gonad. *Dev Biol* 165: 442-452.
53. Lee CH, Taketo T. 2001. Low levels of Sry transcripts cannot be the sole cause of B6-Y(TIR) sex reversal. *Genesis* 30:7-11.
54. Liu X, Andoh K, Yokota H, Kobayashi J, Abe Y, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y. 1998. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology* 139:2342-2347.
55. Lobb DK, Dorrington JH. 1989. Bovine theca cells secrete transforming growth factor alfa and beta. *En Growth factors and the ovary*. Anne N Hirshfield (ed). Plenum Press, NY.
56. Lou X, Ikeda Y, Parker K. 1994. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77: 481-490.
57. Lu K, Campisi J. 1992. Ras proteins are essential and selective for the action of Insulin-like growth factor I late in the G1 phase of the cell cycle in BALB/c murine fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3889-3893.
58. Lui JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75:59-72.
59. Macaulay VM. 1992. Insulin-like growth factors and cancer. *Br J Cancer* 65: 311-320.
60. Magoffin DA, Kurtz KM, Erickson GF. 1990. Insulin-like growth factor-I selectively cholesterol side-chain cleavage expression in ovarian theca-interstitial cells. *Mol Endocrinol* 4: 489-496.
61. Makabe S, Naguro T, Nottola A, Nottola SA, Pereda J, Motta PM. 1991. Migration of germ cells, development of the ovary and folliculogenesis. *En Ultrastructure of ovary*, Cap 1. G, Makabe S and Motta PM (eds), Kluwer Academic Publishers, USA. Pag 1-27.
62. Marmolejo-Valencia A, Nishioka Y, Moreno-Mendoza N, Merchant-Larios H. 1999. Fertility of Y(TIR).B6 sex-reversal females with XX orthotopic ovarian transplants. *Biol Reprod* 61: 1426-1430.

63. Merchant-Larios H. 1979. Follicular atresia and the formation of an interstitial gland. *Eur J Obstet Gyn Reprod Biol* 9:219.
64. Merchant H. 1991. Gametogénesis. En *Tópicos selectos de biología de la reproducción*, Cap 1. Coord. R. Domínguez. Programa Universitario de Investigación en Salud de la Coordinación de Investigación Científica, UNAM y Grupo Editorial Porrúa, México. Pag 11-39.
65. Merchant-Larios H, Chimal-Monroy J. 1989. The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. *Prog Clin Biol Res* 296: 55-63.
66. Merchant-Larios H, Clarke HJ, Taketo T. 1994. Developmental arrest of fertilized eggs from the B6.YDOM sex-reversed female mouse. *Dev Genet* 15: 435-442.
67. Merchant-Larios H, Lobato L, Centeno B. 1982. Ontogenesis of steroidogenic interstitial tissue in the ovary: A histochemical approach. *Biol Reprod (Suppl 1)* 26:175.
68. Merchant-Larios H, Taketo T. 1991. Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. *J Electron Microscop Tech* 19: 158-171.
69. Merriman HL, La Tour D, Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ, Strong DD. 1990. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II induce c-fos in mouse osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int* 46: 258-262.
70. Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R. 1996. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet* 14: 62-68
71. Mossman HW, Duke KL. 1973. Features and problems associated with the mammalian ovary. In *Comparative morphology of mammalian ovary*, Cap 7. University of Wisconsin Press, Madison. Citado en Duke KL. 1978. Nonfollicular ovarian components. En *The vertebrate ovary*, Cap 16.. Jones RE (ed). Plenum Publishing Corp. Pag 563-582.
72. Muta K, Krantz SB. 1993. Apoptosis of human erythroid colony-forming cells is decreased by stem cell factor and insulin-like growth factor I as well as erythropoietin. *J Cell Physiol* 156: 264-271.
73. Nagamine CM, Morohashi K, Carlisle C, Chang DK. 1999. Sex reversal caused by *Mus musculus* domestic Y chromosomes linked to variant expression of the testis-determining gene *Sry*. *Dev Biol* 216: 182-194.
74. Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O. 1993. The P450 superfamily: update

on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. DNA Cell Biol 12: 1-5.

75. Nissley Y, Lopaczynski W. 1991. Insulin-like growth factor receptors. Growth factors 5:29-43.
76. Nordqvist K. 1995. Sex differentiation – gonadogenesis and novel genes. Int J Dev Biol 39:727-736.
77. O'Shaughnessy PJ, McLelland D, McBride MW. 1997. Regulation of luteinizing hormone-receptor and follicle-stimulating hormone-receptor messenger ribonucleic acid levels during development in the neonatal mouse ovary. Biol Reprod 57: 602-608.
78. Palmer SJ, Burgoyne PS. 1991. The *Mus musculus domesticus* Tdy allele acts later than the *Mus musculus musculus* Tdy allele: The *Mus musculus domesticus* Tdy allele acts later than the *Mus musculus musculus* Tdy allele: a basis for XY sex-reversal in C57BL/6-YPOS mice. Development 113:709-714.
79. Parker KL, Schimmer BP. 1997. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. Endocr Rev 18: 361-377.
80. Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, Mauer SM, Manivel JC, Striegel JE, Houghton DC, Junien C, Habib R, Fouser L, Fine R, Silverman B, Haber D, Housman D. 1991. Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. Cell 67: 437-447.
81. Peters H. 1969. The development of the mouse ovary from birth to maturity. Acta Endocrinol 62:98-116.
82. Peters H. 1978. Folliculogenesis in mammals. En The vertebrate ovary, Cap 4. Jones RE (ed). Plenum Publishing Corp. Pag 121-144.
83. Pierce JG, Parsons TF. 1981. Glycoprotein hormones: structure and function.. Annu Rev Biochem 50: 50:465-495.
84. Pontiggia A, Rimini R, Harley VR, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME. 1994. Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. EMBO J 13: 6115-6124.
85. Raymond CS, Kettlewell JR, Hirsch B, Bardwell VJ, Zarkower D. 1999. Expression of Dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. Dev Biol 215: 208-220.
86. Raymond CS, Shamu CE, Shen MM, Seifert KJ, Hirsch B, Hodgkin J, Zarkower D. 1998. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. Nature 391:

691-695.

87. Richards JS, Jahansen T, Hedin L, Lifka J, Ratoosh S, Durica JM, Goldring NB. 1987. Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology. *Recent Prog Horm Res* 43 :231-276.
88. Richards JS. 1980. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev* 60:51-89.
89. Rinderknecht E, Humbel RE. 1978a. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor-I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253: 2769-2776
90. Rinderknecht E, Humbel RE. 1978b. The primary structure of human insulin-like growth factor-II. *FEBS Lett* 89:283-286. Cited in Giudice LC. 1992. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocr Rev.* 13:641-669.
91. Rouiller-Fabre V, Lecref L, Gautier C, Saez JM, Habert R. 1998. Expression and effect of insulin-like growth factor I on rat fetal Leydig cell function and differentiation. *Endocrinology* 139: 2926-2934
92. Sara VR, Hall K. 1990. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev* 70:591-614.
93. Shaw HJ, Boddy SE, Hodges JK. 1993. Developmental changes in marmoset granulosa cell responsiveness to insulin-like growth factor-I: interactions with follicle-stimulating hormone and estradiol. *Biol Reprod* 49: 568-576.
94. Shen WH, Moore CC, Ikeda Y, Parker KL, Ingraham HA. 1994. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* 77: 651-661.
95. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischau AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244.
96. Sklar MM, Kiess W, Thomas CL, Nissley SP. 1989. Developmental expression of the tissue insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor in the rat. Measurement by quantitative immunoblotting. *J Biol Chem* 264:16733-16738.
97. Stewart M, Stewart F. 1977. Constant and variable regions in glycoprotein hormone beta subunit sequences: implications for receptor binding specificity. *J Mol Biol*



98. Swain A, Zanaria E, Hacker A, Lovell-Badge R, Camerino G. 1996. Mouse *Dax1* expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function. *Nature Genet* 12: 404-409.
99. Taketo T, Saeed J, Nishioka Y, Donahoe PK. 1991. Delay of testicular differentiation in the B6.YDOM ovotestis demonstrated by immunocytochemical staining for müllerian inhibiting substance. *Dev Biol* 146: 386-395.
100. Taketo-Hosotani T, Nishioka Y, Nagamine CM, Villalpando I, Merchant-Larios H. 1989. Development and fertility of ovaries in the B6.YDOM sex-reversed female mouse. *Development* 107:95-105.
101. Urban RJ, Garmey JC, Shupnik MA, Veldhuis JD.. 1990. Insulin-like growth factor type I increases concentrations of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme in primary cultures of porcine granulosa cells. *Endocrinology* 127: 2481-2488.
102. Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. 1999. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397: 405-409.
103. Veitia R, Nunes M, Brauner R, Doco-Fenzy M, Joanny-Flinois O, Jaubert F, Lortat-Jacob S, Fellous M, McElreavey K. 1997. Deletions of distal 9p associated with 46,XY male to female sex reversal: definition of the breakpoints at 9p23.3-p24.1. *Genomics* 41: 271-274.
104. Veldhuis JD, Nestler JE, Strauss JF 3rd. 1987. The insulin-like growth factor, somatomedin-C, modulates low density lipoprotein metabolism by swine granulosa cells. *Endocrinology* 121: 340-346.
105. Veldhuis JD, Rodgers RJ, Dee A, Simpson ER. 1986. The insulin-like growth factor, somatomedin C, induces the synthesis of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 and adrenodoxin in ovarian cells. *J Biol Chem* 261:2499-2502.
106. Veldhuis JD, Rodgers RJ. 1987. Mechanisms subserving the steroidogenic synergism between follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor I (somatomedin C). Alterations in cellular sterol metabolism in swine granulosa cells. *J Biol Chem* 262:7658-7664.
107. Veldhuis JD, Strauss JF 3rd, Silavin SL, Kolp LA. 1985. The role of cholesterol esterification in ovarian steroidogenesis: studies in cultured swine granulosa cells using

- a novel inhibitor of acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase. *Endocrinology* 116:25-30.
108. Villalpando I, Nishioka Y, Taketo T. 1993. Endocrine differentiation of the XY sex-reversed mouse ovary during postnatal development. *J Steroid Biochem Mol Biol* 45: 265-273.
  109. Villalpando-Fierro I, Villafan-Monroy H, Pacheco P. 1996. Delayed expression of the insulin-like growth factor I (IGF-I) gene in the XY sex-reversed female mouse ovary. *Int J Dev Biol* 40: 477-482.
  110. Werner H, Woloschak M, Staumard B, Shen-Orr Z, Roberts CT Jr, Le Roith D. 1991. The Insulin-like growth factor I receptor: molecular biology, heterogeneity and regulation. En *Insulin-like growth factors: molecular and cellular aspects*. Le Roith 8th ed. CRC Press. Boca Raton. Pag 17-47.
  111. Zachow RJ, Magoffin DA. 1997. Direct intraovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 beta production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 138: 847-850.
  112. Zapf J, Froesch ER. 1986. Insulin-like growth factors/Somatomedins: Structure, secretion, biological actions and physiological role. *Horm Res* 24:121-130.

## APÉNDICE

### Agua tratada con di-etilpirocarbonato (DEPC)

Se empleó agua libre de patógenos, para lo cual se trató de la siguiente manera: por cada litro de agua bidestilada se añade 1 ml de DEPC (SIGMA), se deja en agitación constante hasta que se haya disuelto completamente. Después de 24 horas se esteriliza en autoclave 120 lb/p<sup>2</sup> por 80 minutos para desactivar el DEPC y se filtra con filtro Millipore de 0.22 µm de diámetro de poro. Conservar a temperatura ambiente.

### Amortiguador de carga

Azul de Bromofenol (BIORAD)	0.12ml
Glicerol (SIGMA)	30 ml
◆ Amortiguador TE 1X, pH 8.0	69.88 ml

Conservar a -20 °C hasta antes de su uso.

### Amortiguador SET

◆ Ácido etilen-diamino-tetracético (EDTA) (SIGMA) 0.5 M, pH 8.0	10 ml
◆ TRIS-HCl (SIGMA) 0.5 M	2 ml

Aforar con agua bidestilada estéril a 100 ml y filtrar con filtro Millipore de 0.22 µm de diámetro de poro. Conservar a 4 °C hasta antes de su uso.

### Amortiguador TBE 1X, pH 8.0

◆ TRIS-HCl (SIGMA)	10.8 g
◆ Acido bórico (J. T. BAKER)	5.5 g
◆ EDTA (SIGMA)	0.93 g

Aforar con agua bidestilada a un litro. Conservar a temperatura ambiente,

### Amortiguador TE 1X, pH 8.0

◆ TRIS-HCl (SIGMA)	12.11 g
◆ EDTA (SIGMA)	37.22 mg

Agregar 80 ml de agua bidestilada, ajustar pH 8.0 con HCl concentrado y aforar a 100 ml. Conservar a temperatura ambiente.

#### Medio de cultivo básico (pH 7.2-7.4)

◆ Medio 199 con sales Earle, L-glutamina, sin bicarbonato de sodio y amortiguador HEPES 25 mM (IN VITRO)	100 ml
◆ Piruvato de sodio (SIGMA) 11 mg/ml	1 ml
◆ Penicilina G sódica 10 000 U/ml con sulfato de estreptomicina 10 mg/ml (SIGMA)	0.5 ml
◆ Bicarbonato de sodio (J. T. BAKER) 7.5%	2.9 ml
◆ HEPES (SIGMA) 2 M	1.25 ml
◆ L-glutamina (GIBCO-BRL) 200 mM	1 ml

Preparar el medio bajo una campana de flujo laminar y conservar a 4 °C hasta poco antes de su uso.

#### Medios de cultivo experimentales

##### Medio de cultivo experimental A, control:

◆ Medio de cultivo básico	10 ml
◆ Progesterona (SIGMA) en etanol absoluto (SIGMA) 1 mg/ml	10 µl

##### Medio de cultivo experimental B, suplementado con IGF-I:

◆ Medio de cultivo básico	10 ml
◆ Progesterona (SIGMA) en etanol absoluto (SIGMA) 1 mg/ml	10 µl
◆ IGF-I recombinante (SIGMA) 5 ng/µl	20 µl

##### Medio de cultivo experimental C, suplementado con FSH:

◆ Medio de cultivo básico	10 ml
◆ Progesterona (SIGMA) en etanol absoluto (SIGMA) 1 mg/ml	10 µl
◆ FSH (FOLLIGON de INTERVET)	1000 UI

Medio de cultivo experimental E, suplementado con FSH/IGF-I:

- ◆ Medio de cultivo básico 10ml
- ◆ Progesterona (SIGMA) en etanol absoluto (SIGMA) 1 mg/ml 10µl
- ◆ FSH (FOLLIGON de INTERVET) 1000 UI
- ◆ IGF-I recombinante (GIBCO-BRL) 5 ng/µl 20 µl

Preparar los medios de cultivo experimentales poco antes de su uso bajo una campana de flujo laminar y filtrar con filtro Millipore de 0.22 µm de diámetro de poro.

**Mezcla de dNTP's (Deoxynucleoside Triphosphate Set de BOEHRINGER MANNHEIM)**

- ◆ dATP 25 µmol 10µl
- ◆ dCTP 25 µmol 10µl
- ◆ dGTP 25 µmol 10µl
- ◆ dTTP 25 µmol 10µl
- ◆ Agua tratada con DEPC 60µl

Conservar a -20 °C hasta antes de su uso.

**Mezcla maestra**

- ◆ Oligonucleótido Sry K1 (GIBCO-BRL) 40 pmol/µl 0.44 µl
- ◆ Oligonucleótido Sry K2 (GIBCO-BRL) 40 pmol/µl 0.46 µl
- ◆ Mezcla de dNTP's (BOEHRINGER MANNHEIM) 10 mM 1.5 µl
- ◆ MgCl<sub>2</sub> (PERKIN ELMER) 0.1 M 0.7µl
- ◆ TRIS-HCl (SIGMA) 1.0 M, pH 9.0 0.5 µl
- ◆ Albúmina sérica bovina (SIGMA) 8.5 mg/µl 0.2 µl
- ◆ NONIDET P-40 (SIGMA) 5% 0.1 µl
- ◆ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (J. T. BAKER) 3 M 0.5 µl
- ◆ Agua tratada con DEPC 3.06 µl
- ◆ Amplitaq DNA polimerasa (PERKIN ELMER) 5 U/µl 0.04 µl

Las cantidades de los reactivos para preparar la mezcla maestra son por muestra.

Preparar poco antes de su uso.

**Solución de bromuro de etidio**

- ◆ Bromuro de etidio (SIGMA) 10 mg/ml
- ◆ Agua bidestilada

**4  $\mu$ l**

**50 ml**

**Preparar poco antes de su uso**