



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PAPEL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR  
A LA INSULINA TIPO I (IGF-I) EN EL DESARROLLO  
TESTICULAR DEL RATÓN EN LA ETAPA  
EMBRIONARIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ANA LILIA GONZÁLEZ CRUZ



MEXICO D.F.



2005

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

m. 343124



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## JURADO

PRESIDENTE	SATURNINO DE LEON CHAPA
VOCAL	FERNANDO GARCIA TAMAYO
SECRETARIO	MA. IRMA VILLALPANDO FIERRO
1ER. SUPLENTE	RAQUEL ORTEGA MUÑOZ
2DO. SUPLENTE	JORGE FERNANDO PANIAGÜA SOLIS

Este trabajo de investigación se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas en el departamento de Biología y Fisiología Celular.



---

Dra. Ma. Irma Villalpando Fierro  
Asesora



---

Ana Lilia González Cruz  
Sustentante

*DEDICATORIA ESPECIAL A SAMUEL  
JOAQUÍN FLORES:*

POR SER MOTIVO, INSPIRACIÓN Y  
EJEMPLO EN MI VIDA PARA SER UN  
MEJOR SER HUMANO. DOY GRACIAS A  
DIOS POR HABERME PERMITIDO  
NACER EN ESTE TIEMPO Y ESPACIO  
MARAVILLOSO, EN EL CUAL LO HE  
CONOCIDO A USTED CON SUS  
CONSEJOS CONSTANTES Y A SU  
EJEMPLAR ESPOSA.

*A MIS PADRES:*  
POR AYUDARME A CRECER Y  
GUIARME A SER QUIEN SOY,  
POR SU GRAN CARÍO,  
ESTÍMULO Y APOYO EN  
TODO MOMENTO.

*A MIS HERMANOS OCTAVIO Y  
MIGUEL:*  
POR SER PARTE IMPORTANTE  
EN MI VIDA, AGRADECIENDO  
A DIOS POR TENER UNOS  
EXCELENTES HERMANOS  
COMO USTEDES,  
ESPERANDO QUE ESTO  
SEA UN ESTÍMULO PARA  
QUE JUNTOS SEAMOS  
MEJORES CADA DÍA.

*A JONATHAN, BRYAN Y  
ALICIA:*  
DESEO QUE ESTO SEA  
MOTIVACIÓN PARA USTEDES,  
LOS QUIERO.

*AMITIA ELVIA:*  
POR SIMPRE ESTAR AHÍ,  
VERDADERAMENTE LO  
VALORO.

*YATI:*  
POR MOSTRAR SIEMPRE TÚ  
AYUDA INCONDICIONAL Y  
APOYO. DOY GRACIAS A DIOS  
POR PONERTE EN MI CAMINO.

GRACIAS A LA DRA. VILLALPANDO.  
POR COMPARTIR TIEMPO Y APOYO  
PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA  
TESIS.

CON AGRADECIMIENTO A ERIKA  
FRANCO  
POR SU AYUDA EN LAS  
IMPRESIONES DE LAS REVISIONES  
DE ESTA TESIS Y POR TU VALIOSA  
AMISTAD.

AGRADEZCO AL INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
POR FACILITAR EQUIPO Y  
MATERIAL NECESARIO PARA LA  
REALIZACIÓN DE ESTA TESIS

# ÍNDICE

	PÀG
I. RESUMEN	3
II. INTRODUCCIÓN	
1. Desarrollo gonadal de los mamíferos	4
1.1 Cresta genital	4
1.2 Gónada indiferenciada	6
1.3 Diferenciación sexual	7
a) Ovario	7
b) Testículo	8
2. Genes de diferenciación sexual	9
a) Masculinizantes	10
b) Feminizantes	11
3. Ciclo celular	13
a) Etapas	13
b) Cinasas dependientes de ciclinas	17
4. Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I	20
a) Organización molecular	20
b) Proteínas de unión	22
5. Acciones biológicas del IGF-I	22
a) Participación en la producción de las hormonas sexuales	22
b) Papel en la diferenciación y proliferación celular	23
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
IV. HIPÓTESIS	26
V. OBJETIVO	27

	PÁG
VI. MATERIAL Y MÉTODO	
1. Reactivos químicos	28
1.1 Material	28
1.2 Animales	28
2. Aislamiento del testículo	28
2.1 Disgregación celular	29
2.2 Viabilidad celular	30
2.3 Cultivo	31
2.4 Incubación de células testiculares	32
2.5 Verificación del crecimiento celular	32
2.6 Inmunocitoquímica	32
2.7 Conteo de células marcadas con BrdU	33
2.8 Análisis estadístico	33
VII. RESULTADOS	34
1. Cultivo celular	34
2. Establecimiento de la dosis óptima del IGF-I	34
3. Inmunocitoquímica	36
4. Efecto de la concentración de IGF-I	37
VIII. DISCUSIÓN	38
IX. CONCLUSIONES	41
X. BIBLIOGRAFÍA	42



## I. RESUMEN

El factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I), es una proteína que es producida posnatalmente en diferentes órganos. Se ha observado que este factor estimula la proliferación y diferenciación celular de diversos tejidos. Así mismo, en la etapa adulta y la embrionaria *in vitro*, promueve la síntesis de esteroides sexuales. Sin embargo, prenatalmente no se ha investigado la función del IGF-I en la proliferación de células gonadales, ni en la diferenciación funcional de células de Leydig. El objetivo de este trabajo fue investigar el papel del IGF-I en la proliferación de las células somáticas en el testículo embrionario del ratón. Se utilizaron embriones de 12 días de gestación (d.g.) (inicio de la diferenciación), 14 d.g. (diferenciación sexual tardía) y 17 d.g. (etapa fetal) de la cepa CD1. Las hembras preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical, se aislaron los testículos de los embriones y se formaron grupos de 30-40 gónadas de las edades mencionadas. Las células se disgregaron con tripsina 0.1% en PBS y se cultivaron  $1 \times 10^5$  células en cajas Nuclon con 50, 75 y 100 ng/mL de IGF-I 24 horas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se colectaron las células y se marcaron con Bromodeoxyuridina (BrdU) y fueron incubadas por 1 hora a 37° C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente se realizó una inmunofluorescencia para detectar las células marcadas con BrdU. Los resultados fueron analizados con una prueba de Tukey, los cuales indican que en los grupos control (sin IGF-I) se observó 20% de células somáticas en proliferación. En los grupos experimentales, a los 12 d.g. no se observó ningún efecto en la proliferación celular testicular. A los 14 y a los 17 d.g. se detectó que hay un 30 % de incremento en la proliferación de las células testiculares con el IGF-I a una dosis de 100 ng/mL. Las diferencias fueron estadísticamente significativas a una  $p < 0.001$ , en cada grupo con respecto al control. Estos resultados sugieren que el IGF-I participa en el control y/o regulación de la proliferación del ciclo celular de las células somáticas y del crecimiento testicular del ratón durante el desarrollo embrionario.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Desarrollo gonadal de los mamíferos

La diferenciación gonadal en los mamíferos ocurre en la vida embrionaria; este proceso consta de tres etapas: a) establecimiento del sexo genético, b) diferenciación gonadal y c) desarrollo del sexo fenotípico. La primera fase se inicia con la fertilización en la que un ovocito X es fertilizado por un espermatozoide Y ó X, en la segunda se lleva a cabo la diferenciación morfológica y funcional del testículo y ovario, y en la última etapa se desarrollan las características sexuales secundarias de cada individuo de acuerdo a su sexo genético (XX ó XY). La etapa de interés en el presente estudio es la segunda etapa, la diferenciación sexual gonadal que ocurre durante el desarrollo embrionario. Desde 1959 se sabe que en el humano y en el ratón los individuos con una constitución cromosómica XX ó XO se diferencian como hembras, mientras que aquellos con un complemento cromosómico XY ó XXY se desarrollan como machos (Ford y cols., 1959; Jacobs y cols., 1959). El gen responsable de la diferenciación sexual y formación del testículo en el humano es denominado *SRY* y su homólogo en el ratón *Sry*. La expresión de este gen es muy corta solo se expresa de los 10.5 a los 12 d.g. en el ratón (Sinclair y cols., 1990).

#### 1.1 Cresta Genital

La diferenciación del testículo y del ovario se inicia con el establecimiento de la cresta genital (Fig. 1). Esta etapa se caracteriza principalmente por la proliferación de las células somáticas del epitelio celómico y de las células germinales primordiales (CGP's) (Merchant-Larios, 1978). En el ratón las CGP's, se encuentran originalmente en el epiblasto de la gástrula (Hahnel y cols., 1986) y pueden ser reconocidas en el endodermo extraembrionario del saco vitelino desde los 7 días poscoito (d.p.c.) (Ginburg y cols.,

1990). Las CGP's inicialmente son una población pequeña de células localizadas en la raíz del alantoides en formación (Chiquoine, 1954). Durante los siguientes cuatro días se lleva a cabo una migración (Tam y cols., 1981) hacia las crestas genitales (región donde se desarrollan el ovario ó el testículo), esta región está unida a la zona ventral del mesonefros. La migración de las CGP's se divide en dos etapas, la primera denominada fase pasiva ocurre a los 7.5-8.5 d.p.c., a esta edad las CGP's se mueven por acarreo del endodermo hacia el intestino posterior. Estas células son llevadas junto con el endodermo del intestino en un movimiento de reacomodo del intestino posterior y no presentan fenotipo de células migratorias. En contraste, en la fase activa (entre 9.5-11.5 d.p.c.), las CGPS se mueven a través del mesenterio dorsal hacia las crestas genitales mediante la extensión de filopodios o lamelipodios, implicando una relación estrecha entre ellas y las células sobre la cuales migran (Merchant-Larios 1978; Stott y Willie, 1986). La mayoría de las CGP's alcanzan la región urogenital en el día 11 después de la fertilización y se ha propuesto que en este periodo su número aumenta de 100 a 4000 aproximadamente. Una vez que las CGP's empiezan a llegar a la región urogenital aquí ya se encuentran con diferentes tipos de células somáticas de origen mesodérmico. Entre estas, se encuentran células mesoteliales, mesenquimáticas, mesonéfricas y endoteliales (Fig. 1). Los dos primeros tipos celulares son los que participan directamente en la formación de la gónada indiferenciada como células precursoras. En cambio las células mesonéfricas y endoteliales, son parte de tejido ya diferenciado (el mesonefros y el sistema circulatorio, respectivamente)(Merchant, 1978).

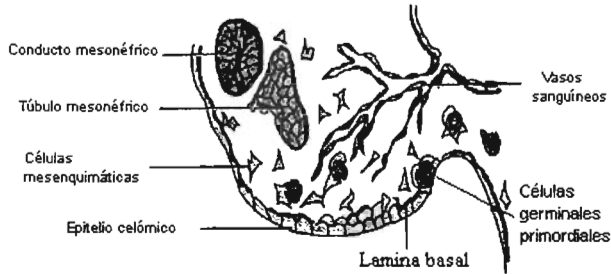


Fig. 1. Esquema que muestra la cresta genital. Nótese la formación de la lámina basal. Tomada de Merchant-Larios, 1993.

## 1.2 Gónada indiferenciada

En esta fase ocurre la condensación de las células de origen mesotelial y mesenquimático (Fig. 2A) para formar la gónada indiferenciada (Fig. 2B y 3). Esta es un órgano bilateral localizado en la región ventral del mesonefros. Se puede definir como la región anátomo-funcional a partir de la cual se diferencian las gónadas masculinas y femeninas. Esta etapa ocurre entre los 11 y 11.5 d.g. en el ratón y es común en hembras y machos, independientemente del sexo genético que posee cada individuo (Merchant-Larios, 1976).

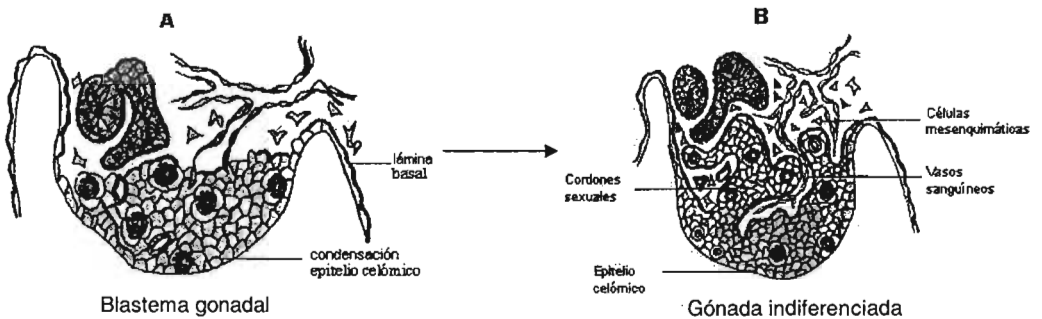


Fig. 2. En este esquema se indica la condensación de las células mesenquimáticas y mesoteliales (A) para formar la gónada indiferenciada (B). Tomada de Merchant-Larios, 1993.

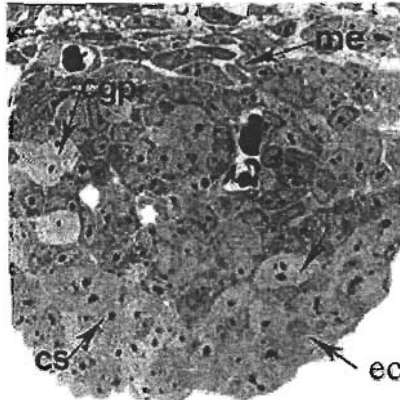


Fig. 3. Se muestra el corte transversal de una gónada indiferenciada de ratón a los 11 d.g., mesénquima (me), células primordiales germinales (cgp), cordones sexuales (cs), epitelio celómico (ec). Tomada de Villalpando, 2001.

### 1.3 Diferenciación sexual

#### a) Diferenciación sexual del ovario

Morfológicamente el ovario es parecido a la gónada indiferenciada (Fig. 4A), de manera que la presencia de la gónada femenina solo puede ser reconocida por la ausencia de características testiculares. El primer indicador funcional del desarrollo ovárico es el inicio de la meiosis de las células germinales, la cual ocurre en los 13.5 y los 15 d.p.c. en el caso del ratón y es variable entre las diferentes cepas de roedores (McLaren y Buehr, 1990). Después del comienzo de la meiosis, se inicia el proceso de formación de folículos. En la región central de la gónada (médula), los ovocitos que se encuentran rodeados por las células epiteliales (que darán origen a las células de granulosa). Posteriormente, estas células adquieren una forma cúbica formándose así los primeros folículos. Finalmente, los ovocitos de la región periférica de la gónada (corteza) son también individualizados por células epiteliales constituyendo la reserva de folículos primordiales.

A medida que estos crecen, se diferencian los siguientes tipos celulares a partir del tejido estromático adyacente: se forma primero la “teca interna” esteroidogénica, constituida por células mioides y fibroblastos. Rodeando a la teca interna, posteriormente se establece la “teca externa” formada por tejido conectivo fibroso, la cual esta irrigada por vasos sanguíneos que no atraviesan la lámina basal del folículo (Merchant-Larios, 1984).

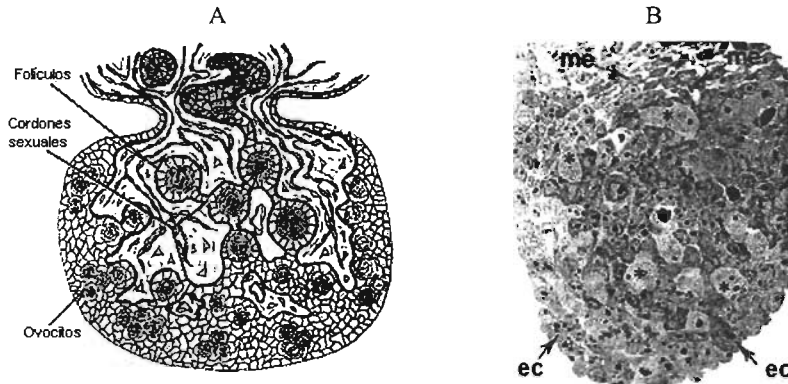


Fig. 4. A. Esquema que muestran la diferenciación del ovario. Tomada de Merchant-Larios 1993. B. Corte histológico en el que se observa epitelio celómico (ec) y mesénquima (me). Tomada de Villalpando, 2001.

#### b) Diferenciación sexual del testículo

Los primeros cambios morfológicos y funcionales ocurren en los individuos genéticamente machos (12 d.g.). Los cordones sexuales se separan gradualmente del epitelio celómico de la gónada debido a un mayor grado de compactación por parte de estos y a la invasión de tejido mesenquimático y de vasos sanguíneos provenientes de la región mesonéfrica (Merchant-Larios y Taketo, 1991). En la zona central de este órgano, los cordones son llamados “testiculares” (Fig. 5A y 5B) y posteriormente, cuando forman un lumen, son denominados “túbulos seminíferos” en estos, las células somáticas epiteliales o

pre-Sertoli y las células germinales están rodeadas por la lámina basal, la cual es producida en parte por las células epiteliales (Hardí y cols., 1989; 1990). El tejido estromático que envuelve a los túbulos seminíferos contiene a las células mioides, vasos sanguíneos, fibroblastos y células de Leydig (Merchant-Larios y Taketo, 1991).

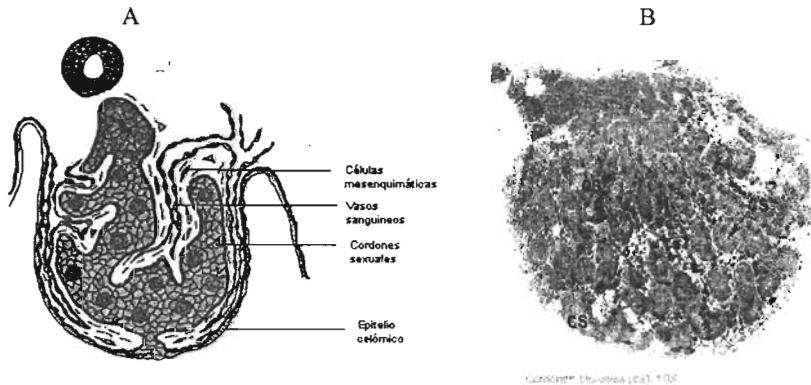


Fig. 5. (A) Diferenciación del testículo. La invasión de mesénquima y vasos sanguíneos separa a los cordones sexuales. Tomada de Merchant y cols., 1984. Merchant 1993. (B). Corte transversal de gónada de ratón de 12 d.g. Obsérvese los cordones testiculares (CS) distribuidos en la región central. Tomada de Villalpando, 2001.

## 2. Genes de diferenciación sexual

Muchos genes se han identificado por tener un papel importante en la formación temprana de las gónadas femeninas y masculinas (Tabla 1).

En la gónada indiferenciada, se conocen dos genes que cuyos productos intervienen de manera fundamental en su formación: a) El factor esteroideogénico, conocido como *SF-1/Sf-1* (Luo y cols., 1994; Ikeda y cols., 1994) y b) *WT-1/Wt-1* (Rackley, 1993; Kreidberg y cols., 1993) denotados por mayúsculas en el humano y minúsculas en otras especies. El *Sf-1* se detecta en la etapa de cresta genital de los 9-10 d.g. en ratones. El *SF-1* es un regulador

de la función de la actividad de la enzima  $17\alpha$ -hidroxilasa y por lo tanto de la regulación de hormonas sexuales. Existen otros genes los cuales se ha observado, intervienen en el desarrollo de la gónada indiferenciada como: *Lim1* (Shawlot y Behringer 1995), *Emx2* (Miyamoto y cols., 1997) y *Lhx 9* (Birk y cols., 2000).

a) Masculinizantes

El factor determinante de la diferenciación testicular denominado *SRY/Sry* (Fig. 6) humano y otras especies de vertebrados, respectivamente, se localiza en la región llamada pseudoautosomal, arriba del centrómero (brazo P) situado en el brazo corto del cromosoma “Y” en mamíferos (Koopman y cols., 1991; Gubbay y cols., 1990; Zwingman y cols., 1993).

Algunas investigaciones proponen que el *SRY* es el factor determinante de la diferenciación del testículo por lo siguiente: a) por su localización en el cromosoma “Y” y porque una sola copia es capaz de inducir la diferenciación testicular en el ratón (Gubbya y cols. 1990); b) Así mismo, por que algunas hembras “XY” con disgenesia gonadal presentan mutaciones *de novo* en el *SRY* (Berta y cols., 1990; Jäger y cols., 1990 y Koopman y cols., 1991); c) un fragmento de 14 kb en el cromosoma “Y” del ratón que incluye el gen *Sry* (homólogo al *SRY*) puede conducir al desarrollo masculino de hembras transgénicas (Koopman y col., 1991).



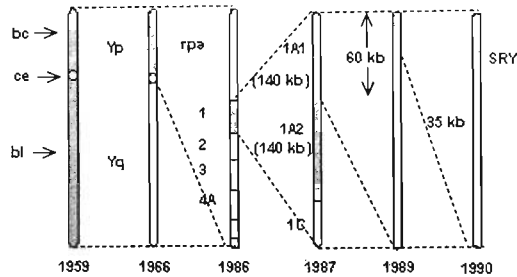


Fig. 6. Se observa el brazo corto (bc), el largo (bl) y el centrómero (ce) del cromosoma Y. Así como la región pseudoautosomal (rpa), donde se ubica al SRY y la longitud (3.5 Kb) que ocupa este gen. Tomado de McLaren, 1990.

Hay otros genes (Tabla 1) que se ha visto que intervienen en el desarrollo y diferenciación del testículo como: a) *Sox9* interviene en la diferenciación de las células de Sertoli y la iniciación del desarrollo testicular (Cameron 1996; Kent 1996). b) *Mis* participa en la regresión de los conductos de Müller y en la producción de hormonas sexuales (Josso y Picard 1986; Donahoe y cols 1987; Behringer 1990,1994; Munsterberg y Lovell-Badge 1991).c) *Dhh* promueve las interacciones entre las células de Sertoli-myoides, Sertoli-Leydig y el desarrollo de las células germinales masculinas (Bitgood y cols., 1996; Clark y cols., 2000). d) *Fgf9* interviene en la proliferación de las células del testículo (Colvin, 2001). e) *Dmrt1* participa en el mantenimiento de los túbulos seminíferos después del nacimiento (Raymond, 2000).

#### b) Feminizantes

A diferencia del testículo, el ovario de ratón es morfológicamente indistinguible de la gónada indiferenciada a los 11 d.g. debido a que la diferenciación sexual y fisiológica del ovario en esta especie ocurre entre los 15 y 17 d.g., cuando este inicia la meiosis. Uno de los genes que aparentemente participan en la diferenciación ovárica es el denominado Z cuya presencia fue postulada de acuerdo con el análisis de casos clínicos extremadamente raros, como es el de las hembras XY-SRY positivas y el de machos XX-SRY negativos. Se

postuló que la función del gen *Z* es la de inhibir la diferenciación testicular y estimular el desarrollo del ovario; sin embargo, la presencia de este gen es hipotética hasta el presente.

Estudios recientes demostraron que en el cromosoma 21 existe una región implicada en procesos de reversión sexual, que se conoce como DSS (Dosage Sensitive Sex Reversal)). El gen que parece ser un regulador importante de esta región es el *Wnt4* denominado así en el humano y en otras especies de vertebrados. Se plantea que este gen produce la feminización de la gónada indiferenciada por que aparentemente tiene una función antagonica al *Sry* (Vainio, 1999).

Otro gen que potencia el desarrollo de las gónadas femeninas, es el llamado *Dax1* (Swain y cols., 1998; Yu y cols., 1998), aunque su función no esta bien establecida.

**Tabla 1.** Genes involucrados en el desarrollo gonadal de mamíferos

GEN	FUNCIÓN	REFERENCIA
<i>Sf1</i>	Temprano establecimiento de las gónadas, regulador de genes para la producción de esteroides	Luo et al, 1994 Ikeda et al, 1994, 1996
<i>Wt1</i>	Temprano establecimiento de las gónadas e hígado, posible regulador de la expresión de <i>Sry</i>	Rakley 1993 Kriedberg et al 1993
<i>Lim1</i>	Temprano establecimiento de las gónadas	Shawlot and Behringer et al 1990
<i>Emx2</i>	Temprano establecimiento de las gónadas	Miyamoto et al 1997
<i>Lhx9</i>	Temprano establecimiento de las gónadas	Birk et al 2000
<i>Sox9</i>	Diferenciación de las células de Sertoli, Iniciación de desarrollo testicular	Cameron et al 1996 Kent et el 1996
<i>Mis</i>	Regresión de los conductos de Miuler	Josso y Picard 1986
<i>Dhh</i>	Regulador de las interacciones entre las células Sertoli-mioides y Sertoli- Leydig, desarrollo de las células germinales masculinas	Bitgood et al 1996 Clark et al 2000
<i>Fgf9</i>	Proliferación de las gónadas masculinas	Colvin et al 2001
<i>M33</i>	Requerido para el desarrollo testicular	Kayoh-Fukui et al 1998
<i>Dmrt1</i>	Mantenimiento de túbulos seminíferos	Raymond et al 1998,1999,2000
<i>Dax1</i>	Función no establecida	Swain t al 1998, Yu et al 1998
<i>Wnt4</i>	Represión de la diferenciación de las células de Leydig en gónadas femeninas	Vainio et al 1999
<i>Igf-I</i>	Promotor de esteroidogénesis testicular	Villalpando y López-Olmos 2003

Modificada de Tilmann y Capel, 2002. Recent Progr Horm Res 57: 1-17.

### 3. Ciclo celular

#### a) Etapas

El ciclo celular es el proceso de pasos ordenados y repetitivos en el que la célula crece y se divide en dos células hijas. Este consta de dos etapas: interfase (fase G<sub>1</sub>, fase S y fase G<sub>2</sub>), y mitosis (profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis) (Fig. 10). Algunas células permanecen en fase G<sub>0</sub> (Wikipedia, 2004).

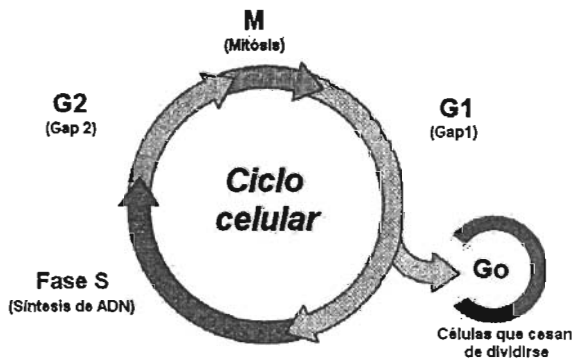


Fig. 10 Esquema del ciclo celular y sus diferentes fases.  
Modificado de enciclopedia Wikipedia, 2004.

#### La Interfase

Es el periodo comprendido entre divisiones celulares. Esta es la fase más larga del ciclo celular y ocupa casi el 95% del ciclo y comprende G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y S.

- Fase G<sub>1</sub>: Es la primera fase del ciclo celular en el que existe crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN. Es el periodo que transcurre entre el final de una mitosis y el inicio de la síntesis de ADN. La célula duplica su tamaño y masa debido a la continua

síntesis de todos sus componentes como resultado de la expresión de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular (Wikipedia, 2004).

- Fase S: Es la segunda fase del ciclo en la que se produce la síntesis del ADN, como resultado cada cromosoma se duplica y queda formado por dos cromátidas idénticas. Con la duplicación del ADN, el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y de ADN que al principio.
- Fase G2: Es la segunda fase de crecimiento del ciclo celular en la que continúa la duplicación de proteínas y ARN. En esta fase la célula es diploide o 2n. Al final de este período se observan cambios en la estructura celular que indican el principio de la división celular. Esta fase termina cuando los cromosomas empiezan a condensarse al inicio de la mitosis. Wikipedia, 2004.

### Mitosis o fase M

Es la división celular en la que una célula progenitora (células somáticas) se divide en dos células hijas idénticas. Esta fase incluye la profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis.

- Profase. La profase es el primer estadio de la mitosis. En esta etapa la cromatina se condensa por lo que en este punto existen dos cromátidas unidas. La membrana nuclear se desensambla, los centríolos (si se encuentran presentes) se dividen y los pares migran a los polos y se forma el huso mitótico. Los centrómeros (o constricciones primarias) en los cromosomas se vuelven claramente visibles, debido a que se le han asociados placas

proteicas a ambos lados: el cinetocoro. En el citoplasma el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi se fragmentan en vesículas y se desorganiza el citoesqueleto por lo que la célula pierde su forma original y se hace esférica (Wikipedia,2004).

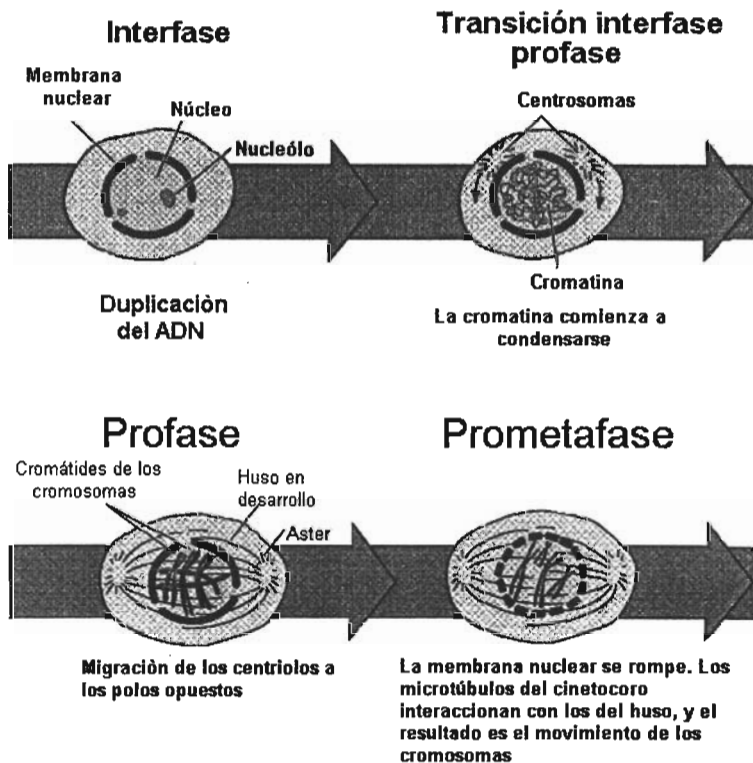


Fig. 11. Figura que muestra la transición de la interfase a la profase de la mitosis. Tomada de enciclopedia Wikipedia 2004.

- **Metafase.** La metafase es la segunda fase de la mitosis, aquí los cromosomas (que a este punto consisten en dos cromátidas mantenidas juntas por el centrómero) alcanzan su

máxima condensación y migran al ecuador de la célula donde las fibras del huso se unen a las fibras del cinetocoro.

- **Anafase.** La anafase comienza con la separación de los centrómeros y el arrastre de las cromátidas (los llamamos cromosomas luego de la separación de los centrómeros) a los polos opuestos.

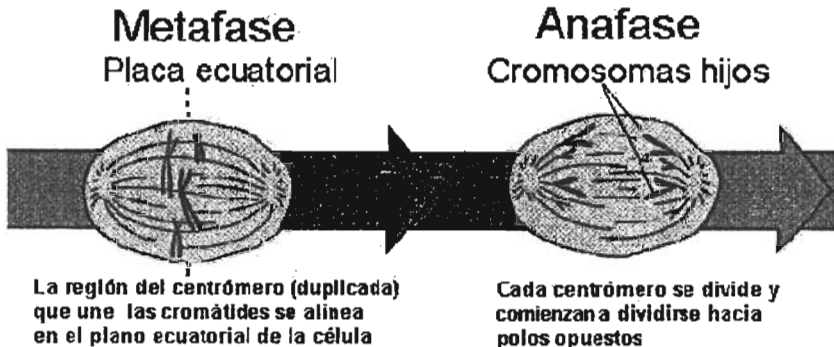


Fig. 12. Esquema que muestra la transición de la metafase a la anafase de la mitosis. Tomada de enciclopedia Wikipedia 2004.

- **Telofase.** En la telofase los cromosomas llegan a los polos de sus respectivos husos, la membrana nuclear se reconstituye, los cromosomas se descondensan y pasan a formar la cromatina y el nucleolo, que desapareció en la profase se vuelve a constituir. Donde antes había una célula ahora existen dos pequeñas con exactamente la misma información genética y número cromosómico. Estas células pueden luego diferenciarse en diferentes formas durante el desarrollo (Wikipedia, 2004).

# Telofase



Fig. 13. Imagen que muestra la última fase de la mitosis.  
Tomada de enciclopedia Wikipedia 2004.

- Citocinesis. La citocinesis es el proceso de separación de las células formadas. En tanto la mitosis es la división del núcleo en la citocinesis ocurre la división y la relocalización de los plástidos, Golgi y citoplasma en cada nueva célula.

## b) Ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas

En el año 2001, Leland H, Nurse P y colaboradores ganaron el premio Nobel de Medicina y Fisiología por descubrir las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclina, las principales moléculas que regulan el ciclo celular. La maquinaria del ciclo celular se compone de dos elementos centrales; las cinasas dependientes de ciclina (CDK) y las ciclinas. Las CDK fosforilan proteínas en residuos de serina y treonina. Estas cinasas trabajan para amplificar la señal, ya que una sola molécula con actividad cinasa es capaz de modificar un gran número de ciclinas en un corto período de tiempo (Nurse P y cols., 2000).

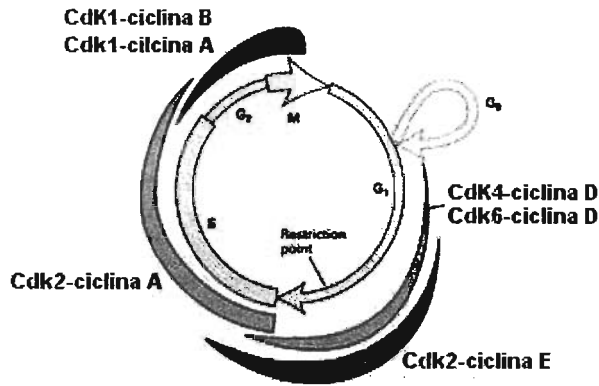


Fig. 14. Complejos cdk-ciclinas fundamentales en cada fase del ciclo celular. Tomada de enciclopedia Wikipedia 2004.

Sin las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclina son inactivas. Cuando se asocian físicamente, las ciclinas son capaces de guiar a las CDK hasta los sustratos adecuados e inducir su actividad catalítica. Existen diferentes complejos de cinasas dependientes de ciclinas-ciclinas (CDK:c) que se forman durante las diferentes fases del ciclo (Hornet y cols., 1996) y cada uno de ellos fosforila diferentes proteínas. De forma general, se puede decir que las concentraciones de CDK son relativamente constantes durante el ciclo, mientras que las que varían son las de las ciclinas. Esto indica que, en parte, el comportamiento de estos complejos está determinado por estas cifras oscilantes de ciclinas. En mamíferos se han identificado nueve CDK y 16 ciclinas: A, B1, B2, C, D1, D2, D3, E, F, G1, G2, H, I, K, T1 y T2 (tabla 2). Todas ellas comparten una región homóloga conocida como caja de ciclinas, que es el dominio que utilizan para unirse y activar CDK. (Wikipedia. 2004).



CICLINAS	CDK ASOCIADA	FUNCION
<b>A</b>	fCrD3k i01211r 1aK1(CDC2), CDK2	000
<b>B1, B2</b>	CDK1	Salida de G2, mitosis
<b>C</b>	CDK8	Transición G0-S
<b>D1, D2, D3</b>	CDK4, CDK6	Transición G0-S
<b>E</b>	CDK2	Transición G1-S
<b>F</b>	¿?	Transición G2-M
<b>G1, G2</b>	CDK5	Respuesta ante daño DNA
<b>H</b>	CDK7	Activación de cdk, regulación transcripcional, reparación DNA.
<b>I</b>	¿?	
<b>K</b>	¿?	Regulación transcripcional cdk
<b>T1, T2</b>	CDK9	Regulación transcripcional

Tabla 2. Ciclinas en mamíferos. Tomada de Shapiro y Harper, 1999.

El paso de una fase a otra del ciclo celular, se controla mediante estas CDKs, y comprende las CDK4/6 (transición G0/G1), CDK2 (fases G1, G1/S y G2) y CDK1 (transición G2/M) (Figura 16). Las CDK están reguladas de forma positiva por las ciclinas, que se sintetizan y degradan específicamente para cada fase del ciclo en que participan, y comprenden fundamentalmente las ciclinas D (transición G0/G1), la ciclina E (transición G1/S), la ciclina A (transición S/G2 y fase G2) y la ciclina B (transición G2/M). Los complejos que se forman corresponden a CDK4/6 con ciclinas D, CDK2 con ciclinas E y A, y CDK1 con ciclinas A y B (Koff y cols., 1991; Okamoto y cols., 1994; Lukas y cols., 1995; Resnitzky y cols., 1995; Morgan, 1996;).

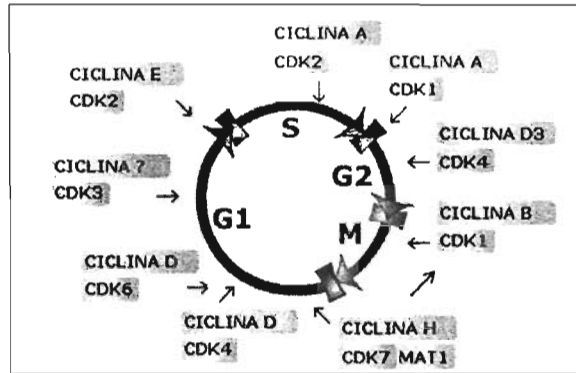


Fig. 15. Se representan las fases del ciclo celular y los complejos de CDK / ciclina que intervienen en cada una de ellas. Cada CDK es una unidad catalítica que interacciona con ciclinas específicas que modulan su acción como subunidades reguladoras. Cada complejo CDK-ciclina ejecuta una función limitada por el tiempo y por el sustrato. Tomada de Shapiro y Harper., 1999.

#### 4. Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I

##### a) Organización molecular

El factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) es un péptido de bajo peso molecular de 7600 Da. Está relacionado por su homología estructural con la proinsulina. El IGF-I está constituido por los dominios BCAD y E (Fig. 7 y 8).

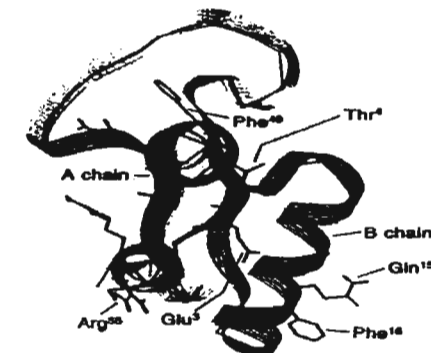


Fig. 7. Modelo que muestra la estructura terciaria del IGF-I. Los cuatro aminoácidos del amino terminal B cambian que es un punto crítico para la unión a su receptor. Tomada de Clemmons D 1993 Mol Reprod Dev 35:368-375.



## b) Proteínas de unión

El IGF-I es un factor que se encuentra en la circulación sanguínea y en el espacio extracelular. Este se haya unido a miembros de una familia de proteínas denominadas acarreadoras de IGF's (IGFBP's). Seis tipos estructurales de IGFBP's se han identificado (Sara y Hall, 1990; Lin T y cols., 1993). Estas tienen un papel crucial en las acciones biológicas *in vivo* del IGF-I. Las IGBPs regulan la actividad biológica del IGF-I, ya que al unirse a éstas: a) transportan al IGF, b) liberan a este factor cerca de las células blanco, c) prolonga su vida media, d) limitan el acceso a receptores específicos y e) potencian o inhiben sus efectos (Jones y Clemmons, 1995).

Los efectos biológicos de la insulina y el IGF-I son mediados por dos receptores independientes, que estructuralmente son similares (Handeksman y cols., 1985). Ambos se expresan en la superficie de la membrana celular y pertenecen a la familia de los receptores tirosina-cinasa (Nissley y Lopaczyinski, 1991; Gronborg y cols., 1993). El IGF-IR es un tetrámero, formado por dos subunidades  $\alpha$  (alfa) y dos subunidades  $\beta$  (beta) unidas por puentes disulfuro. Las subunidades  $\alpha$  están localizadas extracelularmente y median la unión al ligando, mientras que las subunidades  $\beta$ , se encuentran intracelularmente y son las que poseen la actividad tirosina-cinasa (Sepp-Lorenzino, 1998). (Fig. 7)

Se ha propuesto que este receptor es el transductor de las acciones mitogénicas a través de la fosforilación de tirosina (Nissley y Lopaczunski., 1991). La expresión del IGF-IR en las células se encuentra altamente regulada por varias condiciones fisiológicas. Por ejemplo, los niveles de mRNA para el IGF-IR están estrechamente regulados por el estado nutricional. En algunos tejidos, los niveles locales de IGF-I se reducen luego de una disminución en la ingesta de calorías. También es posible que el incremento en la expresión

del IGF-IR sea secundario a la reducción de la concentración local del IGF-I. De manera similar, los niveles de IGF-IR en cultivos celulares son afectados por la concentración de IGF-I en el medio encontrado, una reducción en el número de receptores al haber un nivel elevado de IGF-I puesto que al unirse el IGF-I con el IGF-IR. Este último se internaliza en la célula junto con el IGF-I (Hernández-Sánchez y cols., 1997).

## **5. Acciones biológicas**

### **a) Participación en la producción hormonal**

La expresión del IGF-I del ratón se ha asociado en el control de la producción hormonal en las gónadas del ratón en la vida embrionaria (Villalpando y López-Olmos, 2003). En esta fase el IGF-I administrado *in vitro* promueve la síntesis de testosterona después de 7 días de cultivo (Taketo et al, 1991). Así mismo, en células testiculares de ratón, este factor induce la producción *in vitro* de  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona y testosterona (López-Olmos y Villalpando, 2003).

### **b) Papel en la diferenciación y proliferación celular**

Las funciones más conocidas del IGF-I son, la de estimular el crecimiento y la diferenciación de una gran variedad de tipos celulares (Baker y cols., 1996), ya que actúan como péptidos mitogénicos que inducen la expresión celular del protooncogen c-fos (Merriam y col, 1990). Por tal motivo, se les ha asociado a procesos patológicos como el cáncer (Macaulay, 1992). Además, produce diferentes efectos que dependerán de la respuesta específica de la célula blanco en que actúen (Hansson y cols.,1989; Sara y Hall, 1990; Guide, 1992). Ejemplos de lo anterior son la síntesis de aminoácidos y proteínas que se observan en el cartílago de rata (Sara y Hall, 1990) o la producción de esteroides

ováricos (Adashi y col, 1985), ambos por la participación del IGF-I. Se ha propuesto que el IGF-I además es un promotor de la diferenciación (Saez J y cols., 1988) pero no de la proliferación de las células testiculares de la rata a los 16 d.g. (Rouiller-Fabre, 1998). Sin embargo el papel del IGF-I en la proliferación de las células gonadales del ratón no se ha estudiado.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La determinación sexual testicular en los mamíferos ocurre en la etapa embrionaria debido a la expresión del gen Sry y a la interacción de éste con otros genes autosomales a través de un mecanismo entendido parcialmente hasta el presente. Se sabe que la función testicular en el mamífero adulto es controlada principalmente por las hormonas gonadotrópicas LH y la FSH. Sin embargo, en los últimos diez años se han publicado diversos estudios sobre factores de crecimiento producidos localmente en el ovario y testículo adulto, que participan en el control de la función de estos órganos. Entre ellos se encuentra el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I). Experimentos realizados *in vitro* en diferentes especies de mamíferos en testículo demostraron que éste factor tiene una participación fundamental en el control endócrino de la gónada masculina y en la diferenciación de las células de Sertoli y Leydig de las células reproductoras. Estudios relativamente recientes sobre la mutación nula del IGF-I demostraron la importancia que éste tiene en la morfogénesis y en la secreción de hormonas sexuales de los mamíferos. Por otro lado, experimentos realizados en fetos de rata, se plantea que el IGF-I induce la diferenciación fisiológica de las células de Leydig, aunque no se observó ningún efecto de este factor en la producción de hormonas sexuales. Investigaciones recientes realizadas por el grupo de la Dra. Villalpando demostraron la presencia de RNAm y la proteína del IGF-I en etapas tempranas del desarrollo testicular, hasta la fecha se desconoce si este factor participa en la proliferación y diferenciación de las células somáticas testiculares en etapas críticas para la diferenciación sexual del testículo y para la actividad secretora del mismo. Considerando que el Sry se descubrió en el ratón y que ésta es una especie empleada en investigación básica, es necesario aumentar el conocimiento

sobre la participación del IGF-I en la fase embrionaria de esta especie animal, así como determinar los mecanismos implicados en el crecimiento y diferenciación del testículo.

#### IV. HIPÓTESIS

El IGF-I es uno de los factores que participa en la regulación de la función testicular en el adulto. En la etapa embrionaria este factor promovería la proliferación de las células testiculares del ratón y por lo tanto induciría el crecimiento de este órgano en esta etapa.



## V. OBJETIVOS

1. Determinar la dosis óptima de IGF-I que induce la proliferación de las células somáticas de los 12 –17 d.g. durante el desarrollo testicular del ratón.
  
2. Investigar si el IGF-I participa en la proliferación de las células somáticas en el testículo embrionario del ratón a los:
  - a) 12 d.g. (inicio de la diferenciación).
  - b) A los 14 d.g. (etapa de crecimiento)
  - c) A los 17 d.g. (etapa fetal)

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Reactivos químicos

Los reactivos químicos utilizados y descritos en metodología fueron de pureza grado analítico.

#### 1.1 Material

El material empleado fue esterilizado en ciclo húmedo a 120 Kg/cm<sup>2</sup> en autoclave, 40 minutos.

#### 1.2 Animales

Se utilizaron embriones macho de 12,14 y 17 días de gestación (d.g.) de ratones hembra de la cepa CD-1 del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los ratones se mantuvieron con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a una temperatura de 24-25°C y se alimentaron con “Mouse/rat diet 7200” marca Harland y agua *at libitum*.

### 2 Aislamiento del testículo

Ratones hembra de la cepa CD-1 de 12,14 y 17 dg, se sacrificaron por dislocación cervical bajo un microscopio estereoscópico (modelo Stereomaster Fisher Scientific) en condiciones de atmósfera semiestéril, se obtuvieron los embriones macho a los cuales se les disectaron los testículos (Fig. 17) y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL con 500 µL de PBS, se hicieron dos lavados con Versene 0.1 mM.

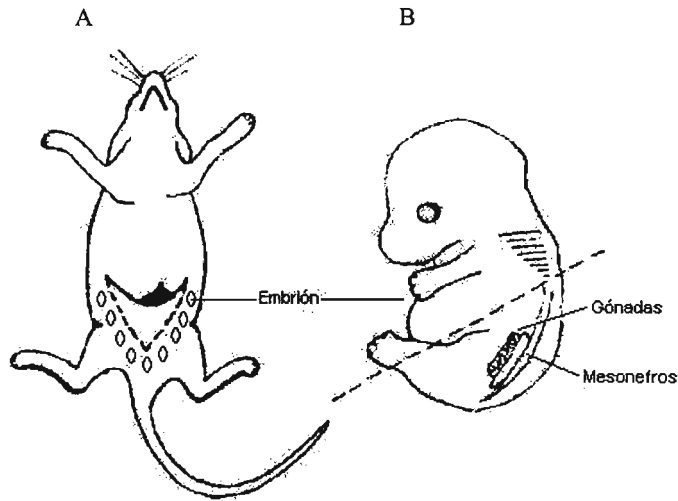


Fig. 16. A. Se muestra la región ventral de una ratona preñada. B. Se ilustra la ubicación de los embriones y el área caudal donde se localizan los testículos.

## 2.1 Disgregación celular

En condiciones semiestériles, los testículos se disgregaron con tripsina al 0.1 % y se incubaron a 37 °C 10 min, se ayudó a la disgregación manualmente con la ayuda de una pipeta siliconizada y se inhibió la acción de la tripsina con inhibidor de tripsina al 0.2 %. Las células disgregadas se centrifugaron a 1800 rpm 10 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 300 µL de medio 199 suplementado (con L-glutamina 2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 0.2%, HEPES 25 mM, Penicilina G sódica 50 UI/mL, sulfato de estreptomycinina 50 µg/mL, y piruvato de sodio 0.11 mg/mL) de IN VITRO de México. Con esta técnica se obtuvo una fracción enriquecida de células de testículo (Sertoli y Leydig), las células reproductoras no se pegan al sustrato y no se pueden cultivar.

## 2.2 Viabilidad celular

Para conocer la viabilidad celular y saber el número de células por mililitro se utiliza un hematocitómetro (Fig.17).

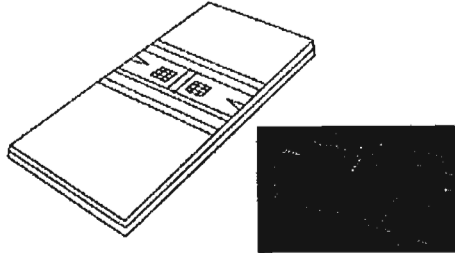


Fig. 17. Hematocitómetro

Se tomaron 40  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular obtenida, se colocaron en un tubo Eppendorf y se añadieron 40  $\mu\text{L}$  de azul de tripano 0.9 % en PBS. De esta solución se tomaron 10  $\mu\text{L}$  y se colocaron en el hematocitómetro. El número de células viables se contó tomando en cuenta los cuatro cuadrantes (W) presentes en la cámara y se realizaron los cálculos de acuerdo al siguiente esquema (Fig18).

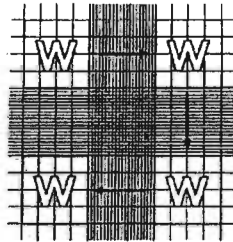


Fig. 18. Esquema que muestra los cuadrantes observados en el hematocitómetro bajo el microscopio.

No. de células viables= No. de células en los 4 cuadrantes (W) x 2500 x F.D.

2500= Constante para convertir a células por mL  
F.D. Factor de dilución (aforo/alícuota)

### 2.3 Cultivo

Se tomó el volumen calculado para obtener  $1.5 \times 10^5$  células y se colocaron en cajas de cultivo de plástico Nuclon (35x10 mm) con 1 mL de Medio Eagle Modificado Dulbecco (DMEM) suplementado con 50 UI/mL de penicilina, 50  $\mu\text{g/mL}$  de sulfato de estreptomycin, 2 mM de L-glutamina, Hepes 2.5 mM y albumina al 0.1 % y presencia o ausencia de IGF-1 como se presenta en el diseño experimental (tabla 3).

#### DISEÑO EXPERIMENTAL

Tabla 3. Curva dosis respuesta a diferentes edades

Edad	No. de experimentos *	Experimental (con IGF-I)
12 d.g.	5	50 ng
	5	75 ng
	5	100 ng
14 d.g.	5	50 ng
	5	75 ng
	5	100 ng
16 d.g.	5	50 ng
	5	75 ng
	5	100 ng

\* Cada experimento tuvo un control sin IGF-I

Tabla 4. Efecto del IGF-I a diferentes edades

Edad	No. de experimentos *	Experimental (con IGF-I)
12 d.g.	5	100 ng
	5	100 ng
	5	100 ng
14 d.g.	5	100 ng
	5	100 ng
	5	100 ng
16 d.g.	5	100 ng
	5	100 ng
	5	100 ng

\* Cada experimento tuvo un control sin IGF-I

### 2.4 Incubación de células testiculares

Las cajas de cultivo sembradas se colocaron en estufa a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub> por 21 horas.

## **2.5 Verificación del crecimiento celular**

Para verificar que las células sembradas tuvieran un adecuado crecimiento, transcurrido el tiempo de incubación, se observó en el microscopio invertido (modelo Zeiss West Germany) el crecimiento celular.(Fig. 21)

## **2.6 Inmunocitoquímica**

La inmunocitoquímica es una técnica inmunológica que nos permite detectar el BrdU incorporado al DNA de las células que han entrado a la fase de mitosis en el ciclo celular. El BrdU es un análogo de la timidina, por lo que incorpora al DNA en lugar de la timidina. Para la realización de esta técnica, se incubaron las células con 10  $\mu\text{mol/L}$  de BrdU, a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub> por 1 hora, se colectaron las células , se fijaron en un portaobjetos con ETOH 70% con buffer de glicina y se lavaron con PBS 0.1 M pH 7.4, a punto de ebullición. Posteriormente se incubaron las células con el anticuerpo primario anti-BrdU de ratón, en cámara húmeda con PBS 0.1 M a 37 °C por 1 hora, se lavaron las células con PBS 0.1 M y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón-Ig-fluoresceinado por 1 hora a 37 °C en cámara húmeda con PBS 0.1 M. Se montaron con medio de montaje “Vecta shield” para fluorescencia (de vector laboratories) y las células fueron observadas en microscopio (modelo Nico Eclipse E600 ) con luz ultravioleta a una longitud de onda entre 480-520 nm; la fluorescencia fue presente en las células que se incorporo el BrdU. (Fig. 19).

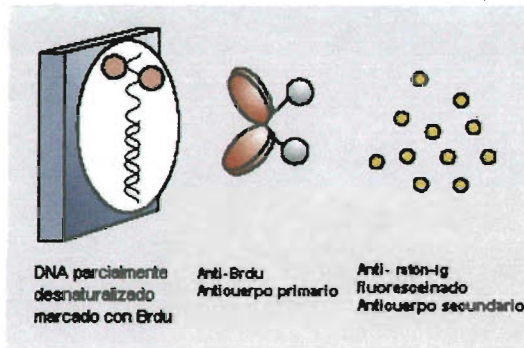
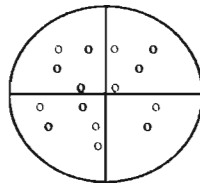


Fig. 19. Se muestra la representación gráfica de los anticuerpos primario y secundario durante la técnica de inmunodetección por BrdU.

## 2.7 Conteo de células marcadas con BrdU

Se realiza el conteo celular bajo microscopio (modelo Nico Eclipse E600 ), se cuentan las células marcadas y no marcadas en cuatro cuadrantes de un campo y se calculó el % de células.



$$\% = \frac{\text{No. de células marcadas}}{\text{No. total de células}} \times 100$$

$$\% = \frac{\text{No. de células no marcadas}}{\text{No. total de células}} \times 100$$

## 2.8 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó con análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguida de la prueba Tukey con el programa Prism 4.0.

## VII. RESULTADOS

### 1. Cultivo celular

El modelo biológico empleado en la presente tesis, fue el ratón *Mus musculus* de la cepa CD-1. A pesar de la importancia biológica del ratón como modelo para la investigación, éste no ha sido usado para estudio de proliferación celular de las células somáticas del testículo. Se realizó entonces la disgregación de las células testiculares para realizar el cultivo celular bajo las condiciones especificadas en material y métodos, obteniéndose los cultivos celulares (Fig. 20) a partir de los cuales se realizó el diseño experimental (Tabla 3 y 4).

Los cultivos celulares de las células somáticas crecieron bien en todos los casos.

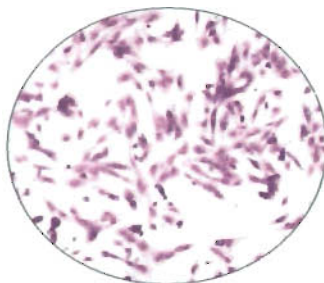


Fig. 20. Se muestra el crecimiento del cultivo celular de testículo embrionario de 16 d.g. a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. 40 X.

### 2. Establecimiento de la dosis óptima de IGF-I

Se realizaron varias curvas para conocer la dosis óptima, en edades de 12, 14, y 17 d.g. (Figs. 22, 23 y 24). Se utilizaron diferentes dosis de IGF-I (50,75 y 100 ng) y se determinó que la dosis que más potenció la proliferación de las células somáticas para cada una de las edades estudiadas fue de 100 ng con una diferencia significativa de  $p < 0.001$  con respecto al control.



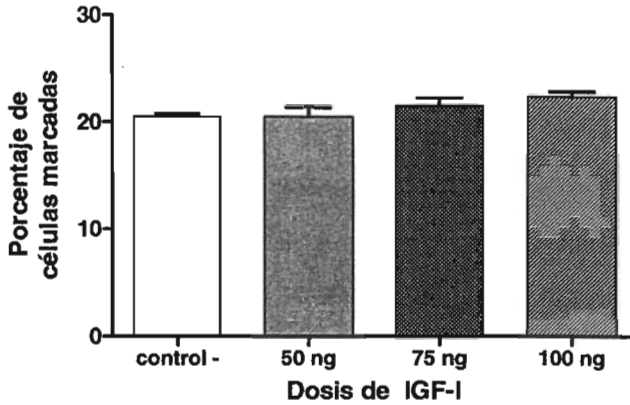


Fig. 22. **Proliferación de las células testiculares a los 12 d.g.** Gráfica que muestra los porcentajes obtenidos con el tratamiento de IGF-I a diferentes concentraciones. El porcentaje de proliferación fue del 20%. Las barras muestran la media de 5 experimentos independientes y el error estándar.

Una vez conocida la dosis óptima de 100 ng, en las diferentes edades ensayadas (Figuras 22, 23 y 24), se evaluó la influencia del IGF-I en las diferentes edades (12, 14 y 17 d.g.). (Figura 25).

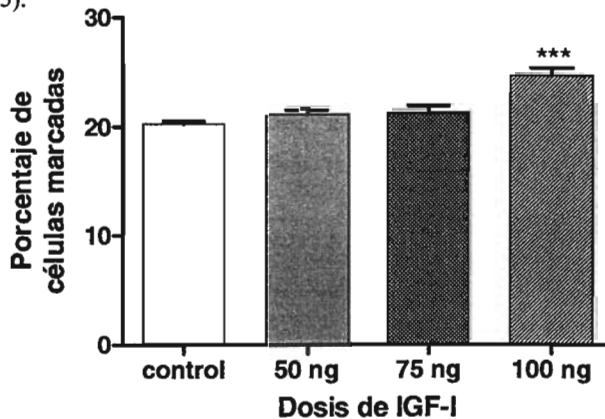


Fig. 23. **Proliferación de las células somáticas testiculares a los 14 d.g.** Gráfica que muestra el incremento del porcentaje de células proliferando. \*\*\* $p < 0.001\%$  significativamente diferente con respecto al control. Las barras muestran la media de 3-5 experimentos independientes y el error estándar.

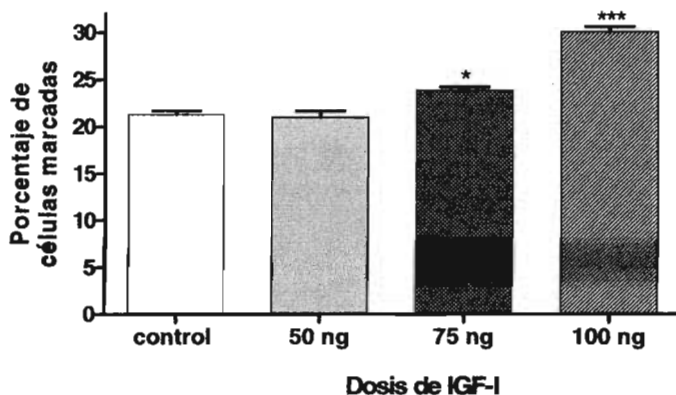


Fig. 24. **Proliferación de las células somáticas testiculares a los 17 d.g.** Gráfica que muestra el porcentaje de proliferación obtenido a esta edad. \*\*\* Significativamente diferente con respecto al control  $p < 0.001$ . Las barras muestran la media de 3-5 experimentos independientes y el error estándar.

### 3. Inmunocitoquímica

Para determinar si el IGF-I estimula la proliferación de las células somáticas testiculares se utilizó la técnica de inmunodetección con BrdU, el cual se agregó durante una hora posterior a la estimulación de IGF-I. Las moléculas de BrdU incorporadas al DNA a través de la división celular (síntesis), fueron detectadas con un anticuerpo monoclonal para BrdU y un segundo anticuerpo anti-BrdU. Se contaron las células marcadas como se muestran en la Figura 21.



Fig. 21. **Inmunocitoquímica de cultivo celular de testículo embrionario.** El anticuerpo primario es un anticuerpo monoclonal para BrdU y el secundario es un anticuerpo anti-raton-Ig-fluoresceinado. Rango 480-520 nm. Flecha indica las células marcadas (núcleo verdes fluorescentes) y no marcadas (núcleos verde tenue). 40 X.

#### 4. Efecto de la concentración de IGF-I

Se observó que el IGF-I aumentó la proliferación de las células testiculares, en embriones de 12, 14 y 17 d.g. del desarrollo embrionario. Los valores determinados muestran que el IGF-I tiene un efecto sobre la proliferación de estas células ya que aumentó de forma exponencial de este proceso con la dosis de 100 ng. Se observó que el IGF-I provocó un aumento de la proliferación de acuerdo a la edad evaluada. Se encontró que el porcentaje máximo de proliferación fue a los 17 d.g. (Fig. 25).

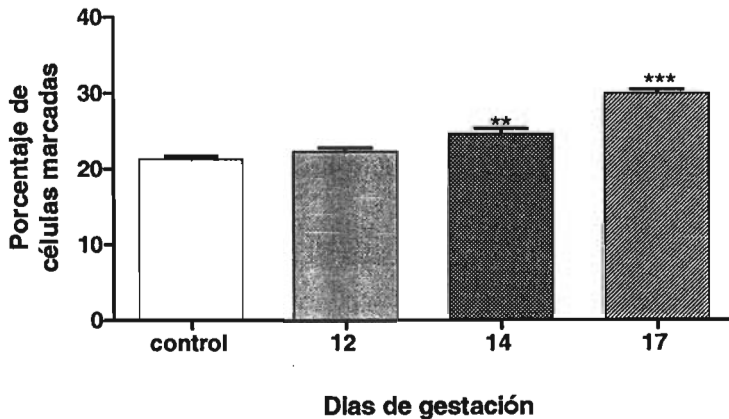


Fig.25. Gráfica que resume el porcentaje de proliferación de las células somáticas del testículo embrionario marcadas a lo largo del desarrollo de la gónada masculina con 100 ng. Las barras muestran el promedio y el error estándar. \*\* Significativamente diferente con respecto al control  $p < 0.01$ , \*\*\* Significativamente diferente del control con una  $p < 0.001$  con el análisis de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

## VIII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudió el efecto del factor de crecimiento similar a la insulina en la proliferación de las células somáticas del testículo embrionario. Desde la etapa inicial de la diferenciación de este órgano 12 d.g. hasta la fase fetal (17 d.g.).

Los estudios sobre el control de la proliferación de las células embrionarias arrojan datos controversiales. Se sabe que la regulación y progresión del ciclo celular están bajo el control de factores de crecimiento entre estos se incluye el IGF-I, las ciclinas las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDK), las cuales forman un complejo estas proteínas (Shapiro y cols., 1999).

En esta investigación observamos que el IGF provocó un incremento en la división de las células testiculares diferencialmente. A los 12 d.g. diferentes dosis de IGF-I no incrementaron la división celular. Esto se debe quizá a dos factores; el primero podría estar relacionado con el tamaño del testículo ya que a esta edad, este órgano está formado por muy pocas células somáticas; los cordones testiculares en su mayoría están constituidos por células reproductoras. La segunda razón es que el porcentaje de células proliferando sea representativa de las células que entraron en mitosis; puesto que no todas las células en la gónada parecen dividirse simultáneamente. Datos recientes generados por Schmahl y Capel 2003, plantean que la proliferación es necesaria en la gónada indiferenciada para determinar el destino de la gónada masculina o femenina. Este grupo también propone que este proceso también es importante para la morfogénesis (Schmahl y Capel, 2003), antes de que las células precursoras de las diferentes estirpes celulares que constituyen este órgano se diferencien.

Experimentos realizados en el laboratorio (Castrejón-López, 2005) con anticuerpos neutralizantes dirigidos contra IGF-I demostraron también que a los 12 d.g. no se observó

ningún efecto en la inhibición de las células testiculares. Sin embargo, observaciones hechas en nuestro grupo de trabajo plantean que la diferenciación de algunas células precursoras de Leydig se inicia a los 12 d.g. puesto que empiezan a secretar testosterona (Castrejón-López, 2004), debido a que la inhibición del IGF-I provocó una baja en la biosíntesis de testosterona a esta edad. Sin embargo a los 12 d.g. sí se encontró un efecto inhibitorio del 10% del IGF-I en la proliferación de las células testiculares (Castrejón-López, 2004). Los datos generados a los 17 d.g. muestran que el porcentaje de inhibición se incrementó significativamente con respecto a la etapa anterior al 22 %. Estos datos plantean que el IGF-I a los 14 d.g. es un factor de progresión del ciclo celular y a los 12 d.g. un promotor de la diferenciación de los precursores de Leydig. Además, nuestros hallazgos plantean que el IGF-I, es un factor mitogénico moderado ya que en ningún experimento se encontró un efecto del 100 %; esto plantea que además, de este factor hay otros que participan en la regulación de la proliferación.

Por otro lado, la información que existe hasta la fecha con respecto a las ciclinas sobre el control de la proliferación es motivo de controversia. Experimentos realizados con ratones en la que no se expresan los genes para las ciclinas D1<sup>-/-</sup>, D2<sup>-/-</sup> y D3<sup>-/-</sup> demostraron que en ausencia de estos reguladores del ciclo celular, los ratones mueren a los 13.5 d.g. (Kozar y cols., 2004). Estos autores además plantean que la proliferación de diferentes órganos prenatalmente no está aparentemente bajo el control de las ciclinas D. Sin embargo, en este estudio no se evaluó el papel de las ciclinas en el desarrollo gonadal. Resultados generados en el laboratorio (Castrejón-López, 2004) en células somáticas con ciclinas D2 a los 14 y 17 d.g. demuestran que la ciclina D2 sí tiene un efecto en el control de la proliferación de las células gonadales.

Los ensayos de proliferación de las células gonadales del ratón a los 17 d.g. demostraron que el porcentaje más alto de proliferación provocado por el IGF-I *in vitro* fue detectado en esta edad. Sin embargo, los experimentos de neutralización del IGF-I, a esta misma etapa, muestran que solo el 20% de la proliferación de las células somáticas es inhibido. Esto sugiere que debe existir además de las ciclinas y el IGF-I otros factores que regulen la proliferación en la etapa embrionaria, como se mencionó antes.

Los hallazgos realizados sobre el efecto estimulador del IGF-I en las células somáticas testiculares del ratón están en desacuerdo con los generados por Rouiller-Fabre y colaboradores en 1998. Estos investigadores evaluaron el efecto del IGF-I en las células del Leydig de testículos fetales en la rata a los 16 y 18 d.g. con 50 ng de este factor de crecimiento. Ellos describen que el IGF-I no es un factor que induzca un aumento en la proliferación de las células somáticas del testículo debido a que no observaron ningún efecto del IGF-I en la proliferación. Este grupo de investigación, propone que el IGF-I es un promotor de la diferenciación de las células de Leydig. Sin embargo, las diferencias observadas en nuestro estudio con 100 ng pudiera deberse a que la dosis empleada es alta, lo cual obligaría a nuestras células a entrar en mitosis. Es probable que las diferencias observadas entre la rata y el ratón se deban además a que hay diferencias genéticas entre diferentes especies. Esto se hace evidente en la respuesta fisiológica diferente al evaluar el efecto del mismo factor de crecimiento en la rata y el ratón.

En resumen, el IGF-I es un promotor de la proliferación de las células testiculares en el ratón, en etapa prenatal. Falta investigar o determinar si el IGF-I es un factor inductor de la diferenciación de las células del Leydig en esta especie, empleando células indiferenciadas o líneas celulares.

## IX. CONCLUSIONES

1. El IGF-I es un promotor del ciclo celular pues induce la proliferación de las células somáticas del testículo a 12 y 14 d.g.
2. Este factor parece tener una función fundamental a los 17 d.g. ya que su estimulación es mayor en esta edad.
3. El porcentaje de inducción de proliferación observado de 20 – 30 % indica que es un factor con actividad mitogénica moderada.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Adashi EY, Resnick CE, Brodie AMH, Svoboda ME, Van Wyk JJ 1985a Somatomedin-C mediated potentiation of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 117:2313-2320.
- Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellve AR, Efstratiadis A 1996 Effects of an Igfl Gene Null Mutation on Mouse Reproduction. *Mol Endocrinol* 10: 903-917.
- Behringer RR, Cate RL, Froelick GJ, Palmiter RD, Brinster RL 1990 Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing mullerian inhibiting substance. *Nature* 10:167-70.
- Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL 1994 Mullerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 79:415-25.
- Benton L, Shan L, Shan L, Hardy M 1995 Differentiation of adult Leydigs cells *Steroid Biochem Molec Biol* 53:61-68.
- Berta P, Hawkins J, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M 1990 Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348:448-450.
- Bitgood MJ, Shen L, McMahon AP 1996 Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol* 1:298-304.
- Birk OS, Casiano DE, Wassif CA, Cogliati T, Zhao L, Zhao Y, Grinberg A, Huang S, Kreidberg JA, Parker KL, Porter FD, Westphal H. Related Articles 2000 The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation. *Nature* 24:909-13.



- Cameron FJ, Hageman RM, Cooke-Yarborough C, Kwok C, Goodwin LL, Sillence DO, Sinclair AH. Related Articles 1996 A novel germ line mutation in SOX9 causes familial campomelic dysplasia and sex reversal. *Hum Mol Genet.* 5:1625-30.
- Chemes H E, Rivarola M.A, Bergada C 1976 Effect of HCG on the interstitial cells and androgen production in the immature rat testis. *J Reprod Fert* 46:279-282.
- Chiquoine AD 1954 The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat Rec* 118:135-146.
- Clark AM, Garland KK, Russell LD 2000 Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biol Reprod* 63:1825-38.
- Clemmons DR. 1993 IGF binding proteins and their functions. *Mol Reprod Dev* 35:368-74.
- Clemmons DR, Jones JI, Busby WH 1993 Wright G Role of insulin-like growth factor binding proteins in modifying IGF actions. *Ann N Y Acad Sci.* 27;692:10-21.
- Closset J, Gothon A, Sente B, Scippo M L, Igout A, Vandebroek M, Dombrowicz D, Hennen G 1989 Pituitary hormones dependent expression of insulin-like growth factor I y II in the immature hypophysectomized rat testis. *Mol Endocrinol* 3:1125-1131.
- Colvin JS, White AC, Pratt SJ, Ornitz DM 2001 Lung hypoplasia and neonatal death in Fgf9-null mice identify this gene as an essential regulator of lung mesenchyme. *Development* 128:2095-106.
- Donahoe PK, Cate RL, MacLaughlin DT, Epstein J, Fuller AF, Takahashi M, Coughlin JP, Ninfa EG, Taylor LA 1987 Mullerian inhibiting substance: gene structure and mechanism of action of a fetal regressor. *Recent Prog Horm Res* 43:431-67

- Ford CE, Jones KW, Polani PE, de Almeida J, Briggs JH 1959 A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's Syndrome). *Lancet* 4:711-713.
- Gautier C, Levacher C, Saez J M, Habert R 1997 Transforming growth factor  $\beta$ 1 inhibits steroidogenesis in dispersed fetal testicular cells in culture. *Mol Cell Endo* 131:21-30.
- Ge R, Hardy M P 1997 Decreased with loss of proliferative capacity in rat Leydig cells during pubertal development. *Endocrinology* 138:3719-3725.
- Ginsburg M, Snow MHL, McLaren A 1990 Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulación. *Development* 110:521-528.
- Gnassi L, Fabbri A, Spera G 1997 Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. *Endocrine Rev* 18:541-572.
- Grizard G, Fournet M, Rigaudiere N, Lombard-Vignon, Grizard J 1991 Insulin binding to Leydig cells and insulin levels in testicular interstitial fluid at different stages of development in the rat. *J Endocrinol* 128:375-381.
- Gronborg M, Wulff B, Rasmussen J, Kjeldsen T, Gammeltoft S 1993 Structure-Function Relationship of the Insulin-like Growth Factor-I Receptor Tyrosine Kinase. *J Biol Chem* 268: 23435-40.
- Gubbay J, Collington J, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberg 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.

- Habert R, Picon R 1984 Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol-17 $\beta$  levels in maternal and fetal plasma and in fetal testes in the rat. *J Steroid Biochem* 21: 193-198.
- Handelsman D, Spaliviero J A, Scott C D, Baxter R C 1985 Identification of insulin-like growth factor-I and its receptors in the rat testis. *Acta endocrinol* 109:543-549.
- Hanhel AC, Eddy EM 1986 Cell surface markers of mouse primordial germ cells defined by two monoclonal antibodies. *Gamete Res* 15:25-34.
- Hansson H A, Billig H, Isgaard J 1989 Insulin-like growth factor I in the developing and mature rat testis: Immunohistochemical aspects. *Biol Reprod* 40:1321-1328.
- Hardy M P, Kelce W R, Klinefelter G R, Ewing L L 1990 Differentiation of leydig cells precursors in vitro: a role for androgen. *Endocrinology* 127:488-490.
- Hardy M P, Zirkin B R, Ewing L L 1989 Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat. *Endocrinology* 124:762-770.
- Hernandez-Sanchez C., Werner H., Roberts C, Woo E, Hum D, Rosenthal S, LeRoith D 1997 Differential Regulation of Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) Receptor Gene Expression by IGF-I and Basic Fibroblastic Growth Factor. *J Biol Chem* 272: 4663-70.
- Hornet M C, Goolsby G L, Donaldson K L, Tran D, Neubauer M, Wahl A F, 1996 Cyclin G1 and cyclin G2 comprise a new family of cyclins with contrasting tissue-specific and cell cycle-regulated expression. *J Biol Chem* 271:6050-6061.
- Ikeda Y, Shen WH Ingraham HA, Parker KL, 1994 Developmental expression of mouse steroidogenic factor-I, an essential regulator of steroid Hydroxylases. *Molec Endocrinol* 8:654-662.

- Jacobs PA, Strong JA 1959 A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183:302-303.
- Jäger RJ, Anvret M, Kerstin H, Scherer G 1990 A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature* 384:452-454.
- Jones JJ, Clemmons DR 1995 Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 16:3-34.
- Jansen M, Van Schaik F M, Rickers A T, Bullock B, Woods D E, Gabbay K H, Nussbaum A L, Sussenbach J S, Van den Brande J L 1983 Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. *Letters to Nature* 28:490609-4906411.
- Jones SM, Kazlauskas A 2000 Connecting signaling and cell cycle progression in growth factor-stimulated cells. *Oncogene* 19:5558-5567.
- Josso N, Picard JY 1986 Anti-Müllerian hormone. *Physiol Rev* Oct 66:1038-90.
- Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH, Koopman P 1996 A male-specific role for SOX9 in vertebrates sex determination. *Development* 122:2813-2822.
- Kerr J B, Knell C M 1988 The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development* 103:535-544.
- Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. 1993 WT-1 is required for early kidney development. *Cell.* 27:679-91.
- Koff, A, F. Cross, A. Fisher, J. Schumacher, K. Leguellec, M. Philippe, and J. Roberts. 1991. Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell* 66:1217-1228

- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Googfellow P, Lovell-Badge R 1991 Male development of chromosomally female mice transgenic for sry. *Nature* 351:117-121.
- Kozar K, Ciemerych MA, Rebel VI, Shigematsu H, Zagozdzon A, Sicinska E, Geng Y, Yu Q, Bhattacharya S, Bronson RT, Akashi K, Sicinski P 2004 Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* 20;118:477-91.
- Lin T, Wang D, Nagpal M L, Shimasaki S, Ling N 1993 Expression and regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1, -2, -3, and -4 messenger ribonucleic acid in purified rat leydig cells and their biological effects. *Endocrinology* 132: 1898-1904.
- Luo X, Ikeda Y, Parker KL 1994 A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77:481-490.
- Lukas J, Bartkova J, Rohde M, Strauss M, and Bartek J 1995 Cyclin D1 is dispensable for G<sub>1</sub> control in retinoblastoma gene-deficient cells independently of cdk4 activity. *Mol Cell Biol* 15:2600-2611.
- MaCaulay VM 1992 Insulin-like growth factors and cancer. *Br J Cancer* 65:311-320.
- McLaren A, Buehr M 1990 Development of mouse germ cells in cultures of fetal gonads. *Cell Differ Dev* 31:185-195.
- Merchant-Larios H 1976 The role of germ cells in the morphogenesis and cytodifferentiation of or rat ovary. In: *progress in differentiation research*. Muller-Beret (ed) north Holland Peb. Co, Amsterdam pp 464-472.
- Merchant-Larios H 1978 Ovarian diffentiation. En Jones RE (Ed) *The vertebrate ovary*. Plenum publishing Corp. Cap 2: 47-81.

- Merchant-Larios H 1984 Germ and somatic cell interaction during gonadal morphogenesis. En: Van Belerkom J, Motta PM (eds) Ultraestructure of reproducción. Martinus Nijhoff Publ. Boston. Cap 3:19-30.
- Merchant-Larios H, Taketo T 1991 Testicular differentiation in mammals under normal and experimental condition. *J Electron Microsc Tech* 19: 158-171.
- Merchant-Larios H 1993 El sexo gonadal. Memorias del congreso conmemorativo del jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas tomo I UNAM.
- Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N, Buehr M 1993 the role of the mesonephros in cell differentiation and morfogenesis of the mouse fetal testis. *Int J Dev Biol* 37:407-414.
- Merriman HL, La Tour D, Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ Stormg DD 1990 Insulin-like growth factor –I and insulin-like growth factor II induce c-fos in mouse osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int* 46:258-264.
- Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, Matsuo I, Aizawa S. Related Articles 1997 Defects of urogenital development in mice lacking Emx2. *Development* 124:1653-64.
- Moore A, Morris I D 1992 The involvement of insulin-like growth factor –I in local control of steroidogenesis and DNA synthesis of Leydig and non-Leydig cells in the rat testicular interstitium. *J Endocrinol* 138:107-114.
- Morgan, D. O. 1996. The dynamics of cyclin dependent kinase structure. *Curr. Opin Cell Biol* 8:767-772.
- Murphy L J, Bell G L, Friesen HG 1987 Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology* 120:1279-1282.

- Munsterberg A, Lovell-Badge R 1991 Expression of the mouse anti-mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 113:613-24.
- Nissley P, Lopaczynski W, 1991 Insulin Growth factor receptor. *Grow factors* 5:29-33.
- Nurse P 2000 A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 100:71-78.
- Okamoto K, Beach D 1994 Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *EMBO J* 13:4816-4822 .
- Raymond CS, Murphy MW, O'Sullivan MG, Bardwell VJ, Zarkower D 2000 Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev* 15;14:2587-95.
- Rackley RR, Flenniken AM, Kuriyan NP, Kessler PM, Stoler MH, Williams BR. Related Articles 1993 Expression of the Wilms' tumor suppressor gene WT1 during mouse embryogenesis. *Cell Growth Differ* 4:1023-31.
- Resnitzky D, Reed S, 1995. Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G<sub>1</sub>-to-S transition. *Mol Cell Biol* 15:3463-3469.
- Rouiller-Fabre V, Lecerf L, Gautier C, Saez J M, Habert R 1998 *Endocrinology* 139:2926-2934.
- Saez J M 1994 Leydig cells: Endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endoc Rev* 15: 574-626.
- Saez J, Chatelain P, Perrad-Sapori M, Jaillard C, Naville D 1988 Differentiating effects of somatomedin-c/insulin-like growth factor I and insuline on Leydig and Sertoli cell functions. *Reprod Nutr Develop* 28: 989-1008.

- Sara VR, Hall K 1990 Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev* 70:591-614.
- Sepp-Lorenzino L 1998 Structure and function of the insulin-like growth factor I receptor. *Breast Cancer Res Treat* 47: 235-53.
- Shapiro GI, Harper JW 1999 Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *J Clin Invest* 104:1645-1653.
- Shawlot W, Behringer RR. Related Articles 1995 Requirement for Lim1 in head-organizer function. *Nature* 30:425-30.
- Sherr C, Roberts J 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9:1149-1163.
- Schmahl J, Capel B 2003 Cell proliferation is necessary for the determination of male fate in the gonad. *Dev Biol* 15:264-76.
- Sinclair AH, Berga P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffith BL, Smith MJ, Foster JW, Frischuf am, Lovell-Badge R, Goodfellow PN 1990 a gene from the human sex-determination region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240-244.
- Slingerland J M, Hengst L, Pan C H, Alexander D, Stampfer M R, Reed S I 1994. A novel inhibitor of cyclin-cdk activity detected in transforming growth factor beta-arrested epithelial cells. *Mol Cell Biol* 14:3683-3694.
- Stott D, Wylie C 1986 Invasive behavior of mouse primordial cells germ *in vitro*. *J Cell Sci* 86:133-144.
- Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R 1998 Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature* 19:761-7.



- Tam PPL, Snow MHL 1981 Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryo. *J Embryol Exp Morph* 64:133-147.
- Taketo T, Saed J, Roberge S, Matsuo N, Koide S 1991 Regulation of testicular differentiation and testosterone production in the fetal mouse gonad *in vitro*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 38:523-531.
- Tilmann C, Capel B 2002 Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. *Recent Prog Horm Res* 57:1-18.
- Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon AP 1999 Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 4:405-9
- Villalpando I 2001 Sinfonia de los genes gonadales. *Ciencia y Desarrollo* 160:32-41.
- Villalpando I, Lopez-Olmos V 2003 Insulin-like growth factor I (IGF-I) regulates endocrine activity of the embryonic testis in the mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 86:151-8.
- Wilkinson MG, Millar JB 2000 Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *FASEB J* 14:2147-2157.
- Wikipedia la enciclopeia libre, fundación wikipedia inc. Jimmy Wales. Petersburg, 2004.
- Zwingman T, Erickson RP, Boyer T, Ao A 1993 Transcription of the sex-determination region genes Sry and ZFY in the mouse preimplantation embryo. *Pro Natl Acad Sci USA* 90:814-817.