

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**PAPEL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A
INSULINA TIPO I (IGF-I) EN LA PROLIFERACIÓN Y
ACTIVIDAD ENDOCRINA DEL TESTÍCULO
EMBRIONARIO DEL RATÓN**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A

CARIDAD ESPERANZA CASTREJÓN LÓPEZ



DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA IRMA VILLALPANDO FIERRO

MÉXICO D. F.

MAYO 2005

m345548



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**PAPEL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A INSULINA TIPO I
(IGF-I) EN LA PROLIFERACIÓN Y ACTIVIDAD ENDOCRINA DEL
TESTÍCULO EMBRIONARIO DEL RATÓN**

Tesis para obtener el título de Biólogo presenta:

CARIDAD ESPERANZA CASTREJÓN LÓPEZ

Directora de Tesis: Dra. María Irma Villalpando Fierro

Asesor Interno: Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Tesis realizada en el Departamento de Biología Celular y Fisiología. Laboratorio de Embriología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.

Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo financiero de DGAPA con el proyecto No. IN214802-2.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Irma Villalpando Fierro, por el apoyo, el tiempo, la orientación y la atención prestada para la realización de esta tesis.

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio, por el tiempo y orientación otorgados.

A los miembros del jurado:

M. C. Raúl Závala Chavero

Dra. María Irma Villalpando Fierro

Dra. Leticia Morales Ledesma

Biol. Carlos Martínez Montoya

Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Les reitero un sincero agradecimiento por otorgar tiempo y atención, fundamentales para el enriquecimiento de esta tesis.

A la M. C. Mónica Ramírez Ruano, a Georgina Medina Vásquez, a Brenda López Falcón Piza y Guillermo Guerra Dávalos, por los consejos y momentos agradables durante el desarrollo de mi tesis.

A la Dra. Carmen Méndez, el Dr. Enrique Pedernera y a su equipo de trabajo por el apoyo prestado.

A la Dra. María Elena Ayala y a sus colaboradores Dra. Juanita, M. C. Eloir y Julio, por el apoyo otorgado.

Al Dr. Andrés Aragón Martínez por introducirme a la investigación, por su tolerancia y orientación, muchas gracias.

DEDICATORIAS

Esta tesis es el resultado de muchos sacrificios y esfuerzos de mis padres, es por esto que les dedico mi trabajo y carrera.

Gracias a mi madre Lourdes y mi padre Bernardo por darme el mejor regalo del mundo, una oportunidad de vivir.

A mis hermanos y sus familias por compartir momentos difíciles.

A Sergio por darme su amor cada día y ser un estímulo para seguir adelante con muchas ganas de hacer las cosas.

A Cira por escucharme y su apoyo incondicional

Y por último a mis amigos: Nancy, Sandra, Cesar, Alma, Cristian y los compañeros de mi generación, por compartir momentos muy divertidos y por los que vale la pena ir a escuela.

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	
1. Morfogénesis y desarrollo gonadal	
a) Formación de la cresta genital	2
b) Establecimiento de la gónada indiferenciada	3
c) Diferenciación sexual	4
2. El factor de crecimiento similar a insulina tipo I	
a) Organización del gen	6
b) Organización de la proteína	6
c) Proteínas de unión	8
3. Receptor del IGF-I	
a) Organización del receptor	9
b) Cascada de señalización	10
c) Detección en tejidos	11
4. Control de la proliferación en tejidos	
a) Ciclo Celular	11
b) Papel del IGF-I	13
• Células gonadales	14
• Células no gonadales	15
c) Ciclina D2	15
5. Aspectos de regulación de IGF-I	
a) Hormonas hipofisarias	17
b) Hormonas esteroides	19
c) Segundos mensajeros	19
d) Otros factores que regulan la función testicular	19

III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
IV.	HIPÓTESIS	22
V.	OBJETIVOS	23
VI.	MATERIAL Y MÉTODOS	24
VII.	RESULTADOS	28
VIII.	DISCUSIÓN	33
IX.	CONCLUSIONES	38
X.	REFERENCIAS	39

I. RESUMEN

Durante el desarrollo gonadal de los mamíferos, ocurren eventos de proliferación y diferenciación celular. Estos procesos son controlados por genes, factores de crecimiento, como el IGF-I y las ciclinas D entre otros. Se ha observado que la adición del IGF-I a células de Leydig del testículo adulto en la rata incrementa la proliferación de este tipo celular y la producción de hormonas esteroideas sexuales. Así mismo, estudios previos demostraron que la inhibición de la ciclina D2 impide la diferenciación de las células de la granulosa y disminuye la producción de hormonas esteroideas en la hembra; y en el macho causa hipogonadismo. Sin embargo, se sabe poco sobre el papel de la ciclina D2 y del IGF-I en el control de la proliferación de las células somáticas del testículo del ratón prenatalmente. En el presente trabajo, se estudió el papel del IGF-I y de la ciclina D2 en la proliferación celular del testículo embrionario in Vitro. Se utilizaron embriones de ratón de 12-17 días de gestación (d.g.) de la cepa CD-1. Se aislaron 30 testículos, se disgregaron con tripsina 0.01%, se sembraron 150,000 células y se cultivaron 24 horas (h) con 5% de CO₂ con Anti IGF-I(100ng), Anti ciclina D2 (100ng) o ambas. Las células se marcaron con bromodeoxyuridina (BrdU) 1 h y se realizó una inmunodetección con un anticuerpo anti-BrdU. Los resultados de las edades analizadas muestran que en los experimentos de neutralización con el Anti-IGF-I y con la doble neutralización Anti-IGF-I + Anti-ciclina D2, no hubo una disminución en la proliferación. Sin embargo, con la adición de la Anti-ciclina D2 la proliferación disminuyó 46% con respecto al control con suero (C/S) y sin suero (S/S) a los 17 d. g. Únicamente a los 12 d. g. se detectó una disminución de la testosterona secretada por las células cultivadas con Anti-IGF-I. Se propone que el IGF-I y la ciclina D2 participan en la diferenciación, proliferación y función endocrina de las células del testículo fetal, como son las células de Leydig.

I. RESUMEN

Durante el desarrollo gonadal de los mamíferos, ocurren eventos de proliferación y diferenciación celular. Estos procesos son controlados por genes, factores de crecimiento, como el IGF-I y las ciclinas D entre otros. Se ha observado que la adición del IGF-I a células de Leydig del testículo adulto en la rata incrementa la proliferación de este tipo celular y la producción de hormonas esteroideas sexuales. Así mismo, estudios previos demostraron que la inhibición de la ciclina D2 impide la diferenciación de las células de la granulosa y disminuye la producción de hormonas esteroideas en la hembra; y en el macho causa hipogonadismo. Sin embargo, se sabe poco sobre el papel de la ciclina D2 y del IGF-I en el control de la proliferación de las células somáticas del testículo del ratón prenatalmente. En el presente trabajo, se estudió el papel del IGF-I y de la ciclina D2 en la proliferación celular del testículo embrionario in Vitro. Se utilizaron embriones de ratón de 12-17 días de gestación (d.g.) de la cepa CD-1. Se aislaron 30 testículos, se disgregaron con tripsina 0.01%, se sembraron 150,000 células y se cultivaron 24 horas (h) con 5% de CO₂ con Anti IGF-I(100ng), Anti ciclina D2 (100ng) o ambas. Las células se marcaron con bromodeoxyuridina (BrdU) 1 h y se realizó una inmunodetección con un anticuerpo anti-BrdU. Los resultados de las edades analizadas muestran que en los experimentos de neutralización con el Anti-IGF-I y con la doble neutralización Anti-IGF-I + Anti-ciclina D2, no hubo una disminución en la proliferación. Sin embargo, con la adición de la Anti-ciclina D2 la proliferación disminuyó 46% con respecto al control con suero (C/S) y sin suero (S/S) a los 17 d. g. Únicamente a los 12 d. g. se detectó una disminución de la testosterona secretada por las células cultivadas con Anti-IGF-I. Se propone que el IGF-I y la ciclina D2 participan en la diferenciación, proliferación y función endocrina de las células del testículo fetal, como son las células de Leydig.

II. INTRODUCCIÓN

El sexo fenotípico se establece desde la fecundación, con la unión de los cromosomas sexuales X ó Y; estos, contienen genes que participan en el establecimiento del sexo cromosómico (XX ó XY). La presencia de estos cromosomas dará lugar al sexo gonadal (ovario ó testículo), y la secreción de las gónadas determinará las características externas o el sexo fenotípico. Parte esencial del sexo gonadal, es el desarrollo del aparato genital el cual se diferencia a partir de un primordio indiferenciado que dará origen a tres estructuras: las gónadas, los conductos genitales y el seno urogenital (Merchant y Moreno, 2001).

1. Morfogénesis y desarrollo gonadal

a) Formación de la cresta genital

La cresta genital se forma por interacción de diferentes líneas celulares, como son: células del epitelio celómico que bordean la cavidad celómica; y células del mesénquima adyacente proveniente del mesonefros (Merchant, 1984).

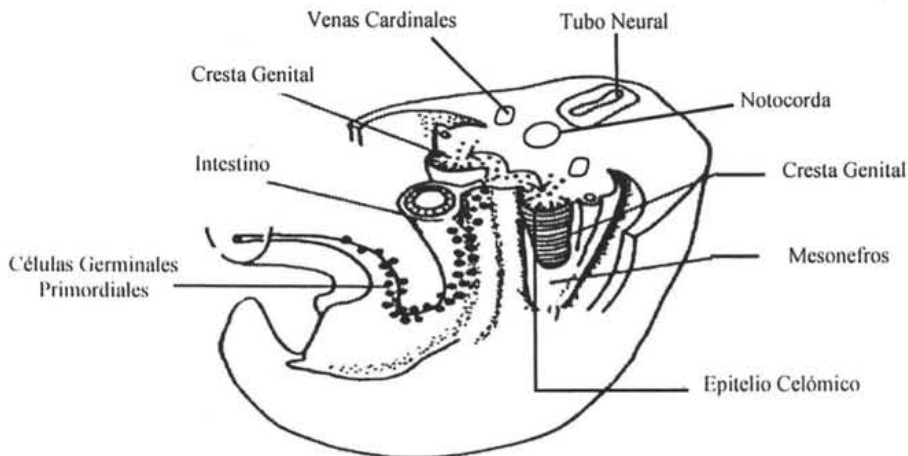


Fig. 1. Se muestra la migración de las células germinales primordiales hacia la cresta genital. Modificado de Sandler y Lagmann, Embriología Médica, 1990.

Ambas líneas celulares, experimentan un alto índice de proliferación, formándose la cresta genital. Esta región posteriormente es invadida por vasos sanguíneos y células germinales primordiales (CGPs), estas últimas provenientes de la región del endodermo del saco vitelino (Fig. 1) (Merchant, 1991). Durante el desarrollo de estas estructuras, se ha propuesto la intervención de algunos genes como: *WT1*, *Lim -9*, *SF-1*, *steel*, *c-kit* y *Bmp4*, entre otros, que permiten la llegada de las CGPs hacia la cresta genital (Stot y Wylie, 1986).

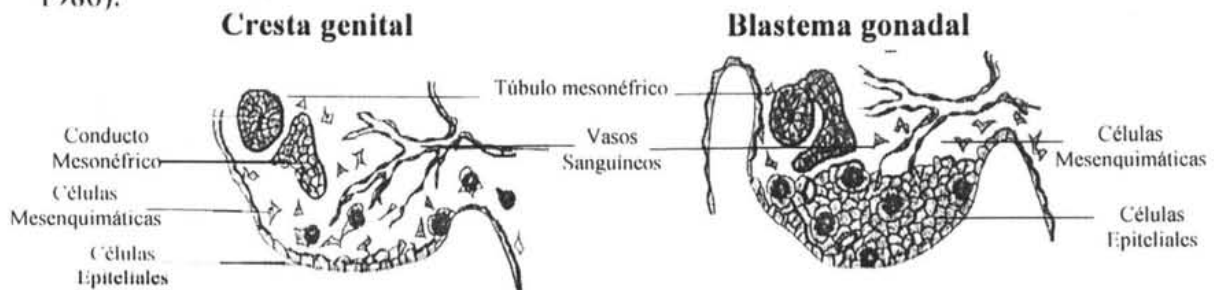


Fig. 2. Desarrollo temprano de la gónada. Organización de la cresta genital y el blastema gonadal. Merchant, 1991.

El conjunto de las CGPs y la proliferación de las células somáticas forma el blastema gonadal (Fig.2) (Merchant, 1991). En el ratón la formación de la cresta genital ocurre a los 10-10.5 d. g.

b) Establecimiento de la gónada indiferenciada

Después de la formación del blastema gonadal, se establece la gónada indiferenciada la cual se detecta de los 11-11.5 d. g. En esta etapa, las células comienzan a condensarse y a separarse del epitelio por la invasión de los vasos sanguíneos; de esta manera se forman dos compartimentos, uno epitelial y otro estromal (Fig. 3). El primero contiene a las células epiteliales y CGPs que formarán a los cordones sexuales y el segundo compartimento contiene a las células mesenquimáticas, vasos sanguíneos y fibroblastos que darán origen al componente intersticial (Merchant y Moreno, 2001).

Gónada indiferenciada

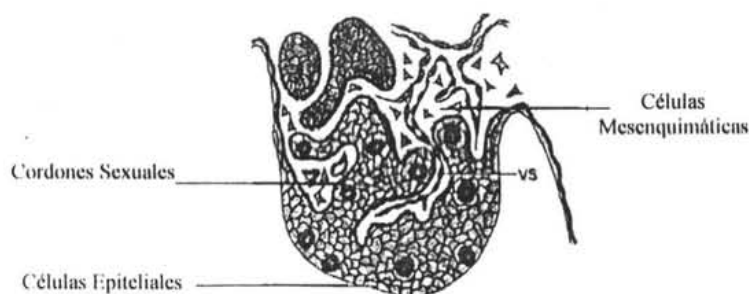


Fig. 3. Muestra la separación de los cordones sexuales. Merchant, 1991.

Tanto en las hembras como en los machos, los cambios morfológicos que ocurren para el establecimiento de la cresta genital, blastema gonadal y gónada indiferenciada son los mismos.

c) Diferenciación sexual

Una vez establecida la gónada indiferenciada, el siguiente cambio morfológico en el testículo es la invasión de los vasos sanguíneos que separan al epitelio celómico de los cordones sexuales. Este cambio es provocado por los genes encargados de la diferenciación hacia testículo, algunos de estos se enlistan en la tabla 1:

Tabla 1. Genes que participan en el desarrollo gonadal

Gen	Sexo	Función
<i>Sry</i>	M	Participa en la diferenciación del testículo
<i>Wtl</i>	M F	Establecimiento de gónadas e hígado. Posible regulador de <i>Sry</i>
<i>Sox9</i>	M	Diferenciación de células de Sertoli y desarrollo del testículo
<i>MIS</i>	M	Regresión de los conductos de Müller
<i>Sfl</i>	M	Participa en la diferenciación y producción de esteroides
<i>Dhh</i>	M	Desarrollo de células germinales
<i>Fgf9</i>	M	Proliferación en testículo
<i>Dmrt1</i>	M	Mantiene a los tubos seminíferos después del nacimiento
<i>Igfl</i>	M F	Participa en la proliferación, diferenciación y producción de esteroides

Villalpando, 2001; Tilman y Capel, 2002

El primer gen en expresarse en el testículo es el gen que codifica para la hormona inhibidora de los conductos de Müller (MIS), la cual inhibe el desarrollo de los conductos del mismo nombre, y permite la masculinización de la gónada y el desarrollo de los genitales internos (vesículas seminales, conductos eferentes y deferentes y epidídimo) y externos (glante, rafe y escroto) (Fig.4) (Merchant, 1991).

Posteriormente, los cordones sexuales cambian su nombre a cordones seminíferos, que contienen a las células precursoras de Sertoli y pre-espermatogonias. Por otro lado, las células mesenquimáticas se diferencian en las células precursoras de Leydig; con la diferenciación de estas se inicia la actividad endocrina del testículo (producción de testosterona); todos estos cambios ocurren al 12 d. g. (Merchant, 1984).



Fig. 4. Diferenciación de los genitales internos y externos. Merchant, 1991.

2. Factor de Crecimiento Similar a la Insulina Tipo I (IGF-I)

a) Organización del gen

El gen del IGF-I en el ratón se localiza en el cromosoma 10, este gen está altamente conservado en los mamíferos, debido a que entre especies varía el número de promotores de 2 a 3. El IGF-I está constituido por 6 exones, 5 intrones, dos promotores y tiene una longitud de 80 kilobases (Fig.5) (Bell y col. 1986). Se ha propuesto que el primer promotor es el responsable de la transcripción del IGF-I en mamíferos (Adamo y col. 1994; Rotwein, 1999).

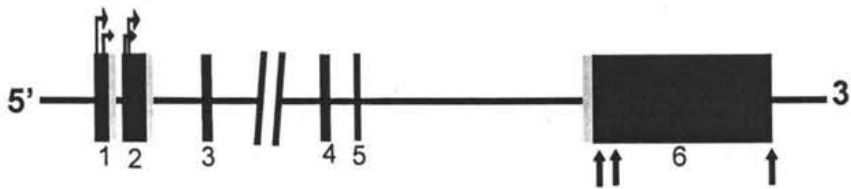


Fig. 5. Estructura del gen del IGF-I de la rata, cuya organización es similar a la del ratón. Los números corresponden a los exones y el espacio entre ellos al de los intrones. Rotwein, 1999.

b) Organización de la proteína

El péptido codificado por el gen del IGF-I es una cadena sencilla de 70 aminoácidos (a.a.) y está constituida por 5 dominios. El dominio B, contiene 29 a.a. y la región amino terminal (N). El dominio central C está formado por doce residuos, el dominio A está constituido por 21 a.a. y el dominio D con 8 residuos y la región carboxilo terminal (C). Además, contiene dos secuencias adicionales en la región terminal C, el IGF-IA, que contiene 35 a.a. y el IGF-1B con 77 a.a., ambas secuencias conforman el dominio E (Zapf y Froesch, 1986; Daughaday y Rotwein, 1989).

Los tres primeros dominios (A, B y C) son idénticos a los presentes en el péptido de la insulina, de esta forma, se considera al dominio D exclusivo del péptido del IGF (Fig. 6).

c) Proteínas de unión

A diferencia de la insulina, el IGF-I no se encuentra libre en el torrente sanguíneo sino que es transportado por proteínas específicas llamadas IGFBPs (proteínas de unión de los factores de crecimiento similares a la insulina); las cuales tienen diferentes funciones:

- a) Prolongar la vida media de los IGFs (Perrard-Sapori y col. 1987).
- b) Funcionar como reguladoras de diferentes respuestas fisiológicas (Clemmons, 1993).
- c) Conducir al IGF-I a los tejidos o células blanco (Clemmons, 1993).
- d) Potenciar o suprimir la acción del IGF-I, debido a que regulan el acceso a los receptores de membrana (Zapf y Froesch, 1986).

En la actualidad se conocen 10 tipos de IGFBPs, sin embargo, solo se han caracterizado 6 miembros, debido a que la cantidad en el espacio intracelular es baja (Clemmons, 1993). A diferencia de la insulina, las IGFBPs pueden ser usadas en concentraciones fisiológicas, y conservan una alta afinidad y especificidad al receptor (Bayne y col. 1988).

El IGF-I es considerado un mitogénico débil, sin embargo, cuando se adiciona la IGFBP-I en células porcinas, se potencia la síntesis de DNA en respuesta al IGF-I, de manera similar a la respuesta de estas células con suero (Elgin y col. 1987).

Los residuos de aminoácidos del IGF-I que se unen a las IGFBPs están presentes en la región amino terminal de 16 amino ácidos. El 95% del IGF-I que se encuentra en el suero, está unido a la IGFBP-3 (Baxter y Martin, 1989); el resto está unido a las IGFBP-1, 2 y 4 (Clemmons, 1993).

3. Receptor del IGF-I

a) Organización del receptor

El receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-IR), es una proteína que pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa transmembranales, la cual incluye al receptor de insulina (IR). El gen de IGF-IR, consta de 4989 nucleótidos y codifica para 1367 a.a. (Adams y col. 2000). Además, contiene un péptido señal de 30 residuos (residuos 1-30) y una proteasa que rompe en un sitio de unión a los residuos 708-711, originando dos cadenas: una cadena α (residuos 1-707) y una cadena β (residuos 712-1337). La primera y 195 residuos de la cadena β forman la porción extracelular del IGF-IR, que contiene de 5 a 11 sitios potenciales de glicosilación en la región terminal amino (Ullrich y col. 1986). Este receptor, se une con alta afinidad al IGF-I e inicia la respuesta fisiológica para este ligando *in vivo*. Aunque los ligandos de esta familia de receptores (insulina e IGF-I) comparten una estructura tridimensional común, la característica que separa al IGF-IR de los otros miembros de la familia del receptor de insulina, es que se encuentra en la superficie celular como una unión bisulfato dimerizado y requiere de una oligomerización del receptor para la señalización celular (Le Roith y col. 1995).

El IGF-IR, es responsable de los efectos mitogénicos del IGF-I durante el desarrollo fetal, de la proliferación de las células somáticas; y protege a las células de la muerte celular programada o apoptosis (Baker y col. 1993), así mismo, se le considera un promotor de tumores (Adams y col. 2000).

b) Cascada de señalización

La cascada de señales del IGF-IR, se inicia con la unión de éste a su ligando (IGF-1). Esta unión provoca una fosforilación del sustrato del receptor-1 para la insulina (IRS-1) (Clemmons y Maile, 2003). Este contiene un sitio de reconocimiento que sirve de unión a proteínas con dominios de homología 2 SHC, este dominio recibe este nombre por ser similar con la región 2 de la cinasa de tirosina del oncogen src (sarcoma de Rous de las aves). Este sitio le permite al IRS-1 unirse a dos proteínas que activan diferentes vías. La primera es la p85 de la quinasa fosfatidil inositol y la segunda es el Grb-2 (receptor de la proteína de unión 2) que se encuentra unida a IGF-IR. P85 forma el complejo p85/p110 que induce la producción de trifosfato inositol que participa como regulador de la mitosis y el crecimiento celular. Por otro lado, Grb-2 activa al gen RAS (miembro de la familia de GTPasas, estimula la cascada de fosforilación de las células, Alberts y col. 1996). Se ha propuesto que este gen está implicado en la diferenciación celular (Fig.7) (Villalpando, 2001).

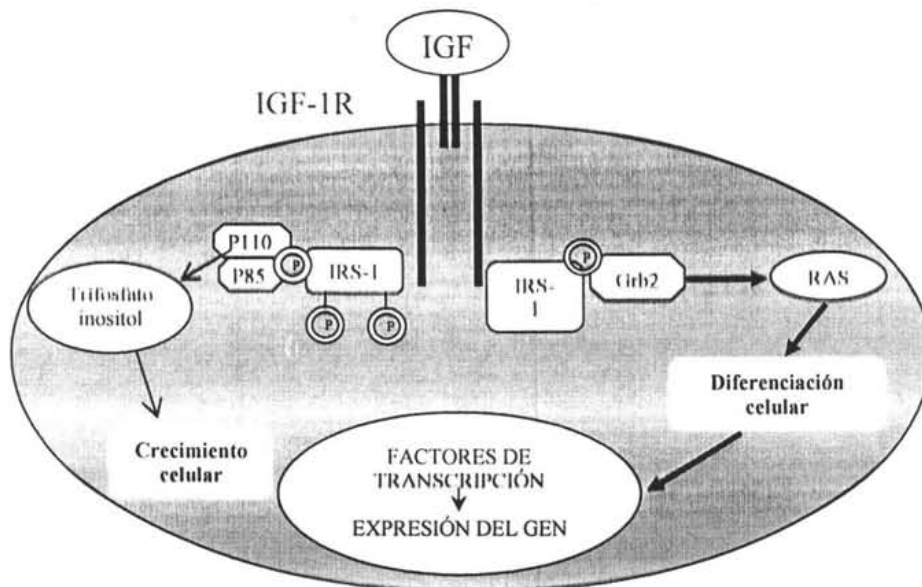


Fig. 7. Cascada de señalización vía IGF-1/IGF-IR. Modificado de Clemmons and Maile, 2003.

La señalización a través del IGF-IR es la vía responsable para el crecimiento somático en la etapa fetal de los mamíferos, mientras que el crecimiento postnatal de los animales se atribuye a la interacción de la hormona del crecimiento y al IGF-I y II (Adams y col. 2000).

c) Detección en tejidos

El IGF-IR, se expresa en varios tipos celulares, como son: fibroblastos, mioblastos, células del músculo liso y tejido vascular (Adams y col. 2000). Así mismo, se detecta en células del mesénquima, incluyendo células de la granulosa y células testiculares en donde se produce y se almacena (Vanneli y col. 1988). Varios de los tipos celulares mencionados, tienen solamente 5,000- 10,000 receptores de IGF-I por célula, y esto puede ser una razón por la que este factor de crecimiento sea considerado un mitogénico débil para algunos tipos celulares en cultivo (Clemmons, 1993).

4. Control de la proliferación en tejidos

a) Ciclo Celular

La proliferación celular involucra eventos de replicación y división del material genético; dichos eventos se llevan a cabo en 24 horas durante el ciclo celular. Este consiste de cuatro fases G1, S, G2 y M; en las cuales, la célula replica su material genético, se divide y se inicia un nuevo ciclo. Además de las anteriores algunas células como las mioides y las nerviosas tienen una fase denominada G0 en las cuales las células permanecen en reposos por días, meses e incluso años hasta el inicio de un nuevo ciclo. En la fase G1, la célula se prepara para la replicación del ADN, incrementa su tamaño y poco después se inhibe la actividad de señalización de crecimiento y se determina la entrada de la célula en el ciclo. Después, en la fase S, se inicia la producción de algunas proteínas, como las histonas que participan en la formación de la cromatina y las enzimas que sintetizan ácidos

desoxirribonucleicos y replican el ADN. En la fase G2, se completa la replicación del material genético y se revisa el entorno de la célula para su división. Durante la fase M, el material genético replicado, se condensa y se separa, primero en dos núcleos y después, por citocinesis, en dos células (Bravo y Mac Donald –Bravo, 1987; Alberts y col. 1996).

El ciclo celular, es regulado por factores de crecimiento, genes y proteínas, principalmente por las cinasas dependientes de ciclina (cdks). Estas forman un complejo con las ciclinas y juntas son las encargadas de regular la entrada, transición y salida de las células por las diferentes fases del ciclo celular (Johnson y Walker, 1999).

Existen dos tipos de ciclinas: las ciclinas mitóticas las cuales se encuentran y se unen a las cdks en la fase G2 y son necesarias para entrar a la mitosis; y las ciclinas G1, que se unen en esta fase a las cdks y son requeridas en la fase S (Alberts y col. 1996) (Tabla. 2).

Tabla 2. Ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas

Ciclina	Cdk Asociado	Función
A	Cdk1 (cdc2), cdk2	Entrada a la fase S y transición. Anclaje dependiente del crecimiento.
B1, B2	Cdk1	Salida de G2, mitosis.
C	Cdk8	Regulación transcripcional y transición de G0 a S
D1, D2, D3	Cdk4 cdk6	Transición de la fase G0 a S
E	Cdk2	Transición de la fase G0 a S
F	??	Transición de la fase G2 a M
G1, G2	Cdk5	Respuesta al daño del DNA
H	Cdk7	Activación de los cdks, regulación transcripcional y reparación del DNA.
I	??	desconocido
K	??	Regulación transcripcional y activación de los cdks.
T1, T2	Cdk9	Regulación transcripcional.

Tomada de Johnson y Walker, 1999.

Además, de las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclina existen otros genes y proteínas que se expresan a lo largo del todo ciclo celular (Fig. 8); algunos de estos factores inhiben o potencian la activación de las ciclinas, principalmente los miembros de la familia Cip/Kip (inhibidores de las cdk's en la fase G1 y S) y factores de crecimiento como el IGF-I (Johnson y Walker, 1999).

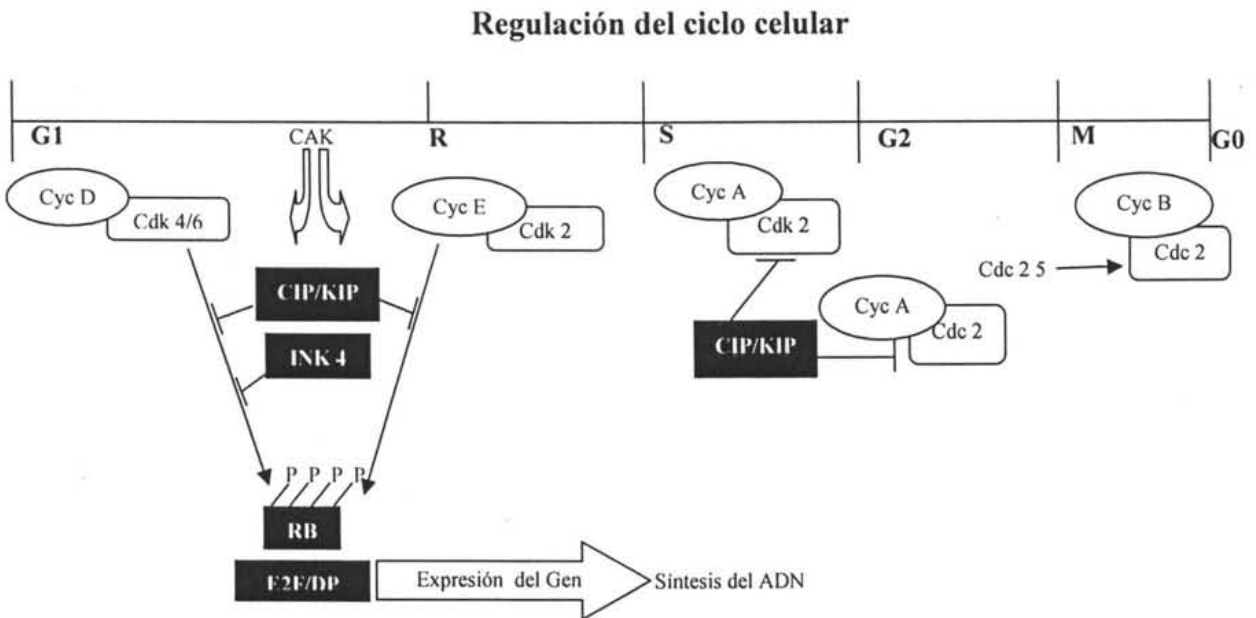


Fig. 8. Función del complejo ciclina/cdk, y estimulación e inhibición de su actividad por otras proteínas. G1= primera fase de crecimiento; R = punto de restricción; S = fase de síntesis; G2 = segunda fase de crecimiento; M = fase de división; G0= fase de reclutamiento en algunas células (miocitos y nerviosas). Modificado de Robker y Richards, 1998.

b) Papel del IGF-I

El IGF-I es producido en varios tejidos del humano, rata y ratón (Zapf y Froesch, 1986), tanto en la etapa adulta como en la prenatal. Este péptido juega un papel importante en el metabolismo y crecimiento y tiene varias funciones dentro del organismo como son:

- Funciones similares a la insulina: Participa en la síntesis de glicógeno y reduce la concentración de glucosa en la sangre (Rotwein, 1999).
- Estimula la síntesis de ADN (Spaventi y col. 1990; Villalpando, 2001).
- Participa en el desarrollo y crecimiento de órganos (Rotwein y col. 1999).

- Participa en la supervivencia, proliferación y diferenciación celular (músculo, hígado, hueso, células somáticas de testículo y espermatogonias) (Spaventi y col. 1990; Baker y col. 1993; Liu y col. 1993, Alberts y col. 1996).
- Regula la esteroidogénesis embrionaria (Lin y col. 1987 y 1990; Habert y Bisgnaschi, 1991; Chuzel y col. 1996; Villalpando y López, 2003).

- **Células gonadales**

En experimentos realizados en ratones knock-out para el IGF-I, se demostró la importancia de este factor en la función testicular. Se observó que los machos adultos producen baja cantidad de testosterona, menor número de espermatozoides y el testículo es de menor tamaño, comparado con los animales normales (Baker y col. 1996). Además, se ha visto que la adición de IGF-I a cultivos de células de la granulosa y células testiculares (Leydig y Sertoli), en presencia de FSH y LH, incrementa la biosíntesis de hormonas sexuales como progesterona, testosterona y 17 β -estradiol; y estimula la incorporación de (^3H) timidina en el ADN en diferentes especies de mamíferos (Borland y col. 1984; Kasson y Hsueh, 1987; Morera y col. 1987; Chatelain, 1990; Wang y col. 2003). Por otro lado, Roullier-Fabre y col. (1998) observaron que en la etapa fetal de la rata (18 d. g.) 50 ng del IGF-I no inducen la proliferación de las células somáticas del testículo, sin embargo otros estudios hechos en ratón, muestran que esta proteína si tiene efecto en la proliferación de las células testiculares (Bernier y col. 1986; Wang y col. 2003).

- **Células no gonadales**

El IGF-I se expresa en las primeras etapas de la organogénesis del ratón (8-12 d.g.) (Spaventi y col. 1990) e induce la proliferación en varias líneas celulares (osteocitos y condroblastos) y en órganos del ratón embrionario de 17d.g., como son: vejiga, intestino, corazón, cerebro, riñón, hígado y pulmón (D'Ercole, 1996; Zapf y Froesch, 1986). Se ha visto que la falla en la activación del gen del IGF-I da como resultado deficiencia del crecimiento del embrión, manifestándose como enanismo en el nacimiento, y daño en el crecimiento postnatal e infertilidad en el ratón (Baker y col. 1993; Liu y col. 1993)

Además, Powell-Braxton y col. (1993), observaron que, en ratones prenatales con deficiencia del IGF-I (homocigóticos IGF-/-), se presenta una miodistrofia (enfermedad que se caracteriza por poco desarrollo del tejido muscular), con disminución en el tamaño del cuerpo y dificultad respiratoria. Esta última por daño en el desarrollo alveolar; provocando así la muerte en los ratones al poco tiempo de nacer. Por lo anterior, se propone que el IGF-I es esencial para un crecimiento prenatal normal y además afecta sustancialmente la sobrevivencia, lo cual soporta la importancia de este péptido en el desarrollo de sistemas orgánicos, como el músculo-esquelético y el respiratorio (Zapf y Froesch, 1986).

c) **Ciclina D2**

Las ciclinas tipo D se encuentran en la fase G1 y en asociación con las proteínas cinasa, cdk 4 y cdk 6, son las encargadas de la transición del punto G0 hasta la fase S. Estas proteínas son capaces de unirse y regular a otras proteínas celulares llamadas E2F, que intervienen en la expresión de genes y proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular y síntesis del DNA (las ciclinas E y A, cdc2 y cdk1) (Bernier y col. 1986; Johnson y Walker, 1999) en varias líneas celulares del ratón (Ravnik y col. 1995). Su función principal es activar a

una proteína llamada Rb (retinoblastoma) que juega un papel crucial en la regulación de la progresión de G1 (Xiong y col. 1992; Johnson y Walker, 1999).

Actualmente se conocen tres clases de ciclinas tipo D: D1, D2 y D3, las cuales se expresan en varios tipos celulares y participan en diversas funciones de diferenciación y proliferación (Ravnik y col. 1995; Beumer y col. 2000). Por ejemplo, en algunos estudios se ha observado la producción de tres transcritos de 4.2, 6.8, y 2.3 kb, identificados como las ciclinas D1, D2 y D3 respectivamente. Estos transcritos son expresados en las células somáticas y germinales del testículo tanto embrionario como post-natal (Ravnik y col. 1995), lo cual sugiere que las ciclinas tipo D están involucradas en los eventos de proliferación y diferenciación que ocurren durante la espermatogénesis. En los trabajos realizados por Beumer y col. (2000), la presencia de la ciclina D2 en las células germinales, parece participar durante la diferenciación de las espermatogonias indiferenciadas a espermatogonias tipo A. Además el ratón deficiente de ciclina D2, la hembra es estéril debido a una incapacidad de las células de la granulosa de responder a un estímulo de la FSH (Ravnik y col. 1995; Beumer y col. 2000), y el macho muestra hipoplasia en el testículo (Bartkova y col. 1999; Beumer y col. 2000).

Es importante notar que la función de las ciclinas tipo D depende de la presencia de factores de crecimiento como el IGF-I (Johnson y Walker, 1999), hormonas (FSH, Sicinski y col. 1996) y otras proteínas. Por ejemplo, la proliferación de las células de la granulosa es inducida por el aumento de la ciclina D2 en relación con la concentración de la proteína p27^{Kip1} y el crecimiento folicular finaliza por una disminución de la ciclina D2 y una sobreexpresión de p21^{Cip1/WAF} y p27^{Kip1} (Baker y col. 1996). En adición, en el testículo adulto la ciclina D2 se localiza junto con p21^{Cip1/WAF} en los espermatocitos en paquiteno y la ciclina D3 se localiza con p27^{Kip1} en células de Sertoli. La localización de estas proteínas sugiere

que el balance entre las ciclinas tipo D y los Cip/Kip puede ser importante para el comportamiento de estos tipos celulares, durante el desarrollo testicular (Ge y Hardy, 1997; Beumer y col., 2000). Por otro lado la concentración de las ciclinas tipo D también es dependiente del tejido en donde se exprese (abundante en macrófagos y fibroblastos) (Ravnik y col.1995).

5. Aspectos de regulación de IGF-I

a) Hormonas hipofisarias

La hipófisis, también llamada glándula pituitaria secreta hormonas que son las responsables de activar y regular la producción de otras hormonas en sus órganos blanco. Esta glándula, está formada por tres lóbulos: el anterior e intermedio, los cuales forman la región secretora llamada adenohipófisis, en donde se producen seis diferentes hormonas que tienen diversas funciones en el organismo; y el lóbulo posterior que es conocido como neurohipófisis, este último está constituido de tejido nervioso. La función de la hipófisis está controlada por la acción del hipotálamo que en respuesta a estímulos internos y externos secreta hormonas como la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), que actúan en el lóbulo anterior o adenohipófisis. En este trabajo solo se mencionan aquellas hormonas que intervienen en la regulación del IGF-I y la ciclina D2, entre las cuales se encuentran las gonadotropinas (FSH y LH) y la hormona de crecimiento (GH) (Brown, 1994):

- **Hormona de crecimiento.** Es conocida como somatotropina u hormona somatotrópica. Esta es producida por las células somatotropas y promueve el crecimiento en todas las células corporales, estimulando a los factores de crecimiento, que intervienen en la proliferación celular del hígado.

- **Hormona folículo estimulante.** Participa en el desarrollo de las gónadas, los gametos y en la secreción de las hormonas sexuales gonadales de ambos sexos. En macho adulto estimula la espermatogénesis y actúa en las células de Sertoli para la producción de la inhibina que inhibe a la FSH.
- **Hormona luteinizante.** En los machos, esta hormona actúa en las células de Leydig para favorecer la producción de andrógenos, tales como la testosterona. En la hembra, estimula la ovulación y la formación del cuerpo lúteo que produce progesterona.

Estas dos hormonas son producidas por las células gonadotropicas, por lo que se les conoce como hormonas gonadotropicas o gonadotropinas (Brown, 1994).

Estas hormonas, junto con el IGF-I y la ciclina D2, participan en el desarrollo y proliferación de las células somáticas y germinales del testículo en la etapa pre- y post natal. Ejemplo claro de esto son los trabajos de Borland y col. 1984; Kasson y Hsueh, 1987; Morera y col. 1987; Chatelain, 1990; Ravnik y col. 1995; Sicinski y col. 1996; Beumer y col. 2000; Wang y col. 2003. Estos autores observaron que la carencia del IGF-I y la ciclina D2 en el ratón, causa esterilidad en la etapa adulta, además de malformaciones en el organismo. Por otro lado, se sabe que la FSH y LH regulan la función testicular postnatalmente (Abney y Carswell, 1986; Benhamed y col. 1987; Benton y col. 1995). Se ha visto que la adición de IGF-I a cultivos de células de la granulosa y células de Leydig, en presencia de FSH y LH incrementa la biosíntesis de hormonas sexuales como progesterona, testosterona y 17 β -estradiol, en diferentes especies de mamíferos (Kasson y Hsueh, 1987; Morera y col. 1987; Chatelain, 1990; Wang y col. 2003).

Los testículos en cultivo con IGF-I incrementan la producción de testosterona durante el desarrollo testicular y se detectan altas concentraciones al día 17 de gestación (Villalpando y López-Olmos, 2003). Estudios recientes realizados en células de Leydig de ratón adulto de 35-50 días postparto demostraron que el RNAm y la síntesis de testosterona son bajas en ausencia del IGF-I (Wang y col. 2003).

b) Hormonas esteroides

El IGF-I también es un importante regulador de la actividad y expresión de enzimas que participan en la biosíntesis de esteroides sexuales, pues induce la expresión de enzimas esteroidogénicas como 17 α -hidroxilasa y 17 β -oxidoreductasa en la gónada. En rata, el IGF-I participa en la proliferación, diferenciación y sobrevivencia de las células productoras de 3 β -hidroesteroide dihidrogenasa (3 β -HSD) a los 16.5 d. g. Roullier-Fabre y col. (1998).

c) Segundos mensajeros

La adenilato ciclasa (AMPC) es un segundo mensajero mitogénico acoplado al receptor de FSH. Sin embargo, este no participa en la regulación de la vía de activación de la ciclina D2 en células ováricas. Debido a que en las células de la granulosa esta ciclina, es activada por la vía PKA (proteína cinasa A) (Sicinski y col. 1996).

d) Otros factores que regulan la función testicular

Entre los factores de crecimiento que regulan la división celular se encuentran: el factor de crecimiento de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), la interleucina-2 y -3, factor de crecimiento neuronal (NGF) y la eritropoyectina.

Estos estimulan la proliferación y supervivencia de las células de varios tejidos, tanto en la etapa adulta como en la embrionaria (Alberts y col. 1996).

Alternativamente, altas concentraciones del factor TGF- β producido por el testículo embrionario puede inhibir la actividad enzimática de las células de Leydig fetales en el ratón, entonces se ha propuesto que la TGF- β inhibe la producción de testosterona en células testiculares en cultivo (Closser y col. 1989).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante la determinación sexual testicular ocurren una serie de cambios en este órgano como el aumento en tamaño y la enorme irrigación del testículo comparado con el ovario de los 12-18 d.g. Este proceso posiblemente es regulado por diferentes factores, sin embargo hasta ahora, no se ha establecido el mecanismo. Estudios realizados en ratones adultos demostraron que en los mutantes del IGF-I y de la ciclina D2, se afecta el desarrollo de las glándulas reproductoras. Sin embargo la función en las células somáticas pre Sertoli y pre Leydig del testículo embrionario no se ha investigado. Actualmente se sabe poco sobre la acción del IGF-I y de la ciclina D2 en la etapa embrionaria y el papel que éstos tienen en la diferenciación de las células somáticas del testículo.

Por otro lado, hay evidencias experimentales que proponen que el IGF-I, es un regulador de la diferenciación de las células precursoras de Leydig en la rata Wistar, aunque en el ratón se desconoce el papel que juega esta proteína en la diferenciación testicular. Además, se sabe que el IGF-I es un regulador importante del control de la actividad endocrina testicular, pues induce la expresión de enzimas esteroideogénicas como 17 α -hidroxilasa y 17 β -oxidoreductasa en el testículo embrionario del ratón y en otras especies en la etapa adulta. Sin embargo, el mecanismo no se conoce actualmente. Con base en los antecedentes expuestos, en la presente tesis se evaluó el efecto de IGF-I y de la ciclina D2 en la proliferación y la actividad endocrina del testículo embrionario. Estos datos nos permitirán proponer las bases para entender la función testicular en la etapa prenatal.

IV. HIPÓTESIS

El crecimiento testicular embrionario es controlado por múltiples factores entre estos el IGF-I, que se sabe induce la proliferación y diferenciación de células de Leydig y participa en la biosíntesis de esteroides gonadales en los mamíferos. Por lo tanto postulamos que la inhibición del IGF-I y de la ciclina D2 *in vitro* impediría la proliferación de las células somáticas (Leydig y Sertoli) del testículo embrionario. De tal forma que la inhibición de estas dos proteínas provocaría una disminución en el número de células somáticas y esto a su vez una disminución en la biosíntesis de hormonas sexuales como la testosterona.

V. OBJETIVOS

Establecer el papel del IGF-I en la diferenciación, crecimiento y en la regulación de la actividad endocrina del testículo en la etapa embrionaria.

Objetivos particulares

1. Determinar si la inhibición de la producción endógena del IGF-I afecta la diferenciación y proliferación de las células somáticas del testículo embrionario de 12 y 17 d. g. en el ratón de la cepa CD-1.
2. Establecer el papel que juega la ciclina D2 en combinación con el IGF-I en la proliferación y función endocrina de las células de Leydig, en las edades mencionadas.
3. Determinar si la inhibición de la expresión de IGF-I y de la ciclina D2 afecta los niveles de secreción de testosterona.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron machos y hembras de 10 semanas de edad de la cepa CD-1 y se pusieron a cruzar un macho con 5 hembras. El día que se observó el tapón vaginal, se denominó día cero de la gestación. Se emplearon hembras gestantes de 12 y 17 d. g. de la cepa CD-1, y se mantuvieron en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas en cajas estériles con Sani-Chips de Harlan, con períodos de 12 hrs de luz-oscuridad y temperatura de 22-23 °C. Las ratonas se alimentaron con Diet Mouse Food de Harlan y agua esterilizada *ad libitum* acidificada con HCl puro (pH 2.5), filtrada por osmosis inversa y esterilizada en autoclave.

Aislamiento de tejido

Las hembras se sacrificaron por dislocación cervical y se realizó un corte en forma de V en la región ventral. Se disectó el útero, se sacaron los embriones en una caja de Petri y se les cortó la cabeza. Se obtuvieron los testículos de los embriones exponiendo la parte dorsal interna del embrión, y se colocaron en cajas Petri estériles con medio de cultivo M199, en un ambiente estéril, de acuerdo al método descrito (Villalpando y López-Olmos, 2003). Posteriormente se transfirieron a un tubo Eppendorf estéril.

Cultivo celular

Se hicieron grupos de 40 testículos de 12 d.g. y de 30 testículos de 17 d.g. Por separado, se disgregaron por técnicas enzimáticas con tripsina 0.05% y versene 0.1% a 90 revoluciones por minuto (rpm) 13 minutos (min); se agregó el inhibidor de tripsina 0.1%. Las células disgregadas se centrifugaron a 1800 rpm por 10 min, se eliminó el

0.1%. Las células disgregadas se centrifugaron a 1800 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 500 µl de medio de cultivo D'MEM con albumina. Se tomó 10 µl, se tiñó con azul de Evans y se cuantificaron las células en una cámara de Neubauer (Fórmula). Se sembraron 150,000 células por caja en medio de cultivo D'MEM con albúmina. Se adicionó a cada 6 cultivos 100ng de los anticuerpos neutralizantes Anti-IGF-I, 6 cultivos con doble neutralización Anti-IGF-I + Anti-Ciclina D2, 6 cultivos con 100ng de Anti-Ciclina D2 y 6 más con Anti-Ciclina D2 50ng y 6 cultivos solo con medio D'MEM con albúmina sin suero, y se incubaron toda la noche en una estufa a 37°C en 5% de CO₂.

Fórmula.

$$\#C/ml = \#Ccm * 2500 * Fd$$

#C/ml = Células por ml de concentrado; #Ccm = Células contadas en el microscopio;

Fd = Factor de dilución igual a 1.

Ensayo de Proliferación Celular

Se cambió el medio de cultivo a las células y se añadió 1 ml de medio de cultivo con Bromodeoxy Uridina (BrdU) al 0.1% y se incubó 1 hora (hr) a 37°C en 5% de CO₂. Las células se enjuagaron y se añadió 750 µl de tripsina 0.05% en versene 0.1% en PBS y se dejaron incubando 6 min a 37 °C, en agitación con 90 rpm en un incubadora con agitación (Incubator Shaker C-24). Las células se resuspendieron suavemente, se observó al microscopio que no quedarán células pegadas, y se agregaron 750 µl de inhibidor de tripsina 0.1% en medio de cultivo D'MEM. Las células se centrifugaron a 1800 rpm, 10 min. El botón celular se enjuagó con PBS, se centrifugó a 1800 rpm, 10 min y se decantó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en un volumen aproximado de 30 µl de PBS y se colocaron 10 µl en un portaobjetos limpio, libre de

grasa, con poli-L-lisina. En un microscopio óptico Galen III Cambrigde Instruments, se analizó el número de células y se dejaron secando en una estufa a 37°C, 30 min. Las células se fijaron en una solución fría de glicina 50 mM en etanol al 70% a -20°C 30 min.

Inmunodetección

Las laminillas se lavaron con PBS en agitación a temperatura ambiente (TA) 10 min y se hizo un lavado adicional con PBS caliente sin ebulir 15 min una vez. Se adicionó, el anticuerpo Anti-BrdU 1:10 en buffer de incubación y se incubó en una cámara húmeda con PBS, 1 hr a 37°C. En la oscuridad se adicionaron, 30 µl del anticuerpo FICT- Goat anti mouse IgG 1:10 en PBS y se incubó 1 hr a 37°C. Posteriormente se lavaron las laminillas con Tween al 0.05% en PBS, 10 min a TA cubriéndolas de la luz. Se enjuagaron dos veces más con PBS 10 min cada una a TA. Las laminillas se dejaron secando a TA 30 min, se montó con un cubreobjetos con Vectashield y se sellaron las orillas con esmalte de uñas. Las laminillas se almacenaron en cajas oscuras a 4°C.

El número de células marcadas con BrdU, se analizó en un microscopio óptico (Nikon Eclipse E600). El frotis celular se dividió en 4 cuadrantes, y solo se contó un campo de cada cuadrante con un lente objetivo de 40X, se completó un número total de 300 células entre las marcadas y no marcadas y se calculó el porcentaje de proliferación.

Extracción de esteroides

En un tubo se tomó un volumen de 1300 µl de medio de cultivo (-20°C) de cada tratamiento, se le añadieron 1300 µl de una solución 1:1 de etanol-cloroformo y se agitaron por 1min en un vortex. Se dejaron reposar un minuto y con una pipeta se recuperó la fase orgánica. Las muestras se lavaron dos veces más con la solución etanol-

cloroformo y se adicionaron 1300 μ l de acetato de etilo y se agitaron por 1 min en un vortex. Se recuperó la fase orgánica y se volvió a lavar con acetato de etilo y se dejó evaporar toda la solución 4 días en una campana de extracción. Los esteroides se resuspendieron en 1300 μ l de PBS estéril.

Cuantificación de testosterona por ELISA

El medio de cultivo celular se guardó a -20°C para cuantificar las hormonas esteroides. Se dejaron templar las muestras experimentales con extracción de esteroides y con medio de cultivo y el kit de ELISA (Diagnostic Systems Laboratorios Inc.). En las celdas marcadas se colocaron 50 μ l de los estándares, controles y experimentales (2 repeticiones) y se les agregaron 100 μ l de la solución del conjugado. Después se agregaron 100 μ l del anticuerpo antitestosterona a cada pozo y se dejó incubando 1 hora a 25°C con agitación de 500-700 r. p. m. Se lavó 5 veces con la solución de lavado (1ml de solución concentrada + 24ml de H_2O destilada), decantando todo el sobrenadante en papel absorbente. Se adicionaron 100 μ l de la solución reveladora (TMB solución cromógena) y se dejaron en una placa de agitación a 500-700 r. p. m. en la oscuridad por 30 min. Se colocaron 100 μ l de una solución 0.2M de ácido sulfúrico y se leyó una vez en un lector Bio Rad 3550 a una absorbancia de 450nm, durante media hora.

Análisis estadístico

Los resultados de la incorporación de la BrdU en las células en división, se analizaron con una prueba Xi cuadrada con $P \leq 0.05$. Y los resultados de la cuantificación de testosterona se analizaron con una prueba de ANOVA y "t" de Tukey, $P \leq 0.05$ con el programa Graph Pad Instat. V2.05 1994.

VII. RESULTADOS

Inicialmente se realizaron varios experimentos para monitorear el crecimiento de las células las cuales crecieron sanas. Posteriormente el crecimiento de éstas *in vitro* con suero, sin suero y con los anticuerpos neutralizantes fue de manera uniforme para todos los casos, como se muestra en la Fig. 9.

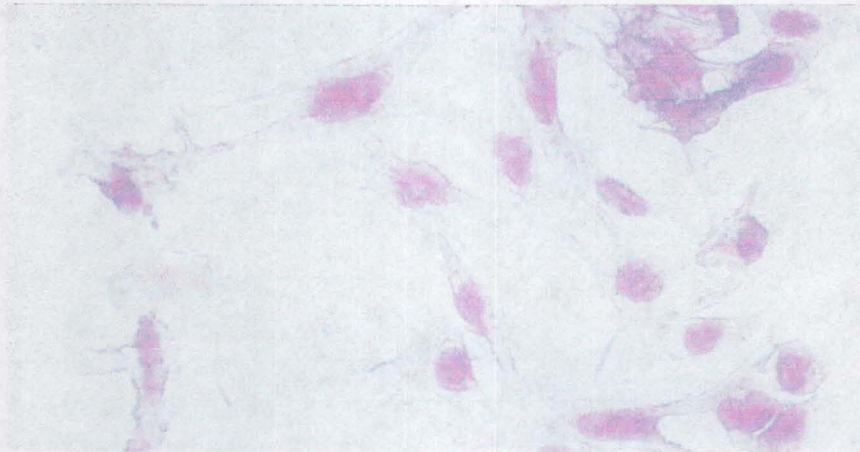


Fig.9.Fotografía que muestra el crecimiento de células testiculares de embrión de ratón de 12 d.g. en medio de cultivo teñido con Giemsa. La fotografía representa el crecimiento de todos los cultivos en las edades estudiadas. 400X.

Una vez recuperadas las células somáticas de los cultivos, se hizo la inmunodetección con BrdU, con el fin de observar la marca de las células en proliferación. Se obtuvo una población heterogénea de células marcadas con la BrdU cuya marca muy intensa (color verde intenso) en el núcleo fue fácil de identificar en las células y la población que no incorporó la BrdU se identificó por una coloración verde (Fig.10).

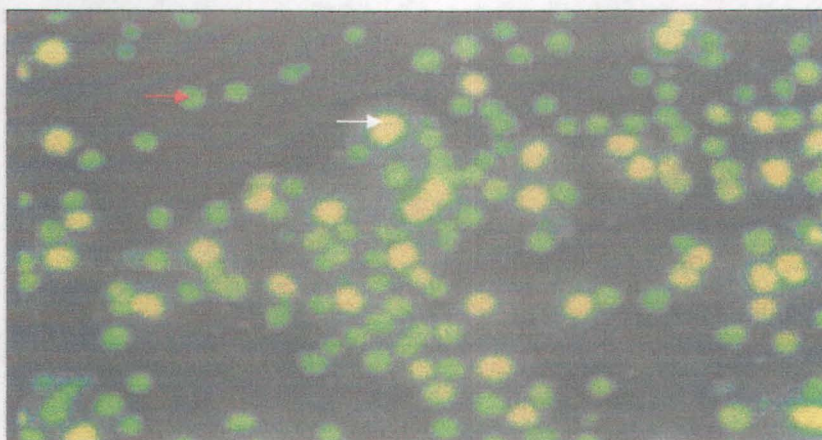


Fig.10. Inmunodetección de células testiculares de embrión de ratón de 17 d.g. Se señalan con una flecha blanca las células marcadas con BrdU y con una flecha roja las células no marcadas. La fotografía es representativa de todas las inmunodetecciones realizadas en las edades mencionadas 200X.

Proliferación de las células testiculares a los 12 d. g.

Los experimentos realizados a los 12 d. g., revelaron que la proliferación de las células somáticas del testículo, disminuyó solamente el 20% y 21% con la adición de los anticuerpos Anti-IGF-I (100ng) y con la doble neutralización con Anti-IGF-I (100ng) + Anti-Ciclina D2 (100ng) respectivamente. Al aplicar la prueba estadística Ji cuadrada no se encontraron diferencias significativas con respecto al control sin suero (73% de células testiculares en proliferación). (Fig 12).

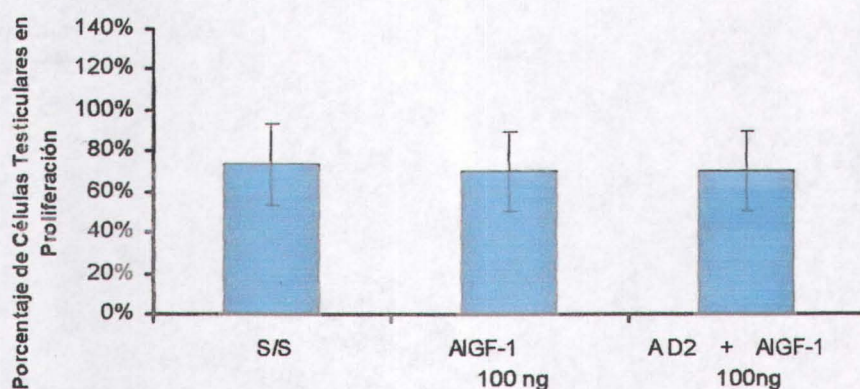


Fig.12. Porcentaje de células testiculares en proliferación a los 12 d. g. Se muestran los porcentajes de células en proliferación de los diferentes grupos tratados. Las barras representan la media de estos porcentajes y el error estándar.

Proliferación de las células testiculares a los 17 d. g.

Los resultados para los experimentos de neutralización en células testiculares de 17 d. g., muestran que la proliferación no disminuyó considerablemente con la adición del Anti-IGF-I (100 ng) con 77% de células testiculares en proliferación. En el experimento de doble neutralización con la adición de Anti-IGF-1 (100ng) + Anti-Ciclina D2 (100ng), tampoco hubo una disminución significativa ya que el 60% de células testiculares están en proliferación, tampoco (Fig. 13)

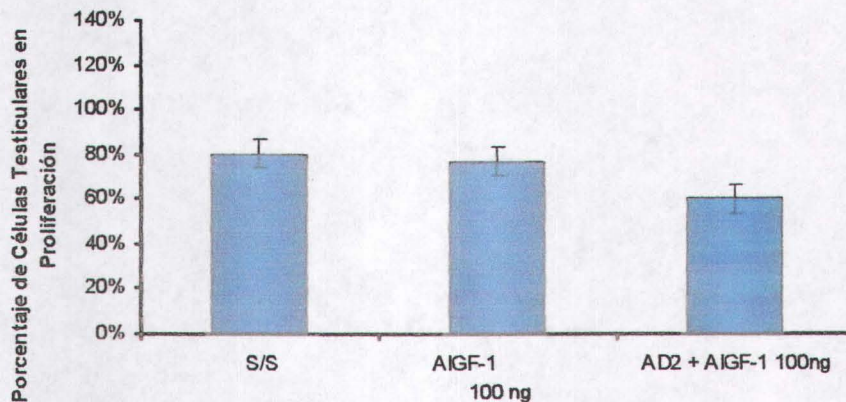


Fig. 13. Proliferación de las células testiculares a los 17 d. g. Se muestra los porcentajes de células en proliferación de los diferentes grupos tratados. Las barras representan la media y el error estándar.

Sin embargo, al aplicar el análisis estadístico solo se encontraron diferencias significativas en los tratamientos de Anti-Ciclina D2 50ng y 100ng, donde la proliferación disminuyó un 46% en comparación con su control (Fig. 14).

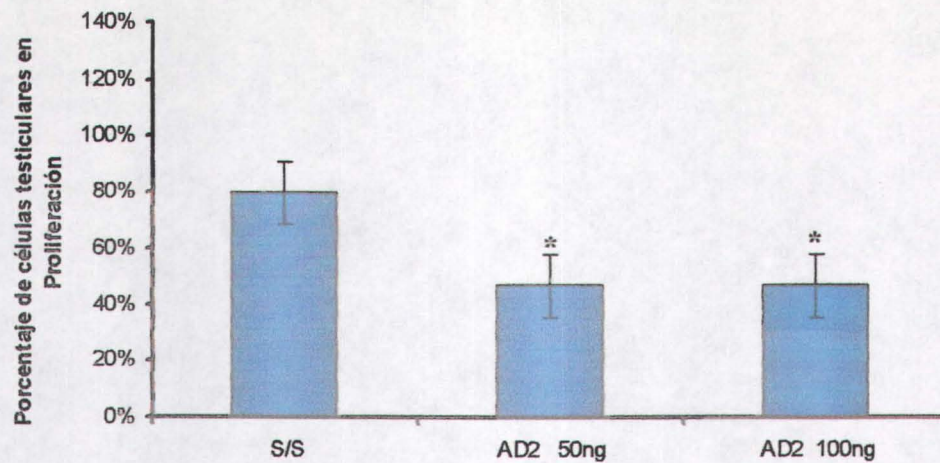


Fig. 14. **Proliferación de las células testiculares a los 17 d. g.** Se muestra los porcentajes de células en proliferación de los grupos tratados con Anti Ciclina D2. Las barras representan la media y el error estándar. * $p < 0.05$ vs control sin suero, (S/S). Prueba Ji cuadrada.

Cuantificación de testosterona por ELISA a los 12 d. g.

Los resultados de la cuantificación de testosterona a los 12 d. g. muestran que hay una disminución significativa de esta hormona con la adición del Anti-IGF-I (1.7 ng de testosterona/ml) y con Anti IGF-I + Anti-Ciclina D2 + (2.5 ng de testosterona/ml), con respecto a su control sin suero (20 ng de testosterona/ml) (Fig. 15).

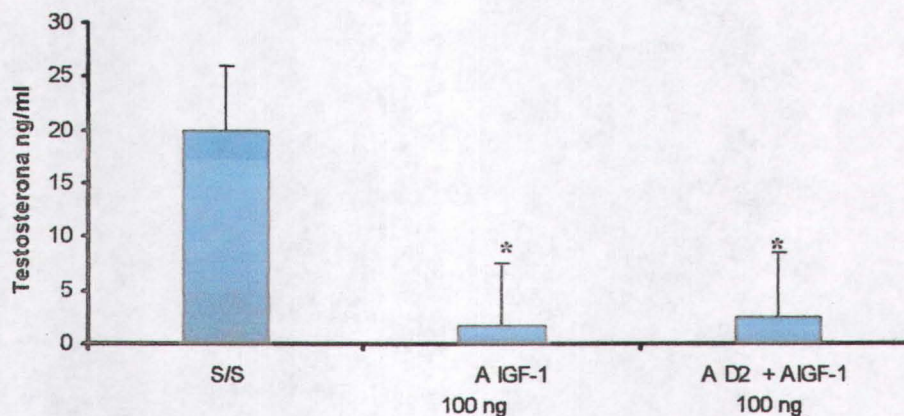


Fig. 15. **Cuantificación de testosterona en células testiculares a los 12 d. g.** Se muestran las concentraciones de testosterona de los grupos experimentales evaluados. Las barras representan la media y el error estándar. * $p < 0.05$ vs control sin suero, (S/S). Prueba ANOVA y Tukey-Kramer.

Cuantificación de testosterona por ELISA a los 17 d. g.

En las células testiculares de 17 d. g. también hubo una disminución en la concentración de testosterona de los grupos experimentales con Anti-IGF-I (45 ng de testosterona/ml) y con los anticuerpos Anti- IGF-I + Anti-ciclina D2 + (43 ng de testosterona/ml) con respecto a su control sin suero. Sin embargo la diferencia no es tan significativa como a los 12 d.g. (Fig. 16).

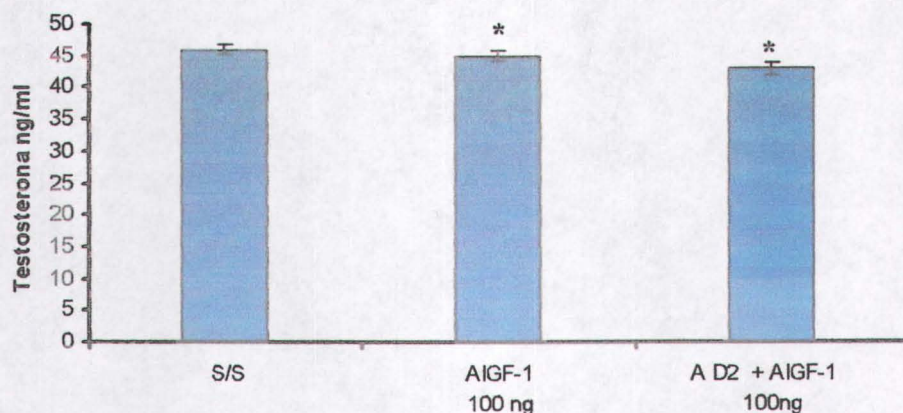


Fig. 16. **Cuantificación de testosterona en células testiculares a los 17 d. g.** Se muestran las concentraciones de testosterona de los grupos experimentales evaluados. Las barras representan la media y el error estándar. * $p < 0.05$ vs control sin suero, (S/S). Prueba ANOVA y Tukey-Kramer.

VIII. DISCUSIÓN

En el presente estudio se describe el efecto del bloqueo de la actividad del IGF-I y la ciclina D2, durante el desarrollo prenatal del testículo del ratón.

Se sabe que el control de la proliferación de las células del organismo es generalmente regulado por moléculas que afectan positiva o negativamente la cascada de cinasas que controlan los puntos críticos del ciclo celular (Johnson y Walker, 1999), entre estos factores se encuentran el IGF-I y las ciclinas D.

Estudios previos plantean que el IGF-I es un mitogénico débil (Elgin y col. 1987); debido a que el número de receptores que se expresan para esta proteína, probablemente se satura (5,000-10,000 receptores del IGF-I por célula). Sin embargo, en otras investigaciones se ha observado que este factor de crecimiento participa en la proliferación y diferenciación celular de la gónada y de otros tipos celulares como: músculo, células del hígado, hueso, células somáticas de testículo y espermatogonias en etapas tempranas del desarrollo (Spaventi y col. 1990; Baker y col. 1993; Liu y col. 1993; Alberts y col. 1996; Roullier-Fabre y col. 1998; Rotwein y col. 1999).

Los resultados de esta investigación muestran que al inicio de la determinación sexual testicular y el crecimiento de este órgano (12 d.g.), el bloqueo endógeno del IGF-I no causó una disminución o inhibición de la proliferación de las células somáticas del testículo. Esto quizás, se debe a que la poca cantidad de IGF-I que es producido en esta etapa se emplearía en la diferenciación de las células precursoras de Leydig, como se ha planteado ocurre en la rata a los 16.5 d. g. (Roullier-Fabre y col. 1998). Esta propuesta se basa en el hecho de que la mitosis se detiene cuando se inicia la diferenciación celular de diferentes estirpes (Gilbert, 1997), ya que en los experimentos de neutralización del IGF-I, se afectó la actividad secretora de las células de Leydig más que la proliferación de las mismas. Este

hallazgo plantea que el IGF-I promueve la diferenciación de las células mesenquimáticas a células secretoras. Aunque sería necesario realizar otros experimentos empleando tejido indiferenciado o líneas celulares de origen mesenquimático.

Otros estudios han demostrado que en la etapa adulta del ratón, que la falta del gen que codifica al IGF-I provoca a largo plazo una baja producción de esteroides y espermatozoides, así como un menor tamaño en el testículo (Baker y col. 1996). Nuestras observaciones apoyan la hipótesis de que el IGF-I también es importante para la diferenciación de las células de Leydig y el control de la secreción de testosterona en el testículo prenatal.

Los datos obtenidos a los 17 d. g. en el ratón demuestran que la proliferación no es afectada con la adición del anticuerpo neutralizante Anti IGF-I. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en las células de Leydig de rata realizados por Roullier-Fabre y col. (1998). Este grupo de investigadores menciona que la adición de 50 ng del IGF-I, no indujo la proliferación de las células somáticas del testículo de la rata en los últimos días de la gestación (18 d. g.). En esta especie, la proliferación celular del testículo parece ser dependiente de las gonadotropinas, más que del IGF-I (Roullier-Fabre y col. 1998). Los hallazgos de este grupo sobre la regulación del IGF-I por gonadotropinas en la etapa embrionaria son cuestionables, debido a que el establecimiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónada ocurre posnatalmente (Gilbert, 1997). Sin embargo, otros estudios hechos en ratón muestran que el IGF-I si tiene efecto en la proliferación de las células testiculares adultas (Wang y col. 2003).

Por otro lado, se ha visto que la proliferación en los mamíferos es regulada por las ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (cdks); éstas forman un complejo que permite la

fosforilación de sustratos celulares permitiendo la progresión del ciclo celular (Sherr y Roberts. 1999).

Se ha observado que las ciclinas D son inducidas por estimulación de agentes mitogénicos como el IGF-I (Johnson y Walker, 1999) y sus concentraciones se reducen al disminuir estos (Kozar y col. 2004). Investigaciones recientes realizadas en ratones mutantes para las ciclinas D1^{-/-}, D2^{-/-} y D3^{-/-}, describieron que los ratones sobreviven hasta la mitad de gestación y mueren a los 13.5 d. g. debido a anomalías en el corazón y a una anemia severa (Kozar y col. 2004). En ese estudio no se evaluó el efecto de estas proteínas en la progresión del ciclo celular de las gónadas masculina y femenina. Debido a que Kozar y col. (2004), no observaron ningún efecto sobre la proliferación en los órganos analizados, ellos plantean que deben existir mecanismos alternativos que permitan la progresión del ciclo celular de manera independiente a la regulación por ciclinas.

Se observó que la proliferación de las células somáticas del testículo embrionario de 12 d. g. no se afectó por el bloqueo de la ciclina D2. Sabemos que a los 12 d. g. ocurre la diferenciación morfológica del testículo del ratón, desencadenada por el *Sry* (Tilman y Capel. 2002). Es probable que el proceso de proliferación se dispare hasta los 12.5 d. g. como se ha propuesto en otras especies de roedores (Kerr y Knell, 1988).

Por otro parte, a los 17 d. g. se encontró que hay una inhibición en la proliferación del 46% al adicionar un anticuerpo Anti-ciclina D2. Por lo tanto, estos datos están en desacuerdo con la propuesta de Kozar y col. (2004), quienes plantean que la proliferación en otros tipos celulares en el ratón es independiente del control de las ciclinas D. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que haya otros factores que regulen este proceso fundamental, como: factores de crecimiento, segundos mensajeros (Robker y Richards, 1998), y otras proteínas como p53 y p21^{CIP1/WAF1} (Johnson y Walker, 1999). En este estudio no se evaluó

el efecto de ninguna otra de las proteínas mencionadas aunque sería muy interesante analizar en un futuro.

El papel de las ciclinas en la regulación del ciclo celular se ha estudiado en las espermatogonias y se ha propuesto que las ciclinas D1 y D3 están involucradas en la regulación del ciclo, mientras que la ciclina D2 participa en la diferenciación de espermatogonias (Ravnik y col. 1995; Beumer y col. 2000). En este estudio no se abordó el efecto del IGF-I y de la ciclina D2 en la proliferación de las células precursoras de los gametos, ni se estudiaron aspectos de inducción de la diferenciación de las células reproductoras. Sin embargo, se midió indirectamente la diferenciación de las células somáticas precursoras de Leydig, a través de la secreción de testosterona.

Experimentos realizados con ratones “knockout” para las ciclinas D1, D2 y D3, se describen que en la etapa adulta la carencia de las ciclinas produce esterilidad en la hembra, debido a la incapacidad de responder al efecto estimulador de la FSH (Ravnik y col. 1995; Beumer y col. 2000). La importancia de las ciclinas en la regulación de la proliferación celular en la fase adulta es apoyado por los hallazgos realizados en los ratones mutantes para la ciclina D, debido a que los machos desarrollan hipoplasia testicular (Beumer y col. 2000). Estos datos plantean que las diferentes ciclinas están bajo el control de diferentes factores en la etapa adulta. Así, esperaríamos que diferentes factores regulen este proceso en la etapa embrionaria, pues al final de la gestación (17d.g.) la proliferación se ve afectada con la adición de 100 ng del anticuerpo Anti-ciclina D2. Por otro lado, en el experimento de doble neutralización donde no se tuvo el mismo efecto, es posible que hayan intervenido otras ciclinas u otros factores.

Además en la cuantificación de testosterona para esta etapa, la secreción de esta hormona se ve reducida con el bloqueo del IGF-I, y el efecto se acentúa con la doble neutralización

(Anti-IGF-I + Anti-ciclina D2) aunque no de manera significativa (Fig. 16). Estas observaciones plantean que la ciclina D2 además de participar en la proliferación de las células somáticas, también regula la función secretora de las células de Leydig en conjunto con el IGF-I. Aunque con el hecho de que la ciclina inhiba la proliferación, existe la posibilidad de que esta sola molécula también pueda afectar la producción de testosterona, hecho que sería interesante evaluar en un futuro.

En resumen, estos datos en conjunto nos llevan a pensar que el IGF-I y la ciclina D2 están implicados en la diferenciación funcional de las células de Leydig a los 12 y 17 d. g. y que forman parte del mecanismo que controla la proliferación de las células testiculares.

IX. CONCLUSIONES

- El IGF-I no es un factor de progresión del ciclo celular a los 12 d. g., sino un factor de diferenciación celular.
- A los 17 d. g. el IGF-I participa en la función secretora de las células de Leydig.
- Por lo tanto, el trabajo realizado apoya la hipótesis planteada.

El IGF-I es uno de los probables factores que regulan la diferenciación, proliferación y función de las células somáticas del testículo embrionario. Y así mismo la ciclina D2 regula la proliferación testicular a los 17 d. g.

X. REFERENCIAS

1. ABNEY T. O. y CARSWELL L.S. 1986. Gonadotropin regulation of Leydig cell DNA synthesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 45:157-165.
2. ADAMO M. L., NEUENSCHWAUDER S., LE ROITH D. y ROBERTS C. T. Jr. 1994. Structure, expression and regulation of the IGF-1 gene. In: *Current directions in insulin-like growth factor research*, Le Roith D. y Raizada M. K. (eds) Plenum Press, New York. 1-11.
3. ADAMS T. E., EPA V. C., GARRETT T. P. J. y WARD C. W. 2000. Structure and function of the type 1 insulin like growth factor receptor. *Cell. Mol. Life. Sci.* 57:1050-193.
4. ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K. y WATSON J. D. 1996. *Biología molecular de la célula*. Ed. Omega. 3ª edición: 925-976.
5. BAYNE R. C., APPLEBAUM J., CHICCHI G. G., HAYES N. S., GREEN B. G. y CASCIERI M. A. 1988, Structural analogues of human insulin-like growth factor-I with reduced affinity for serum binding protein and the type II insulin-like growth factor receptor, *J. Biol. Chem.* 263:6233-6239.
6. BAKER J., LIU J. P., ROBERTSON E. J. y EFSTRATIADIS A. 1993. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell.* 75: 73-82.
7. BAKER J., HARDY M. P., ZHOU J., BONDY C., LUPU F., BELLELVE A.R. y EFSTRATIADIS A. 1996. Effects of an IGF-1 null mutation on mouse reproduction. *Mol. Endocrinol.* 10:903-910.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

8. BARTKOVA J., MEYTS E. R., SKAKKEBAEK N. E. y BARTEK J. 1999. D-type cyclins in adult human testis an testicular cancer: relation to cell type, proliferation, differentiation and malignancy. *J. Pathol.* 187:573-581.
9. BAXTER R. C. y MARTIN J. L. 1989, Structure of the Mr 140,000 growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex: determination by construction and affinity labeling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:6898-6902.
10. BELL G. I., STEMPIEN M. M., FONG M. N. y RALL B. L. 1986. Sequences of liver cDNA encoding two different mouse insulin-like growth factor I precursors. *Nucl. Acids. Res.* 14(20):7873-7882.
11. BENHAMED M., MORERA A. M., CHAUVIN M. C. y DE PERETTI X. 1987. Somatomedin C/insulin-like growth factor I as a posible intratesticular regulator of Leydig cell activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 50:69-71.
12. BENTON L., SHAN L. X. y HARDY M. P. 1995. Differentiation of adult Leydig cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 53:61-68.
13. BERNIER M., P. CHATELAIN, J. P. MATHER y J. M. SAEZ. 1986. Regulation of gonadotropin responsiveness and cell multiplication by somatomedin-C and insulin in cultured pig Leydig cells. *J. Cell. Physiol.* 129:257-263.
14. BEUMER T. L., ROEPERS-GAJADIEN H. L., GADEMAN I. S., KAL H. B. y ROOIJ D. G. 2000. Involvement of the D-type cyclins in germ cell proliferation and differentiation in the mouse. *Biol. Reprod.* 63:1893-1898.
15. BORLAND K., MITA M., OPPENHEIMER C. L., BLINDERMAN L. A., MASAGUE J., HALL P. F. y CZECH M. P. 1984. The actions of insulin-like growth factors I and II on cultured Sertoli cells. *Endocrinology.* 114(1): 240-246.

16. BRAVO R. y Mac DONALD –BRAVO H. 1987. Existence of two population of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during cell cycle: association with DNA replication sites. *J. Cell. Biol.* 105:1549-1554.
17. BROWN R. 1994. Classification of the chemical messengers. In: *An introduction to neuroendocrinology*. Cambridge University Press. 1-53.
18. CHATELAIN P., SANCHEZ P. y SAEZ J. M. 1990. Growth hormone and insulin-like growth factor treatment increased testicular luteinizing hormone receptors and steroidogenic responsiveness of growth factor hormone deficient dwarf mice. *Endocrinology*. 128:1857-1862.
19. CHUZEL F., CLARK A. M., AVALLET O. y SAEZ J. M. 1996. Transcriptional regulation of the luteotropin human/chorionic gonadotrophin receptor and three enzymes of steroidogenesis by growth factors in cultures pig Leydig cells. *Eur. J. Biochem.* 139:8-16.
20. CLEMMONS D. R. 1989. Structural and functional analysis of insulin-like growth factors. *British. Med. Bull.* 45(2):465-480.
21. CLEMMONS D. R. 1993. IGF binding proteins and their functions, *Mol. Reprod. and Dev.* 35:368-375.
22. CLEMMONS D. R. y MAILE L. A. 2003. Minireview: Integral membrane proteins that function coordinately with insulin-like growth factor I receptor to regulate intracellular signaling. *Endocrinology*. 144 (5):1664-1670.
23. CLOSSER J., GOTHOT A., SENTE B., SCIPPO M. L., IGOUT A., VANDENBROEK M., DOMBROWICZ D. y HENNEN G. 1989. Pituitary

hormone dependent expression of insulin-like growth factors II and I in immature hypophysectomized rat testis. *Mol. Endocrinol.* 3:1125-1131.

24. DAUGHADAY W. H. y ROTWEIN P. 1989. Insulin-like growth factors II and I. Peptide messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations, *Endocrinol. Rev.* 10:68-91.
25. D'ERCOLE A. J. 1996. Insulin-like growth factors and their receptors in growth. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 25(3):573-590.
26. ELGIN R. G., BUSBY W. H., y CLEMMMONS D. R. 1987. An insulin-like growth factor binding protein enhances the biologic response to IGF-I. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 84:3254-3258.
27. FERON M. L., RIVKIN M., TASCH M., PORTER P., CAROW C. E., FIRPO E., POLYAK K., TSAI L. H., BROUDY V., PERLMUTTER R. M., KAUSHANKY K. y ROBERTS J. M. 1996. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27^{kip1} deficient mice. *Cell.* 85: 733-744.
28. GE R. S. y HARDY M. P. 1997. Decreased cyclin A2 increased cyclin G1 levels coincide with loss of proliferative capacity in rat Leydig cells during pubertal development. *Endocrinology.* 138:3719-3726.
29. GILBERT S.F. 1997. *Developmental biology.* 5^a edition. Ed. Sinauer Ass. Inc. Pub. 915.
30. HABERT R. y BISGNASCHI P. 1991. Developmental changes in vitro testosterone by dispersed Leydig cells during fetal life in rats. *Arch. Androl.* 27:65-71.

31. JOHNSON D. G. y WALKER C. L. 1999. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:259-312.
32. KASSON B. y HSUEH A. 1987. Insulin-like growth factor I augment gonadotrophin stimulated androgen biosynthesis by cultured rat testicular. *Mol. Cell. Endocrinol.* 52:193-201.
33. KERR y KNELL. 1988. The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Develop.* 103:535-544.
34. KOZAR K., CIEMERYCH M. A., REBLE V. I., SHIGEMATSU H., ZAGPZDZPM A., SINSISKA E., GENG Y., YU Q., BHATTACHARYA S., BRONSON R. T., AKASHI K. y SINSISKI P. 2004. Mouse Development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell.* 118 (20): 477-491.
35. LE ROITH D., WERNER H., BEITNER- JOHNSON D. y ROBERTS C. T. 1995. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr. Rev.* 16:143-163.
36. LIN T., N. VINSON, J. HASKELL y E.P.MURONO. 1987. Induction of 3 β -hidroxiesteroid dehydrogenase activity by insulin-like growth factor-1 in primary culture of purified Leydig cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 219:603-607.
37. LIN T., WANG D., CALKINS J. H., GUO H., CHI R. y HOUSLEY P. R. 1990. Regulation of the insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid expression in Leydig cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 73:147-152.
38. LIU J. P., BAKER J., PERKINS A. S., ROBERTSON E. J. y EFSTRATIADIS A. 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (IGF-1) and type I IGF receptor. *Cell.* 75:59-72.

39. MERCHANT L. H. 1984. Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis. In *Ultrastructure of Reproduction*. Ed. Martinus Nijhoff Publ. Chap. 3, pág 19-30.
40. MERCHANT L. H. 1991. El sexo gonadal. Memorias del congreso conmemorativo del jubileo del Instituto de Investigaciones Biomedicas. U. N. A. M. Tomo I. Universidad Nacional Autónoma de México. México.451-461.
41. MERCHANT L. H. y MORENO-MENDOZA N. 2001. Inicio de la diferenciación sexual: diálogo entre genes y células. *Arch. Med. Res.* 32: 553-558.
42. MORERA A. M., M. A. CHAUVIN, E. de PERETTI, M. BINOUX y M. BENEHMED. 1987. Somatomedin-C/ insulin-like growth factor 1: An intratesticular differentiative factor of Leydig cells? *Horm. Res.* 28:50-57.
43. PERRARD-SAPORI M., CHATELAIN M., JAILLARD C. y SAEZ J. M. 1987. Characterization and regulation of somatomedin C/insulin-like growth factor I (Sm-C/IGF-I) on luteotropin receptor and steroidogenesis. *Eur. J. Biochem.* 165:209-214.
44. POWELL-BRAXTON L., HOLLINGSHEAD P., WARBURTON C., DOWN M., PITTS-MEEK S., DALTON D., GILLET N., y STEWART T. A. 1993. IGF-1 is required for normal embryonic growth in mice. *Genes. Dev.* 7:2609-2617.
45. RAVNIK S. E., RHEE K. y WOLGEMUTH D. J. 1995. Distinct Patterns of expression of the D-type cyclins during testicular development in the mouse. *Dev. Gen.* 16; 171:178.
46. ROBKER R. L. y RICHARDS J. S. 1998. Minireview: Hormonal Control of the cell cycle in ovarian cells: Proliferation versus differentiation. *Biol. Reprod.* 59:476-482.

47. ROTWEIN P. 1999. Molecular biology of IGF-1 and 2. IN: The IGF system, Ed. ROSEFELD R. and ROBERTS C., Ed. Humana Press USA.
48. ROUILLER-FABRE V., LECERF L., GAUTIER C., SAEZ J. y HABERT R. 1998. Expression and effect of the insulin-like growth factor 1 on rat fetal Leydig cell function and differentiation. *Endocrinology* 139:2926-2934.
49. SANDLER y LAGMANN. 1990. *Embryology Medical*. Ed. Williams and Wilkins, 6^a Ed, Baltimore.
50. SHERR C and ROBERTS J. 1999. Cdks inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13:1501-1512.
51. SICINSKI P., DONAHER J. L., GENG Y., PARKER S. B., GARDNER H., PARK M. Y., ROBKER R. L., RICHARDS J.S., McGINNIS L. K., BIGGERS J. D., EPPIG J. J0., BONSON R. T., ELLEDGE S. J. y WEINBERG R. A. 1996. Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature.* 384:470-474.
52. STOT D. y WYLIE C. C. 1986. Invasive behavior if mouse primordial germ cells in vitro. *J. Cell Sci.* 86:133-144.
53. SPAVENTI R., ANTICA M., y PAVELIC K. 1990. Insulin and insulin-like growth factor (IGF-1) in early mouse embryogenesis. *Development.* 108:491-495.
54. TILMAN C. y B. CAPEL. 2002. Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. In: *The Endocrine society. Recent. Progr. Horm. Res.* 57:1-18.

55. ULLRICH A., GRAY A., TAMA. W., YANG-FENG T., TSUBOKAWA M. y COLLINS C. 1986. Insulin-like growth factor 1 receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggest structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.* 5:2503-2512.
56. VANNELI B. G., BARNI T., ORLANDO C., NATALI A., SERIO M. y BALBONI G. 1988. Insulin-like Growth factor (IGF-1) and IGF-1 receptor in human testis: an immunohistochemical study. *Fertil. Steril.* 49(4):666-669.
57. VILLALPANDO I. F. 2000. Sinfonía de los genes gonadales. *Ciencia y Desarrollo.* 160:32-41.
58. VILLALPANDO I. F. 2001. Péptidos en la biología del desarrollo de los mamíferos. In: Javier Velásquez Moctezuma (Ed). *Biología de la Reproducción II.* UAM-Puis.121-143.
59. VILLALPANDO I. F., y LOPEZ-OLMOS V. 2003. I Insulin-like growth factor I (IGF-I) regulates endocrine activity of the embryonic testis in the mouse. *J. Steroid. Biochem. & Mol. Biol.* 86: 151-158.
60. WANG G.M., O'SHAUGHNESSY P. J., CHUBB C., ROBAIRE B. y HARDY M.P. 2003. Effects of Insulin-like growth factor I on steroidogenic enzyme expression levels in mouse Leydig cells. *Endocrinology.* 144(11):5058-5064.
61. XIONG Y., ZHANG H. y BEACH D. 1992. D type cyclins associate with associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell.* 71:505-574.
62. ZAPF J. y FROESCH E. R. 1986. IGF-1/ Somatomedinas: estructura, secreción, acción biológica y papel fisiológico. *Horm. Res.* 24: 121-130.