



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CAMPUS II

PAPEL DEL IGF-I Y DE LA IGFBP-1 EN LA ACTIVIDAD
ENDOCRINA DEL TESTÍCULO EMBRIONARIO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

GUILLERMO GUERRA DÁVALOS

ASESOR: DRA. MA. IRMA VILLALPANDO FIERRO



MEXICO, D.F.

2005

0350227



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.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Lucia Dávalos Mercado sabiendo que jamás encontrare las palabras suficientes para agradecerte esta vida de lucha y superación constante, deseo expresarte que mis ideales, esfuerzos y logros han sido también tuyos y constituye el legado más grande que pudiera recibir. Con cariño, admiración y respeto. Te amo mamá

A mi asesora, Dra. Irma Villalpando Fierro, por los conocimientos aportados en la elaboración de la presente tesis y por el apoyo brindado, lo cual siempre le agradeceré.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por los conocimientos adquiridos en el transcurso de mi carrera.

A los profesores de los que tuve el gusto de aprender y que son parte importante de mi carrera universitaria.

A mi familia por su apoyo moral y las palabras de aliento para continuar superándome.

A mi novia Flor Carmona Arias por los consejos y apoyo que me diste y que hicieron más impalpable uno de los momentos más difíciles de mi vida.

ÍNDICE

	Pag.
Resumen	<i>i</i>
I. Introducción	1
a) Bases morfológicas de la diferenciación sexual	1
<i>i. Cresta genital</i>	1
<i>ii. Gónada Indiferenciada</i>	2
<i>iii. Diferenciación sexual del testículo</i>	3
b) Genes involucrados en la diferenciación sexual gonadal	3
<i>i. El gen determinante de la masculinidad</i>	4
c) Características del factor de crecimiento similar a la insulina	
<i>i. Organización del gen</i>	7
<i>ii. Aspectos de la proteína</i>	8
<i>iii. Expresión en tejido testicular</i>	9
<i>iv. Cascada de señales</i>	10
d) Proteínas transportadoras de IGFs	
<i>i. Tipos de IGFbps</i>	12
<i>ii. Expresión del RNAm</i>	15
<i>iii. Ubicación en el tejido</i>	15
<i>iv. Propiedades biológicas</i>	16
<i>v. Regulación</i>	17
II. Planteamiento del problema	19
III. Hipótesis	21
IV. Objetivos	22
V. Material y métodos	
a) <i>Animales</i>	23
b) <i>Manejo de muestras biológicas</i>	23
c) <i>Fijación de tejido testicular</i>	24
d) <i>Inclusión en Tissue-Tek del testículo</i>	24
e) <i>Inclusión en Tissue Tek del testículo adulto</i>	24
f) <i>Inclusión en Polietilenglicol (PEG) del testículo</i>	24
g) <i>Inmunodetección de IGFbps por fluorescencia</i>	25
h) <i>Inmunodetección con Peroxidasa de cortes en PEG</i>	25
i) <i>Radio-inmuno-ensayo (RIA) del IGF-I</i>	26
j) <i>Cuantificación de testosterona por ELISA</i>	27
k) <i>Análisis estadístico</i>	28
VI. Resultados	
a) <i>Inmunodetección de la IGFBP-1</i>	29
b) <i>Expresión de la IGFBP-1 en la etapa adulta</i>	30
c) <i>Radio inmuno ensayo (RIA) del IGF-I</i>	31
d) <i>Cuantificación de Testosterona por ELISA</i>	31
VII. Discusión	33
VIII. Conclusiones	37
IX. Bibliografía	38

Resumen

Se ha propuesto que el Factor de Crecimiento Similar a la Insulina (IGF-I) y las proteínas de unión (IGFBPs) son reguladores autócrinos y paracrinos testiculares aunque estas funciones no son claras hasta el presente. La expresión de las IGFBPs 2-5 se ha estudiado poco y solo hay un trabajo en donde se describe la ubicación de la IGFBP-1 en el testículo de rata adulta pero, hasta la fecha la función y localización de la IGFBP-1 no se ha descrito en la etapa embrionaria durante el desarrollo testicular del ratón. Así mismo, hasta el momento no se ha determinado la producción intragonadal del IGF-I en esta especie. El objetivo de este estudio fue determinar la concentración del IGF-I producido en el testículo del ratón de los 14, 16 y 18 días de gestación (d.g.), identificar el tipo celular que produce la IGFBP-1 en este órgano en las edades mencionadas y evaluar el efecto de la IGFBP-1 en la producción de testosterona (t) a los 17 d.g. Se emplearon ratonas preñadas de 14, 16 y 18 d.g., se aislaron los testículos de los embriones, se fijaron en paraformaldehído al 4%, en PBS 0.1 M, 2 hrs. a 4 °C, se colocaron en sacarosa al 30% 24 hrs., se incluyeron en Tissue Tek y se congelaron a - 20 °C durante 3 días como máximo. Se obtuvieron cortes de 12 micrómetros y se les realizó una inmunodetección con un anticuerpo monoclonal (anti - IGFBP-1), empleando el sistema biotina - avidina - peroxidasa. Se realizaron grupos de testículos de embriones de 14 - 18 d.g. y se homogenizaron. El IGF-I producido en el testículo fue cuantificado por RIA con un kit de Diagnostic Systems Laboratories inc. (DSL). Los resultados muestran que los testículos fetales de 14, 16 y 18 d.g. producen 11.2, 14.2 y 19.4 pg/ testículo de IGF-I respectivamente. La inmunodetección reveló que la IGFBP-1 se expresa alrededor de los cordones sexuales moderadamente a lo largo de las etapas realizadas. El análisis de ELISA reveló que a los 17 d.g. esta proteína inhibe la

síntesis de testosterona. Se propone que esta proteína por su ubicación alrededor de los cordones testiculares podría junto con el IGF-I regular la producción de hormonas sexuales.

I. Introducción

La diferenciación sexual es un proceso (s) que ocurre (n) en la vida intrauterina, el cual es regulado por diversos genes y proteínas en el tiempo y el espacio que llevan a la determinación sexual del testículo.

a) Bases morfológicas de la diferenciación gonadal

i. Cresta genital

La primera manifestación del desarrollo gonadal se aprecia por un par de engrosamientos longitudinales que van de la región dorsal a la caudal, llamadas crestas genitales; éstas se forman por proliferación del epitelio celómico y condensación del mesénquima subyacente. En la formación de esta zona, también participan las células germinales primordiales (CGPs), las cuales tienen un origen extraembrionario ya que provienen del endodermo del saco vitelino y migran de esta región hacia las crestas genitales (Fig. 1). En el ratón la fase de cresta genital se detecta de los 9.5 – 10.5 días de gestación (Revisado por Merchant, 1991; Villalpando F I (b), 2001).

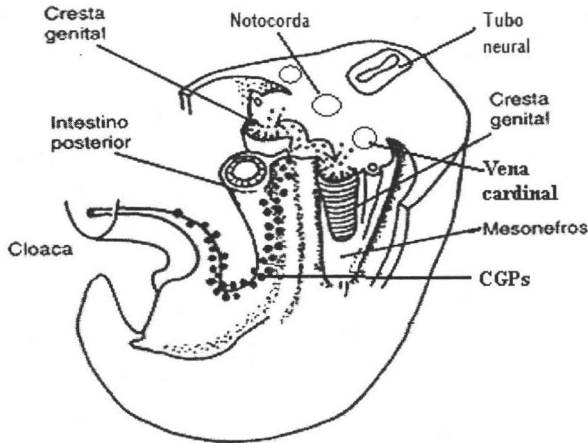


Fig. 1. Corte transversal de la región caudal de un embrión de humano donde se muestran a las Células germinales primordiales (CGPs) migrando del endodermo del saco vitelino a las crestas genitales. Modificado de Sadler y Langman, 1990.

Una vez que se forma la cresta genital proliferan las células somáticas (pre-Sertoli y pre-Leydig) y en esta región hay una condensación de células de origen mesotelial y mesenquimático, que conduce gradualmente a la formación del blastema gonadal (Revisado por Merchant, 1991).

ii. Gónada Indiferenciada

A partir del blastema gonadal se diferencian dos tejidos gonadales importantes: *los cordones sexuales y el estroma*. Los primeros son arreglos epiteliales rodeados por una lámina basal que están formados por células íntimamente asociadas por uniones intercelulares; en estos es donde se encuentra la mayoría de las CGPs y las células de pre-Sertoli. Por otro lado, en el estroma por fuera de los cordones sexuales se encuentran células de tipo mesenquimático, a partir de las cuales derivan las células de Leydig y vasos sanguíneos que irrigan a la gónada indiferenciada, provenientes de la región del

mesonefros. En el ratón, el establecimiento de la fase del desarrollo gonadal se detecta entre los 11 y 11.5 días de gestación. Tanto la cresta genital como la gónada indiferenciada son etapas que están presentes en machos y hembras (Revisado por Merchant, 1991).

iii. Diferenciación sexual del testículo

En los mamíferos, la primera manifestación estructural de la diferenciación gonadal se detecta en la gónada de los machos. En el ratón, la fase de la diferenciación gonadal es el día 12 de la gestación, y se caracteriza por la separación gradual de los cordones sexuales del epitelio celómico, por invasión de vasos sanguíneos y células mesenquimáticas, así como por la relocalización de los cordones en la parte central del futuro testículo (Revisado por Villalpando, 2001).

Una vez establecida la médula testicular, los cordones sexuales reciben el nombre de “cordones testiculares”. Estas estructuras conservan la lámina basal que envuelve tanto a las células somáticas epiteliales o “pre-sertoli”, como a las germinales o “proespermatogonias” (Revisado por Merchant, 1991).

Debido al arreglo topográfico celular de estos en la zona central del testículo, los cordones testiculares, son llamados por su posición cordones seminíferos y el fenómeno probablemente es el resultado del control de la expresión de genes que participan en la diferenciación sexual de este órgano (Revisado por Villalpando, 2001 (a)).

b) Genes involucrados en la diferenciación sexual gonadal

Los genes esenciales en la formación de la gónada indiferenciada son: El factor esteroideogénico SF-1/Sf-1 y el WT-1/Wt-1, denotado 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 días

de gestación en ratones, y debido a su temprana presencia se ha planteado que este podría jugar un papel importante en la diferenciación gonadal; ya que al impedir la expresión de este gen en el ovario, testículo y la glándula suprarrenal de ratones no se desarrollan gónadas ni se sintetizan hormonas esteroides sexuales, como progesterona, testosterona y estradiol (Revisado por Villalpando, 2001 (b)).

Por otro lado, la evidencia mas fuerte de que el Wt-1 participa en el establecimiento y mantenimiento de la gónada indiferenciada en los mamíferos, se basa en el hallazgo de mutaciones de este gen en pacientes con síndrome de Denys-Rash, caracterizado por fallas renales y anomalías gonadales y genitales; sin embargo, el papel del Wt-1 en la diferenciación gonadal no es claro hasta la fecha (Revisado por Villalpando, 2001 (b)).

i. El gen determinante de la masculinidad

El factor determinante de la diferenciación testicular es llamado SRY/Sry, este se localiza en la región pseudoautosomal, situada arriba del brazo corto del cromosoma Y en los mamíferos. El Sry se encuentra presente en una sola copia en los individuos masculinos y esta constituido por un dominio central denominado caja HMG que esta altamente conservada en la mayoría de los animales estudiados (Villalpando, 2001 (a)). En los roedores la presencia de este gen se observa a los 10.5 días de gestación, aunque la expresión mas alta de expresión del Sry se detecta a los 12 días de gestación, momento en el que ocurre la diferenciación sexual del testículo en esta especie. El Sry también se ha observado en etapas posteriores a los 13 días de gestación en embriones y en el testículo adulto del ratón, aunque se desconoce su función biológica en estas etapas del desarrollo (Koopman y Bullejos, 2001).

Investigaciones realizadas en el ratón de la cepa B6Y^{TIR} sugieren que el Sry en esta especie necesita interactuar con genes autosomales, para inducir la diferenciación testicular completa. Hasta el momento se han identificado varios de estos genes en esta cepa en la cual se demostró que hay un gen denominado Tda-1 (Testicular determining autosomal -1), que también debe interactuar con los genes autosomales dominantes de los ratones de otras cepas (Villalpando, 2001 (b)). Otro de los genes autosomales participantes es el Sox9, este se localiza en el cromosoma 17, y las translocaciones en el brazo largo en este cromosoma se asocian a la Displasia Campomélica (DC), enfermedad caracterizada por la presencia de anomalías del esqueleto y la reversión sexual gonadal. Los genes autosomales que participan en la cascada de diferenciación sexual gonadal, denominados Sox9, son miembros de la familia de genes relacionados con el dominio HMG (Villalpando, 2001 (b)). La expresión del gen y de la proteína se observa en los lugares donde ocurre la formación del hueso y también en la gónada desde los 10.5 días de gestación en las hembras y en los machos y con posterioridad, en estos últimos solo se detecta en las células de Sertoli a los 13.5 días de gestación. Las deficiencias en la expresión del Sox9 también producen DC; sin embargo, se desconoce el mecanismo mediante el cual el Sox9 interviene en la diferenciación testicular, pero se ha propuesto que este tiene propiedades de transactivación, es decir, podría activar otros genes involucrados en la diferenciación testicular, no obstante, falta demostrar esta función. Recientemente se planteó que existe un gen regulador que se encuentra presente en el cromosoma 9, llamado DMRT1, el cual en apariencia desempeña un papel importante en la diferenciación gonadal y cuya función aun debe ser determinada (Revisado por Villalpando, 2001 (b)). En la tabla 1 se presenta un resumen de los genes involucrados en la diferenciación gonadal (Fig. 2).

Baker y col, (1996) realizaron experimentos con ratones knock-out para el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) demostrando que además del Sry, el IGF-I es necesario para el desarrollo del ovario y del testículo.

Tabla 1. Genes que participan en el desarrollo gonadal (Modificada de Tilman y Capel, 2002.)

Gen	Función	Sexo
Wtl	Establecimiento de gónadas. Posible regulador del Sry	M / F
Sox9	Diferenciación de células de Sertoli y desarrollo del testículo	M
Sry	Participa en la diferenciación del testículo	M
MIS	Regresión de los conductos de Müller	M
Dhh	Desarrollo de las células germinales	M
Fgf9	Proliferación en testículo	M
DmRt-1	Mantiene a los túbulos seminíferos después del nacimiento	M
IGF	Proliferación, diferenciación y esteroidogénesis prenatal	M / F

F = Femenino, M = Masculino

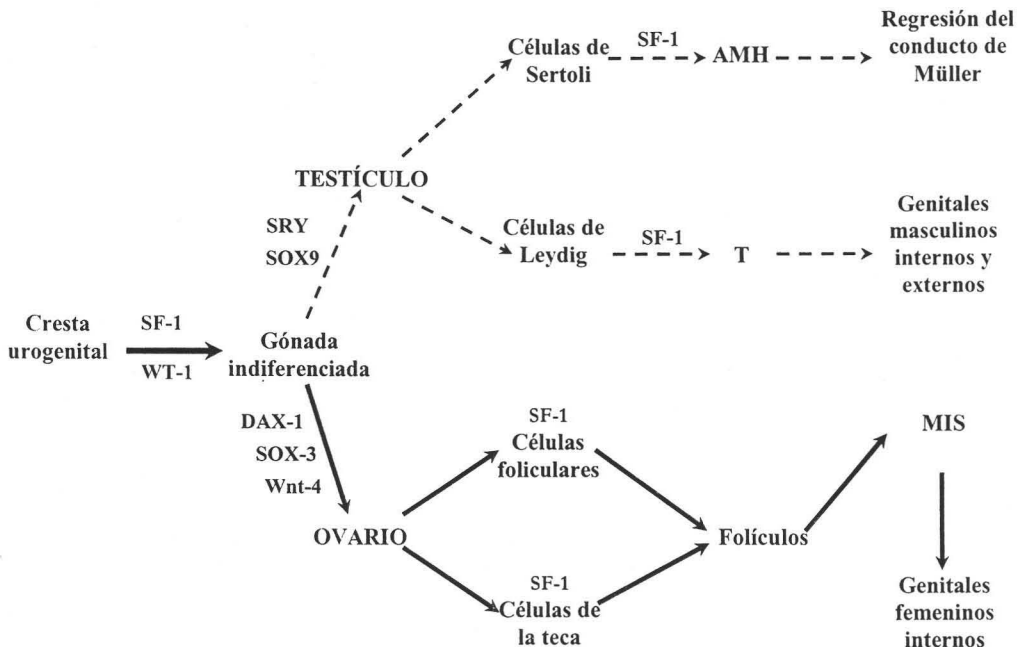


Fig. 2. Genes que participan en la cascada determinación sexual gonadal. Se ilustra la etapa en la que actúan estos en el ovario y en el testículo. Tomada de Louell – Badge y Haecher. Modificada de Villalpando, 2001.
AMH = Hormona Inhibidora de los conductos de Müller, **T** = Testosterona, **MIS** = Hormona estimulante de los conductos de Müller

c) Características del factor de crecimiento similar a la insulina

i. Organización del gen

El gen del Factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) se ubica en el cromosoma 10 en los roedores, está formado por 6 exones, 5 intrones y dos promotores y tiene una longitud de 80 kilo bases (kb) (Fig. 3). Cinco de los exones son análogos al IGF-I del humano, están organizados de manera similar y tienen gran homología en la secuencia de nucleótidos. Se ha propuesto que el primer promotor de este gen es el responsable de la

transcripción del IGF-I en los mamíferos (Rotwein y Shimatsu, 1987).

Además, el IGF-I posee regiones 5' alternativas sin traducir que se han identificado en el ratón (Ward y Elliss, 1992).

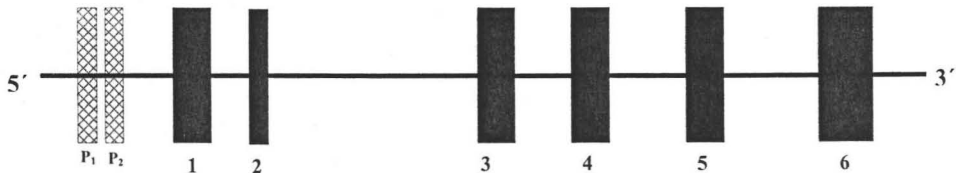


Fig. 3. Se muestra la organización del gen del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) del ratón. Este gen es altamente conservado en los mamíferos debido a que entre especies varía el número de promotores de 2 a 3. Se ha propuesto que el primer promotor es el responsable de la transcripción del IGF-I en los mamíferos. Los números corresponden a los exones del IGF-I y las letras a los promotores del mismo gen. Rotwein y Shimatsu, 1987.

En la organización del IGF-I del humano con la del ratón, estas regiones tienen 62 % de homología de secuencias. En el humano hay un cambio de 9 aminoácidos, lo que indica que el 36% de la región amino terminal del IGF-Ib de los roedores está conservada dentro del IGF-Ib del humano (Ward y Elliss, 1992).

ii. Aspectos de la proteína

Durante la evolución el IGF-I y el IGF-II están altamente conservados, por esta razón todos los péptidos del IGF-I de los mamíferos contienen 70 aminoácidos y todos los péptidos de IGF-II contienen 66-67 aminoácidos. Los factores de crecimiento similares a la insulina comprenden a una familia de péptidos con funciones de proliferación y diferenciación celular y algunos efectos metabólicos similares a la insulina (Rutanen y Pekonen, 1990). Rinderknecht y Humbel en 1978 aislaron y describieron la secuencia de las 2 formas de IGFs, denominados IGF-I e IGF-II, estos fueron definidos como factores de sulfatación, anormal o sin actividad similar a la insulina. El IGF-I parece ser uno de los

reguladores primarios del crecimiento postnatal, mientras que la función de IGF-II *in vivo* no es conocida, pero con base en evidencias recientes es posible pensar que esta implicado en el crecimiento y desarrollo placentario y fetal (Rutanen y Pekonen, 1990).

Los factores de crecimiento similares a insulina son polipéptidos de cadena sencilla, el IGF-I tiene un peso molecular de 764.9 kilo Daltones (kDa) y el IGF-II de 747.1 kDa, entre ellos hay una homología del 65%. Ambos tienen 13 y 11 % de homología con la insulina respectivamente. Así mismo, tienen regiones homólogas a la cadena de insulina A y B, y una conexión peptídica correspondiente al péptido proinsulina-C (Rutanen y Pekonen, 1990). Además, el IGF-I contiene un dominio D adicional a los carboxilos terminales y un péptido señal así como un péptido E en el carboxilo terminal; ambos péptidos son adheridos fuera durante el procesamiento de la molécula madura de IGF-I (Lin, 1986).

iii. Expresión en tejido testicular

Se han detectado 3 clases de RNA mensajero (RNAm) del IGF-I por Northern blot que van de 0.8 a 7.8 kb; esta heterogeneidad podría ser explicada al menos por 3 factores a) Splicing alternativos, b) variación de la longitud de secuencias de la región no traducidas 3' y c) variación de las secuencias de la región 5' no traducidas (Rotwein y Shimatsu, 1987, Revisado por Ward y Elliss, 1992).

La expresión del IGF-I se ha demostrado en una variedad de tejidos, tales como hígado útero, riñón, cerebro (Revisado por Ward y Elliss, 1992) y en el ovario postnatal y testículo embrionario en diferentes especies de mamíferos como en el conejo, rata, ratón, entre otros (Villalpando y col, 1996, Villalpando y López Olmos, 2003).

Recientemente se publicó que el RNAm del IGF-I se detecta durante el desarrollo testicular del ratón en etapas prenatales desde los 11 a los 18 días de gestación. Además, en estos estudios se demostró que el IGF-I *in vitro* en células de Leydig aumenta 30% de la producción de testosterona y 17α hidroxiprogesterona del testículo fetal (Villalpando y López Olmos, 2003). Así mismo, se vio que en las células de Leydig de la rata y el ratón cultivadas en presencia del IGF-I y dibutilil AMPc (AMPc (Bu)₂) la concentración de la secreción de las hormonas sexuales aumentó cuatro veces (Lin, 1986; Villalpando y López Olmos, 2003). Con base a estos datos se puede sugerir que el Factor similar a la insulina I (IGF-I) es un regulador importante de la actividad endocrina del testículo fetal. Falta por establecer el mecanismo a través del cual se regula la actividad endocrina de este órgano prenatalmente por el IGF-I.

iv. Cascada de señales

Las acciones fisiológicas de los IGFs son reguladas por dos receptores, el receptor para el IGF-I y el receptor para el IGF-II. La cascada de señalización del IGF-I es mediado por la unión del factor a su receptor, que está formado por dos cadenas α y dos β (Vanelli y col, 1988; Warner y Woloschak, 1995). La especificidad de la unión al ligando es determinada por las regiones ricas en cisteína del dominio extracelular de las subunidades α , mientras que la actividad de la tirosina cinasa reside en los dominios citoplasmáticos de las subunidades β (Czech, 1989; Warner y Woloschak, 1995; Vanelli, 1988;). La unión del ligando a su receptor provoca la fosforilación en los residuos de tirosina cinasa de 185 Kda, la cual se conoce como sustrato receptor para la insulina o IRS (Izumi, 1987). Este contiene 21 sitios de residuos de fosforilación en residuos de tirosina cinasa, de éstas, 6 se ubican en

la secuencia YMXM (Myers y col, 1992). Esta es una región de reconocimiento, que sirve de unión a proteínas que tienen dominios de homología 2, (SH2) con el src (sarcoma de Rous de las aves) (Revisado por Villalpando, 2001). La unión del IGF-I con su receptor provoca la fosforilación del sustrato del receptor de insulina -1 (IRS-1), lo cual le permite unirse a dos tipos de proteínas, que contienen dominios SH2. Las primeras son las subunidades reguladoras de p85 de la cinasa de fosfatidil inositol, que induce la síntesis del trifosfato de inositol que participa como regulador de la mitosis y del crecimiento celular, y la segunda es la proteína IRS-1 unida al receptor del factor de crecimiento de la proteína de unión-2 (Grb2), que activa al oncogen *ras*. Esta es una proteína reguladora central de los procesos de transducción de señales relacionadas con el crecimiento celular y la diferenciación (Fig.4) (Revisado por Villalpando, 2001; Clemmons y Maile, 2003).

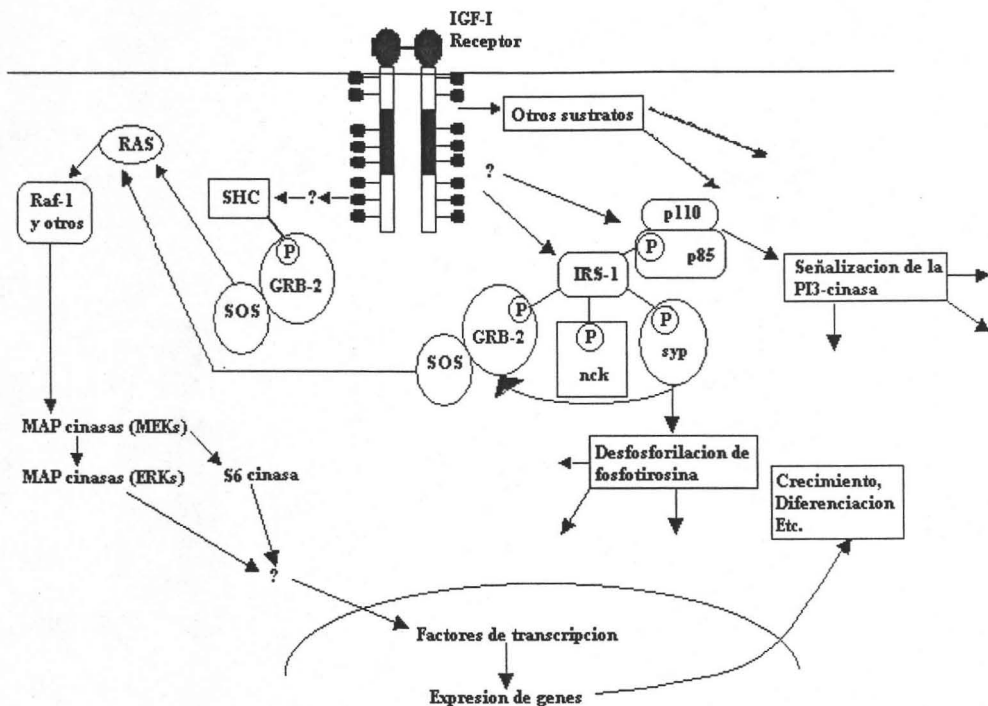


Fig. 4. Cascada de señalización de la IGF-I. por Warner y Woloschak. Tomada de Le Roith, 1995. Se muestra las tres vías de señalización que sigue el IGF-I.

d) Proteínas transportadoras de IGF

i. Tipos de IGFbps

La historia de las IGFbps se inicia en 1974 cuando Hintz presentó evidencias de la existencia de proteínas específicas portadoras de somatomedinas en suero. Desde entonces numerosos métodos inespecíficos han sido empleados para demostrar la presencia de proteínas de unión de IGF en fluidos corporales y en medio condicionado (Rutanen y Pekonen, 1990).

La función testicular en el adulto es regulada a través de la interacción del IGF-I con las proteínas de unión denominados IGFBPs de las cuales se conocen diez tipos (Binoux, 1986; Hossenlopp, 1986; Forbes, 1988; Lee y Hintz, 1988; Ooi, 1988; Ria, 1988, Yvonne y Yang, 1989; Craig, 1990; Cohen, 1991; Dai y Baxter, 1992; Moore y Morris, 1992; Moore, y col, 1993; Moore y Morris, 1993; Clemmons, 1998). Estas proteínas se han asociado a diferentes funciones como prolongar la vida media del IGF-I, regular la función testicular y transportar el IGF-I a su sitio de acción en órganos periféricos, entre otras. Se ha descrito la presencia de la IGFBP-1, -2 y -3 en el testículo adulto (Clemmons, 1998), y se ha propuesto que la función de ésta última es inhibir al IGF-I, aunque el papel de esta proteína en la gónada masculina no es clara hasta el presente (Rappaport, 1995).

Entre los diferentes tipos de IGFBPs se encuentran:

IGFBP-1. Esta proteína contiene 234 aminoácidos y tiene un peso molecular de 25.3 kD. Su secuencia es rica en cisteína en la región amino terminal y en la región carboxilo terminal incluye un tripéptido Arg-Gly-Asp que es común para proteínas extracelulares adheridas a la superficie celular. La IGFBP-1 enlaza al IGF-I y al IGF-II con afinidad similar ($K_d 10^{-9}$ mol/l). La IGFBP-1 está presente en menor cantidad en suero y contiene sitios de enlace insaturados del IGF. La concentración de esta proteína es dependiente de insulina y tiene una marcada variación diaria. La concentración más alta se detecta por la mañana es decir, cuando la concentración de insulina baja y la concentración de IGFBP-1 se incrementa (Rutanen y Pekonen, 1990).

IGFBP-2. En los roedores la forma madura tiene de 270 aminoácidos, un peso molecular de 31-40 kDa y es semejante a la IGFBP-1, ya que contiene una secuencia Arg-Gly-Asp cerca de la región carboxilo terminal. La abundancia de IGFBP-2 en tejido fetal sugiere su participación en la regulación del desarrollo embrionario y postnatal aunque no

se conocen los factores reguladores específicos. Las IGFBP-2 de roedores y bovinos están estrechamente relacionadas entre ellos y con la forma humana, y su homología con la IGFBP-1 es menor del 40 %. Se ha propuesto que la IGFBP-2 preferentemente enlaza IGF-II (Rutanen y Pekonen, 1990).

IGFBP-3. La mayoría de los IGFs en suero se encuentran formando un complejo que esta compuesto de 2 regiones y tiene un peso molecular de 125-150 kDa. La IGFBP-3 es la subunidad de enlace de IGF (subunidad- β) en este complejo. La IGFBP-3 tiene un peso molecular de 28.7 kDa para la proteína no glicosilada. IGFBP-3 muestra un 33% de homología con IGFBP-1, pero falta la secuencia de Arg-Gly-Asp presente en IGFBP-1 e IGFBP-2. La IGFBP-3 es también dependiente de la hormona de crecimiento (GH) y circula en concentraciones bajas, se ha propuesto que la IGFBP-3 en suero esta completamente saturada (Rutanen y Pekonen, 1990).

IGFBP-4. En los roedores la proteína tiene 233 aminoácidos, contiene una región amino vinculada a un sitio de glicosilación y existe comúnmente en fluidos biológicos como un dímero: una forma no glicosilada de 24 kDa y una forma glicosilada de 28 kDa. La IGFBP-4 es la única de las IGFBPs que tiene 2 residuos de Cisteína (Cys) extras en el dominio L codificado por el exon 2, que está vinculado para uno u otro residuo. Esta propiedad única de IGFBP-4 puede ser responsable para los distintivos comportamientos de esta proteína de unión, como acciones inhibitorias y falta de asociación de superficie celular. La IGFBP-4 inhibe las acciones de IGF impidiendo la unión de IGFs a sus receptores (Zhou, 2003).

IGFBP-5. En los roedores la IGFBP-5 tiene 252 a.a., su peso molecular es de 28.4 kDa., se sabe poco sobre este tipo de proteína (Zhou, 2003).

IGFBP-6. En los ratas la IGFBP-6 contiene 14 residuos de cisteína, la ausencia de dos cisteínas en la región amino terminal de esta proteína resulta en la deleción de la secuencia invariante de Gly-Cys-Gly-Cys-Cys que esta presente en las otras cinco IGFBPs (Shimasaki and Ling , 1991).

A pesar de la función de las proteínas transportadoras se sabe poco sobre su regulación en glándulas reproductoras.

ii. Expresión del RNAm

Lin en 1993 observó que las células de Leydig purificadas, así como la fracción de células testiculares sin purificar de ratas hipofisectomizadas de 50 días posparto; no expresan el RNAm de la IGFBP-1. Probablemente, esto se debe a que este mensajero se expresa en cantidades muy pequeñas en estas células o que es procesado inmediatamente a proteína. Estos autores, también demostraron que la IGFBP-2 se ubica en los túbulos seminíferos. Asimismo, se detectó que el RNAm de IGFBP-3 se expresa únicamente en las células purificadas de hígado (Lewitt y Baxter, 1989). La expresión de estas proteínas es regulada por gonadotropinas, debido a que en ratas hipofisectomizadas disminuye la concentración del RNAm de la IGFBP-1 (22%), IGFBP-2 (80%) e IGFBP-3 (90 %) (Lewitt y Baxter, 1989).

iii. Ubicación en el tejido

Hasta ahora, únicamente la síntesis de IGFBP-1 humana se ha descrito en el endometrio, células de la granulosa, hígado fetal y células HEP G2 hepatomáticas (Rutanen y Pekonen, 1990). Su síntesis es regulada por progesterona en el endometrio y por glucosa e insulina en el hígado. Además, la IGFBP-1 se ha descrito en las células de la granulosa

(Jalkanen, 1989), hígado fetal (Lewitt y Baxter, 1989) y en el endometrio de humano (Rutanen y Pekonen, 1990), aunque no hay estudios de la expresión del RNAm ni de la proteína de la IGFBP-3 en el testículo en la etapa embrionaria del ratón.

iv. Propiedades biológicas

Para los IGFs parecen ser cruciales 3 aminoácidos de la región amino terminal. El concepto original sobre la función de las IGFbps fue que ellas actúan como transportadoras para IGFs y que ellas protegen a los IGFs de la degradación, lo que asegura que suficiente IGF sea suministrado hacia el tejido blanco. Las bases para este concepto fueron que los IGFs e IGFbps tendrían que ser considerados para ser sintetizados solamente por el hígado y entonces ser transportados hacia varios sitios blancos. Otra acción de las IGFbps, es su papel como modulador de acciones de IGF. Muchos estudios en que se miden diferentes acciones del IGF-I, tal como síntesis de proteoglicanos en condrocitos, lipólisis en células de grasa y proliferación celular en fibroblastos, proponen que las IGFbps inhiben la acción del IGF-I (Rutanen y Pekonen, 1990).

Por otro lado, McCusker y Clemmons en 1992, mencionan que una importante propiedad biológica de las IGFbps es su habilidad para incrementar la vida media en circulación de los IGFs. El IGF-I libre en sangre tiene una vida media ($t_{1/2}$) de menos de 10 minutos, mientras que cuando se une y forma al complejo 50000- M_r IGFBP-1 y luego el -2 insaturado este tiene una $t_{1/2}$ de aproximadamente 30 minutos. La $t_{1/2}$ de IGF unida a IGFBP-3 (gran complejo de 150000- M_r) es prolongada por más de 6 h. Las IGFbps tienen además el potencial para prolongar la vida media del IGF-I en fluidos extracelulares y en el intersticio.

v. Regulación

Rouiller Fabre y col. en 1998 encontraron que las gonadotropinas y el AMPc (Bu)₂ no alteran *in vitro* la secreción del IGF-I para los testículos fetales de ratas. Sin embargo, observaron que la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del foliculo (FSH) aumentan el RNAm del IGF-I en los testículos de ratas hipofisectomizadas inmaduras. Estos autores observaron que la secreción del IGF-I es estimulada por LH en células de Leydig y por FSH en células de Sertoli inmaduras en cultivo a los 16 días de gestación. en la rata. En contraste, la gonadotropina corionica humana (hCG) disminuye la cantidad del RNAm del IGF-I de las células de Leydig purificadas en ratas adultas. Sin embargo, poco se sabe sobre el papel del IGF-I y su regulación en la fase prenatal.

La mayor parte de IGF-I circulante es producido por el hígado y su regulación es dependiente de la hormona de crecimiento (GH). Las concentraciones de IGF-I son elevadas en pacientes con exceso de GH, y son bajas en niños con deficiencia de esta hormona. La concentración de IGF-I sube después de la administración de GH. Tejido de ratas hipofisectomizadas contienen menos del 30% de IGF-I encontrado en el tejido de ratas normales (Lin, 1993).

Con base en los diversos estudios se ha mostrado que la adición de la FSH, LH y del IGF-I a cultivos de células de la granulosa y de Leydig provocan un efecto sinérgico del IGF-I en la biosíntesis de hormonas esteroides. Se ha visto que la combinación de ambas aumenta de cuatro a cinco veces la producción de hormonas sexuales en la etapa adulta y fetal de los mamíferos (como la 17 α hidroxiprogesterona, testosterona y 17 β estradiol), sin embargo, el mecanismo se desconoce hasta la fecha (Zapf y Froech, 1986; Craig, 1990;

Ooi, 1988; Thomas, 1990; McCusker y Clemmons, 1992; Villalpando y Lopez-Olmos, 2003).

II. Planteamiento del problema

La función testicular es regulada en la vida adulta principalmente por la LH y la FSH, sin embargo, en los últimos 10 años se han publicado investigaciones en donde se describe la regulación de este órgano por factores de crecimiento, entre estos se pueden mencionar al llamado factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I).

Investigaciones realizadas por Villalpando y López-Olmos en 2003, demostraron que el IGF-I se expresa muy temprano durante el desarrollo gonadal masculino entre los 10 y 17 días de gestación. En este trabajo se observó que la administración de 100 ng de IGF-I y de 200 mM de AMPc amplifica la acción de este factor de crecimiento aumentando la secreción de 17α hidroxiprogesterona y testosterona cuatro veces. Sin embargo, la dosis de IGF-I empleada es farmacológica y solo hay un trabajo realizado en la rata en donde se detectó que en grupos de testículos la concentración de IGF-I endógeno es de 16 a 20 ng. Hasta la fecha, no se sabe en que concentraciones se expresa el IGF-I en el testículo de ratón durante la diferenciación sexual tardía (14 días de gestación.) y en la etapa fetal (16-17 días de gestación). Cuantificar la producción endógena del IGF-I en esta especie en estas edades nos permitirá entender mejor la función testicular en la etapa prenatal para realizar experimentos en concentraciones cercanas a las fisiológicas.

Por otra parte, se ha visto que la actividad testicular es regulada por las proteínas de unión (IGFBPs), principalmente por la IGFBP-2, -3 y -4 en el testículo de la rata en la etapa postnatal. La función de la IGFBP-1 no está claramente establecida y no se sabe el papel de ésta durante el desarrollo de la gónada masculina, ni tampoco se conoce que tipo celular produce a la IGFBP-1 en el ratón. Así mismo, se ha visto que la IGFBP-1 se enlaza preferentemente al IGF-I, mientras que la IGFBP-2 se une exclusivamente al IGF-II (Rutanen and Pekonen, 1990). Estudiar la función del IGFBP-1, en el testículo embrionario

permitirá establecer el papel de esta proteína durante el desarrollo de las gónadas masculinas y entender mejor la función testicular embrionaria.

III. Hipótesis

El IGF-I y la IGFBP-1 participarían aumentando o inhibiendo la secreción de hormonas sexuales como la testosterona en el testículo embrionario a los 14, 16 y 18 días de gestación en el ratón.

IV. Objetivos

Objetivo General

- Estudiar la regulación de la secreción de testosterona en el testículo embrionario por el IGF-I y la proteína de unión de este factor denominada IGFBP-1.

Objetivos Particulares

1. Cuantificar la concentración del IGF-I producido en el testículo del ratón de los 14, 16 y 18 días de gestación.
2. Identificar el tipo celular que produce la IGFBP-1 en el testículo del ratón de los 14, 16 y 18 días de gestación.
3. Evaluar el efecto de la IGFBP-1 en la producción de testosterona a los 17 días de gestación.

V. Material y Métodos

a) *Animales*

Se emplearon ratones macho y hembra de la cepa CD-1 de 7-9 semanas de edad los cuales fueron mantenidos en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Los animales fueron puestos en jaulas estériles con SANI-CHIPS de Harlan Teklad México Grade Laboratory en condiciones estériles. Se alimentaron con alimento esterilizable para ratón Harlan Teklad México LM-485, con agua estéril acidificada a un pH de 2.5 y se mantuvieron a una temperatura de 18 a 22 °C y con un fotoperíodo de 12/12 luz-oscuridad. Se pusieron a cruzar 5 hembras con un macho de la misma edad y el día que se visualizó el tapón de copulación se estableció como día cero de la gestación.

b) *Manejo de las muestras biológicas*

Se utilizaron ratonas preñadas de 14, 16 y 18 días de gestación. Estas se sacrificaron por dislocación cervical, se practicó un corte en la zona abdominal, se extrajeron los embriones del útero, se separaron de la placenta y posteriormente se transfirieron a medio M199 (*In Vitro* de México). Los embriones se decapitaron y se aislaron los testículos en condiciones estériles y se pusieron en medio de cultivo M199 esterilizado. Se formaron grupos de 10 gónadas, se congelaron en nitrógeno líquido o hielo seco y se almacenaron a -20°C (máximo 3 días) hasta su análisis por radioinmunoensayo o ELISA.

c) *Fijación del tejido testicular*

Se colocó el tejido en el fijador de Bouin o paraformaldehído al 4 % en PBS 0.1 M y se dejó 2 horas (hrs) en el cuarto frío a 4 °C con un agitador mecánico. Se lavó 2 veces con PBS durante 15 minutos (min) cada uno. Posteriormente se dejaron en sacarosa al 30 % toda la noche a 4 °C.

d) *Inclusión del testículo en Tissue Tek*

El tejido fijado se trasladó a una caja Petri con Tissue-Tek para quitarles el exceso de sacarosa. Con una aguja de punta roma los testículos se transfirieron a una cápsula bean con Tissue-Tek y se orientaron vertical u horizontalmente. Rápidamente se congelaron en nitrógeno líquido o hielo seco y se almacenaron a - 20 °C durante 3 días como máximo.

e) *Inclusión del testículo adulto en Tissue Tek*

Como control positivo de la expresión de la IGFBP-1 se utilizaron testículos de ratón adultos de 7 semanas de la cepa CD-1 los que fueron incluidos y fijados con los métodos antes mencionados.

f) *Inclusión del testículo en Polietilenglicol (PEG)*

Después de fijar los tejidos en Bouin (2 hrs.) se enjuagaron con PBS 0.1 M durante 10 min. Posteriormente se deshidrataron en PEG 400 de SIGMA a temperatura ambiente como sigue:

PEG 25% en H ₂ O destilada	25 min
PEG 50% en H ₂ O destilada	25 min
PEG 75% en H ₂ O destilada	25 min
PEG 95% en H ₂ O destilada	25 min

Después se hicieron dos cambios a PEG 1000 (en estufa a 45 – 46 °C) 1 hora (hr) cada uno. Por último, se cambiaron a PEG 1450 y fueron colocados en estufa a 45 a 46 °C durante 30 min. Se orientaron horizontalmente y verticalmente. Se incluyeron con PEG 1450. Se dejaron enfriar los bloques y se mantuvieron a 4 °C hasta obtener los cortes.

g) *Inmunodetección de IGFbps por fluorescencia*

Se dejaron secar los cortes a temperatura ambiente durante 20 min. Después los cortes se incubaron con 500 μ l de Tritón al 0.3% en PBS 30 min. Se lavaron 3 veces con PBS 10 min. Se hicieron 3 lavados con PBS 10 min cada uno. Se incubaron con Sveltys al 5% en PBS más Tritón al 0.3 % 2 hrs o toda la noche. Se lavaron 3 veces con PBS 10 min cada uno. Se incubaron con el anticuerpo 1° (AB) anti-IGFBP-1 (R&D Systems Inc.), excepto el control, toda la noche. Se lavaron 3 veces con PBS 10 min cada uno. Se incubaron con el AB 2° (antimouse fluoresceínado) 2 hrs en diluciones 1:500 y 1:1000. Se lavaron 3 veces con PBS 10 min cada uno, se les quitó el exceso de PBS y se les colocó el Vectashield para montarlos. Se almacenaron a 4 °C en caja oscura (máximo 30 días).

h) *Inmunodetección con Peroxidasa de cortes en PEG*

Se lavaron los cortes con agua destilada 5 min y se incubaron en H₂O₂ 0.3 % en MeOH 30 min. Se lavaron con H₂O destilada 10 min cada uno y luego se lavaron dos veces con PBS 10 min cada uno. Después se incubaron con tritón 0.1 % 20 min, se lavaron dos veces con PBS 10 min cada uno y se incubaron con Sveltys 5 % en PBS 20 min. Se enjuagaron 3 veces con PBS 10 min cada uno y se incubaron con el anti-IGFBP-1 (R&D Systems Inc.) dilución 1:1000 en PBS toda la noche a 4 °C. Se lavaron 4 veces con PBS 5 min cada vez y se incubaron con el anti-IgG biotinilado de ratón (Vector Laboratories) 1 hr.

Se enjuagaron 4 veces con PBS 5 min cada uno. Se incubaron con un kit de Vector laboratories ABC 30 min. Se lavaron 4 veces con PBS 10 min. cada uno y se incubaron con la Diaminobencidina de SIGMA-ALDRICH (10 mg/25 ml) 15 min. Se detuvo la reacción con H₂O destilada y se montaron los cortes en portaobjetos.

i) Radioinmunoensayo (RIA) del IGF-I

Extracción del IGF-I

Se marcaron 2 tubos de polipropileno o vidrio de 1.5 ml, uno para extracción y otro para neutralización. Se pipetearon 100 µl de la muestra en el primer tubo marcado y se agregaron 400 µl de la solución de extracción a la muestra. Se agitaron con vortex 30 seg., se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron ≤5.000 r.p.m. 30 min a 4 °C. Sin tocar el pellet se tomo 100 µl del sobrenadante y se transfirieron al 2º tubo marcado (25 °C). Las puntas de la pipeta se prehumedecieron pipeteando varias veces una pequeña cantidad de la solución de extracción en otro recipiente.

Se agregaron 500 µl de la solución neutralizante al 2º tubo (contiene el extracto del sobrenadante). Esta fue la muestra neutralizada la cual se empleó en el ensayo.

Se marcaron 2 tubos de la siguiente manera y colocaron en una gradilla

TC = Cuenta total
NSB = Unión no específica
S = Estándares.
C = controles
Exp = experimentales

Se pipetearon 50 µl de los estándares, controles y muestras experimentales al NSB y se agregó 150 µl del estándar 0 ng/ml | IGF-I. Se agregó 100 µl del isótopo [rat¹²⁵-IGF] a

todos los tubos. Después se adicionaron 100 μ l del anticuerpo anti IGF-I de rata a todos los tubos excepto a NSB y TC y se agitaron con vortex 2 seg. Se incubaron los tubos toda la noche a temperatura ambiente. Se agregó 1 ml de la solución precipitadora a todas las muestras excepto a TC. Después se incubaron todos los tubos a temperatura ambiente 20 min. Se centrifugaron todos los tubos 20 min a 1500 g (3000 r.p.m.) excepto el TC. Enseguida se decantaron todos los tubos excepto TC por inversión en un papel secante y se contó en un contador de centelleo gama por 1 minuto.

j) Cuantificación de testosterona por ELISA

Las muestras y reactivos se atemperaron a ≈ 25 °C. Se marcaron las celdas, para estándares, controles y experimentales. Se pipetearon 50 μ l de cada uno de los grupos mencionados. Se preparó 20 min antes la solución del enzima conjugado diluyendo el concentrado en el diluyente para el conjugado. Después se agregó 100 μ l de la solución del conjugado de la enzima a cada pozo usando una pipeta semi-automática. Se adicionó 100 μ l del anticuerpo anti-testosterona a cada pozo. Se cubrió de la luz y se agitaron a una velocidad de 500 – 700 r.p.m. a 25 °C una hr. Se quitó el exceso invirtiendo la placa en un material absorbente y lavando 5 veces con la solución de lavado, proporcionada en el kit de Diagnostic Systems Laboratories, Inc.

Se agregó 100 μ l de la solución reveladora (TMB solución cromogena) a cada pozo. Se pusieron los pozos a agitar a 500 – 700 r.p.m. en un shaker a 25 °C 30 min, en ausencia de luz. Se agregó 100 μ l de la solución de paro (0.2 M ácido sulfúrico) a cada pozo. Se determinó la absorbancia en los pozos en un rango de 450 nm, 30 min, en un lector de ELISA 3550 de Bio-Rad.

k) *Análisis estadístico*

Las muestras experimentales del IGF-I analizadas con RIA y las cuantificaciones de Testosterona se evaluaron con una prueba de ANOVA, Tukey-Kramer y una Prueba de "t" Student, respectivamente, a una $P \leq 0.05$ con el programa Graph Pad Instat V2.05 1994.

VI. Resultados

a) Inmunodetección de la IGFBP-1 en la fase embrionaria

La inmunodetección de la IGFBP-1 se encontró alrededor de los túbulos mesonéfricos, en células de Leydig y en células mesenquimáticas en el testículo de los 14 a los 18 días de gestación. Se observó que su expresión fue baja lo largo de las etapas estudiadas (Fig. 5).

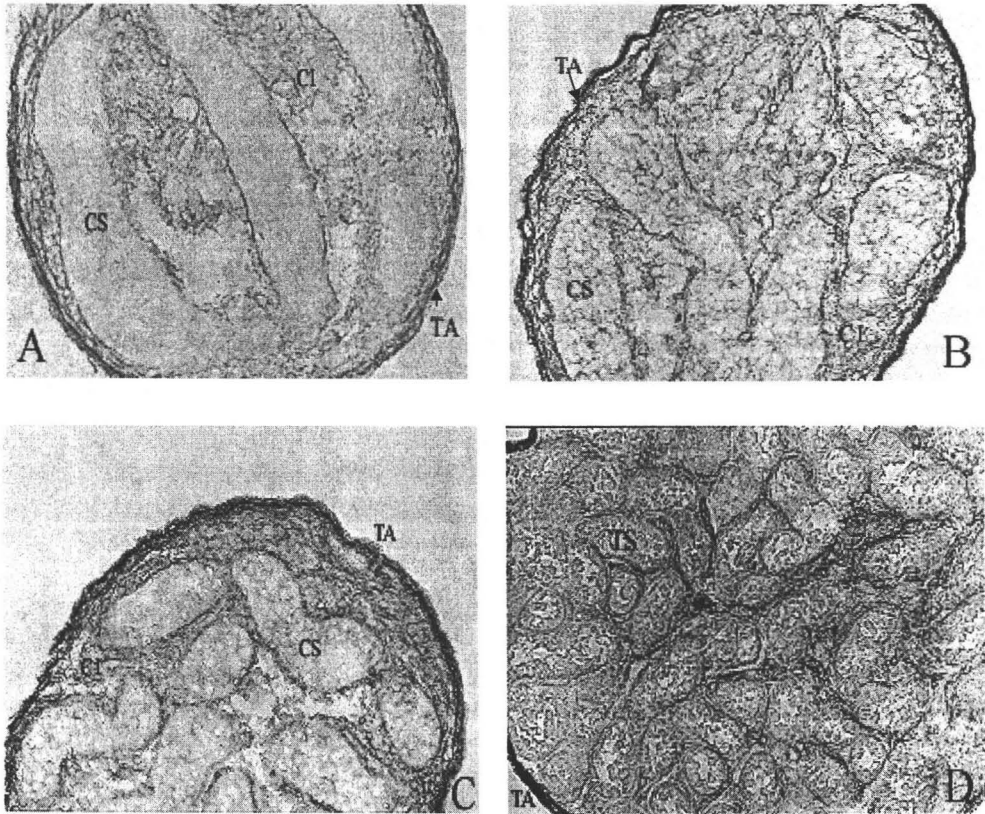


Fig. 5. Expresión de la IGFBP-1 en el testículo en las diferentes edades estudiadas. A) Se muestra un corte longitudinal de un testículo embrionario del grupo control sin anti-IGFBP-1 (200 x). B) y C) Cortes longitudinales de un testículo de 14 y 16 días de gestación respectivamente, en donde se muestra la expresión de la proteína de unión (200 x). D) Corte longitudinal de un testículo de 18 días de gestación donde se muestra la expresión de la IGFBP-1 (400 x). (CS: Cordones Seminíferos; CI: Células Intersticiales o Leydig; TA: Túnica Albugínea.

b) *Expresión de la IGFBP-1 en la etapa adulta*

Se observó que la IGFBP-1 en el adulto se expresó moderadamente en el testículo alrededor de los túbulos seminíferos (Fig. 6)

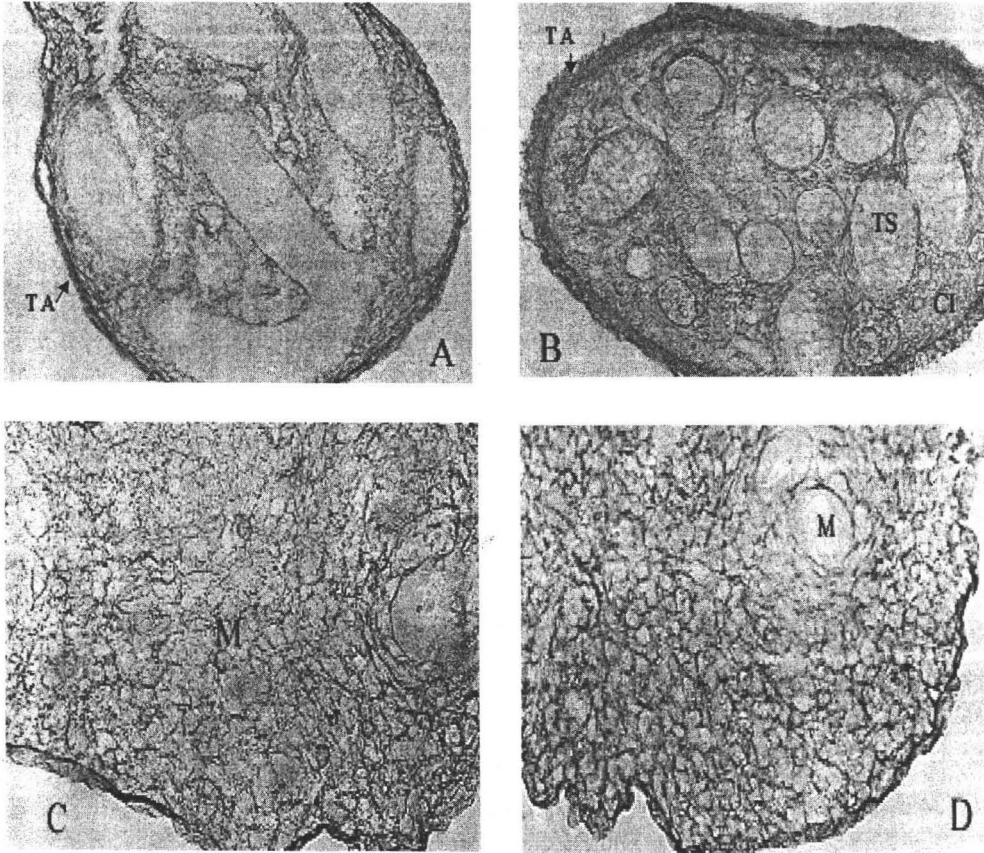
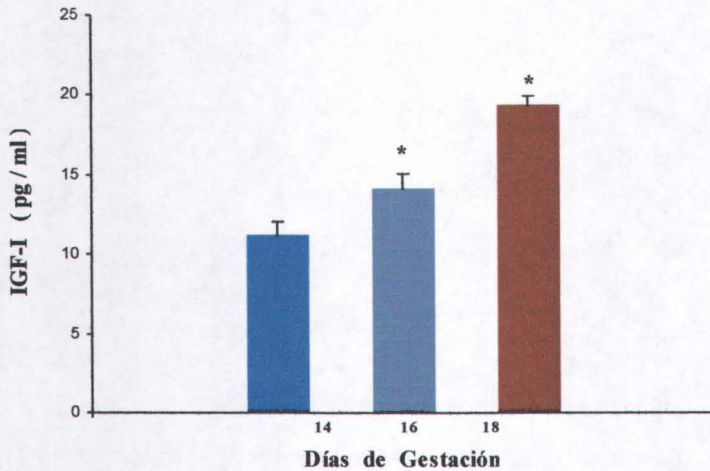


Fig. 6. Expresión de la IGFBP-1 en el testículo adulto. A) Se muestra control de la IGFBP-1 en un corte longitudinal de un testículo adulto (200 x). B) Corte transversal del testículo adulto en donde se muestra la expresión de la IGFBP-1 (200 x). C) Control de la proteína de unión de un corte longitudinal de un testículo donde se muestra el Mesonefros (400 x). D) Corte longitudinal del mesonefros en donde muestra la expresión de la IGFBP-1 (400 x). (TS: Túbulos Seminíferos; M: Mesonefros; TA: Túnica Albugínea).

c) *Radioinmunoensayo (RIA) del IGF-I*

A los 14 días de gestación observamos que la producción de IGF-I fue de 11.2 pg/ml/testículo. La producción de este factor se incrementa a los 16 días de gestación y en esta etapa del desarrollo encontramos que la cantidad de IGF-I fue de 14.2 pg/ml/testículo. A los 18 días de gestación detectamos la mayor producción de IGF-I en el testículo, la cantidad medida fue de 19.4 pg/ml/testículo (Gráfica 1).

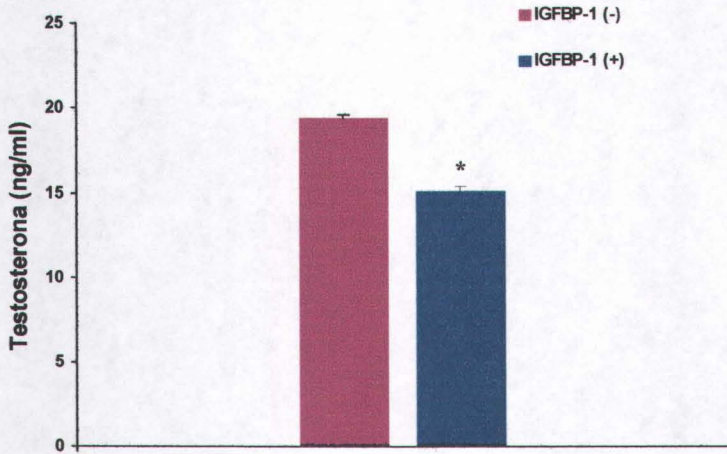


Gráfica 1. Producción del IGF-I en el testículo fetal de 14, 16 y 18 días de gestación. Las barras muestran la media y el error estándar de 5 experimentos. * $P < 0.05$ vs. edad anterior, Prueba de ANOVA y Tukey-Kramer.

d) *Cuantificación de Testosterona por ELISA*

La cuantificación de testosterona en el medio de cultivo con IGF-BP-1 y sin esta proteína en las que no se realizó la extracción de esteroides no se encontraron diferencias al hacer el análisis estadístico con respecto al grupo control. Sin embargo, en otro grupo experimental en las condiciones arriba descritas se observó que la IGF-BP-1 inhibe la producción de Testosterona comparado con la del control a los 17 días de gestación en las

células testiculares (Gráfica 2). Se cuantifico la producción de testosterona a los 17 días de gestación debido a que en esta edad se observa una mayor producción de dicha hormona (Villalpando y Lopez-Olmos, 2003.)



Gráfica 2. Cuantificación de testosterona en testículos de ratón a los 17 días de gestación. Las barras muestran el error estándar. * $p < 0.05$, (Prueba de "t" Student)

VII. Discusión

En este estudio se describe la localización de la IGFBP-1 a lo largo del desarrollo testicular del ratón de los 14 a los 18 días de gestación, así como la cantidad de IGF-I endógeno que se produce en este órgano en las mismas edades y la regulación de la función testicular por la IGFBP-1

Diversos estudios demostraron que las células del tejido conectivo sintetizan 4 de 10 de las IGFBPs (del tipo 2 al 5). La IGFBP-1 se ha descrito en el testículo adulto de rata (Clemmons, 1998; Ooi and Herington, 1990) lo que sugiere que probablemente esta proteína regule alguna función importante en las gonadas masculinas. Sin embargo, la localización de la IGFBP-1 por inmunocitoquímica no se había hecho hasta el presente en la vida intrauterina en el testículo del ratón. Esta investigación es el primer reporte científico que describe la expresión de la IGFBP-1 en la etapa embrionaria en esta especie. En esta investigación la distribución de la proteína se encontró en la zona periférica del testículo alrededor de los cordones testiculares a los 14, 16 y 18 días de gestación, así como en el testículo de adulto del ratón, empleado como control positivo de la expresión de la IGFBP-1.

Se observó en el análisis histológico de los cortes sobre la localización de la IGFBP-1 que la expresión de esta proteína fue baja a lo largo del desarrollo testicular. Sin embargo, se vio que la expresión aumentó moderadamente a los 18 días de gestación. Se ha descrito que tanto la proteína como el RNAm de esta proteína de unión parecen expresarse de manera moderada en las glándulas reproductoras (Lin, 1993; Ooi y Harrington, 1990). Estudios previos realizados en las células de Leydig y en el testículo adulto de la rata, no se pudo detectar el RNAm de la IGFBP-1 por Northern blot (Lin, 1986). Es posible que estos investigadores no hayan detectado este mensajero debido a una probable degradación del

mismo o a que este se expresa en pequeñas cantidades. En este estudio no abordamos el análisis de la expresión del RNAm de la IGFBP-1.

Los datos que se conocen hasta la fecha sobre las funciones de la IGFBP-1 son controversiales. Trabajos hechos por Margot y col. (1989) en la rata demostraron por Northern blot que el RNAm de esta proteína es abundante en los testículos. El hallazgo de que esta proteína se expresa alrededor de los conductos testiculares sugiere que la IGFBP-1 podría ser la responsable de la unión al IGF-I en los conductos seminíferos y en la matriz extracelular y funcionar como una mediadora de señales hacia el interior de los cordones testiculares. En los últimos años se ha propuesto que el IGF-I y sus proteínas de unión son reguladores autócrinos y parácrinos de la función testicular (Rappaport, 1995), aunque el mecanismo debe ser aun establecido.

Experimentos de proliferación en células testiculares aisladas de porcino, plantean que esta proteína tiene un efecto en la proliferación. La adición de la IGFBP-1 a los cultivos potencia la síntesis de DNA de manera similar a la inducida por el suero (Elgin y col, 1987). No obstante, en este estudio no abordamos esta posible función de la IGFBP-1. Habría que realizar el mismo tipo de experimentos para determinar su función como una probable reguladora de la proliferación celular en el ratón. Sin embargo, no podemos excluir que la IGFBP-1 tenga otras funciones durante la regulación de la función testicular. En este estudio se observó que la expresión de la IGFBP-1 aumentó escasamente a lo largo del desarrollo de la gónada masculina. No obstante, faltaría profundizar en el estudio de esta proteína para determinar su papel en la función de la gónada masculina, probablemente su sobre-expresión nos brindaría mas información.

Por otro lado, la producción de IGF-I intra testicular solo se ha descrito en la rata Wistar en la etapa fetal a los 16.5 y 20.5 días de gestación en células de Leydig analizadas

después de 5 días de cultivo (Rouiller-Fabre y col., 1998), en etapas posteriores a la diferenciación sexual. Estos autores encontraron que los testículos de las edades mencionadas producen 18.7 ± 2.5 pg y 78.8 ± 5 pg/testículo, respectivamente. Estos datos difieren con los hallazgos realizados en nuestro grupo debido a que la cantidad detectada por nosotros en los testículos a los 18 días de gestación, fue de 19.4 pg/testículo. Es decir, casi la misma cantidad que ellos encontraron a los 16.5 días de gestación. Sin embargo, los altos valores observados por Rouiller-Fabre y col. (1998), pueden ser debido a que las células precursoras de Leydig aisladas fueron cultivadas por 5 días, lo cual dió margen a que éstas sintetizaran más IGF-I. Estos autores plantean que los valores del IGF-I antes mencionados fueron los mismos detectados desde el primer día de cultivo. No obstante, estos hallazgos son discutibles, puesto que se sabe que las células *in vitro* continúan dividiéndose. De tal forma que en las células cultivadas 5 días esperaríamos que cada día hubiera mas células y por lo tanto más IGF-I sintetizado por ellas. Los datos obtenidos por nosotros son relevantes para entender mejor el funcionamiento de un órgano completo. Asimismo, estos datos generados en el ratón son importantes para entender la fisiología del testículo prenatal, ya que fue en el ratón donde se describió por primera vez el Sry.

Nosotros medimos el IGF-I endógeno directamente en homogenizados de estos órganos de 14-18 días de gestación a los cuales se les extrajo el IGF-I. Es posible que si hubiéramos cultivado las células testiculares 5 días, al igual que el grupo de Rouiller-Fabre en 1998, los valores descritos por nosotros en las edades fetales hubieran sido parecidos a los obtenidos por dicho grupo o quizás aún mayores. Sin embargo, no debemos descartar la posibilidad de que a pesar de pertenecer al mismo grupo taxonómico existen diferencias específicas de especie. Por lo tanto, las diferencias observadas en la producción de IGF-I se deben a una característica genética propia de la especie. Asimismo, debemos de tomar en

cuenta el tamaño de las glándulas reproductoras de cada especie. En la fase embrionaria los testículos de la rata son mayores en todas las etapas comparadas con el ratón. Por consiguiente, éste último tendría menos células y produciría menos IGF-I, comparado con el de la rata.

Además, debemos considerar que el desarrollo testicular de la rata es 2.5 días más largo que el del ratón que dura solo 18 días de gestación. Esto le permite al testículo de la rata crecer hasta los 20.5 días de gestación esto implica que el testículo de esta especie tendría más células y por lo tanto produciría más IGF-I.

Las IGFBPs son proteínas que aparentemente también modulan procesos metabólicos como: esteroideogénesis, metabolismo y proliferación celular en la misma célula a través de diferentes mecanismos no establecidos hasta la fecha. En este estudio evaluamos únicamente el efecto de la IGFBP-1 en la producción de testosterona por experimentos de ELISA.

Se ha visto que la IGFBP-1 es una promotora de la producción de testosterona. Sin embargo, su función parece ser regulada negativamente por la IGFBP-3 ya que esta proteína a una concentración de 2.5 pg/ml inhibe completamente la actividad de la IGFBP-1.

Nuestros hallazgos revelaron que la IGFBP-1 inhibe la producción de Testosterona en las células testiculares, por lo tanto regulan en forma inhibitoria la función del IGF-I.

En resumen, la IGFBP-1 se expresa escasamente en el testículo en la etapa del desarrollo testicular temprano y en la etapa fetal coincide su expresión con la producción intra testicular del IGF-I. Asimismo, esta proteína regula negativamente la producción de testosterona.

VIII. Conclusiones

1. El testículo en la etapa fetal produce IGF-I.
2. La producción del IGF-I aumenta a lo largo del desarrollo de la gónada masculina tanto en la fase de crecimiento (14 d.g) como en la fetal (16-18 d.g).
3. La IGFBP-1 se expresa en las células mesenquimáticas, en la túnica albugínea y alrededor de los túbulos seminíferos moderadamente a los 14, 16 y 18 d.g.
4. La IGFBP-1 regula en forma inhibitoria la producción de Testosterona.

IX. Bibliografia

- 1. Adashi EY, Resnick CE, Payne DW, Rosenfeld RG, Matsumoto T, Hunter MK, Gargosky SE, Zhous J, Bondy CA.** 1997. The mouse intraovarian insulin-like growth factor I system: departures from rat paradigm. *Endocrinology*. 138: 3881-3890.
- 2. Baker J, Hardy M P, Zhous J, Bondy C, Lupu F, Bellué A.** 1996. Effects of an IGF-I gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol*. 10: 903-918.
- 3. Benhamed M., A.M. Morena, M.C. Chauvin, X. De Peretti.** 1987. Somatomedin C/insulin-like growth factor I as a possible intratesticular regulator of Leydig cell activity. *Mol Cell Endocrinol*. 50: 69-71.
- 4. Binoux M.** 1986. Somatomedin (insulin-like growth factor)-binding proteins. *Hormone Res*. 24: 141-151.
- 5. Cailleau J, Vermeire S, Verhoeven G.** 1990. Independent control of the production of insulin-like growth factor I and its binding protein by cultured testicular cells. *Mol Cell Endocrinol*. 69: 79-89.
- 6. Clemmons D.R.** 1998. Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol Cell Endocrinol*. 140: 19-24.
- 7. Clemmons D.R. y Maile L.A.** 2003. Minireview: Integral membrane proteins that function coordinately with the insulin-like growth factor-I receptor to regulate intracellular signaling. *Endocrinology*. 144: 1664-1670.
- 8. Closset J, Gothot A, Sente B, Scippo ML, Igout A, Vandebroek M, Dombrowicz D, Hennen G.** 1989. Pituitary hormones dependent expression of insulin-like growth factors I and II in the immature hypophysectomized rat testis. *Mol Endocrinol*. 3: 1125-1131.

9. **Cohen P.** 1991. Clinical aspects of insulin-like growth factor binding proteins. *Acta Endocrinol.* 124: 74-85.
10. **Craig C.** 1990. Tissue, developmental, and metabolic regulation of messenger ribonucleic acid encoding a rat insulin-like growth factor-binding protein. *Endocrinology.* 126: 644-652.
11. **Czech MP.** 1989. Signal transduction by the insulin – like growth factors. *Cell.* 59: 235-238
12. **Dai J. y Baxter R.C.** 1992. Molecular cloning of the acid-labile subunit of the rat insulin-like growth factor binding protein complex. *Biochem Biophys Res Commun.* 188: 304-309.
13. **Elgin GR, Busby WH, Clemons DR.** 1987. An insulin-like growth factor (IGF) binding protein enhances the biologic response to IGF-I. *Proc Natl Acad Scr.* 84: 3254
14. **Forbes B.** 1988. Classification of the insulin-like growth factor binding proteins into three distinct categories according to their binding specificities. *Biochem Biophys Res Commun.* 157: 196-202.
15. **Handelsman DJ, Spaliviero JA, Scott CD, Baxter RC.** 1985. Identification of insulin-like growth factor-I and its receptors in the rat testis. *Acta Endocrinol.* 109: 543-549.
16. **Hintz R.L.** 1984. Plasma form of somatomedin and the binding protein phenomenon. *Clin Endocrinol Metab.* 13: 31-42.
17. **Hossenlopp P.** 1986. Analysis of serum insulin-like growth factor binding proteins using western blotting: use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding studies. *Anal Biochem.* 154: 138-143.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

18. **Izumi T.** 1987. Insulin-like growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr 185000 protein in intact cells. *J Biol Chem.* 262: 1282-1287.
19. **Jalkanen J.** 1989. regulation of insulin like growth factor-binding protein-I production in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 69: 1174-1179.
20. **Koopman P. y Bullejos M.** 2001. Spatially dynamic expression of Sry in mouse genital ridges. *Dev Dyn.* 221: 201-205.
21. **Le Roith D, Werner H, Beitner-Johnson D. y Roberts Jr.** 1995. Molecular and cellular aspects of the insulin like growth factor I receptor. *Endocr Rev.* 16: 143-163.
22. **Lee Y-L, Hintz RL.** 1988. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein complementary deoxyribonucleic acid from human HEP G2 hepatoma cells: Predicted protein sequences suggests an IGF binding domain different from those of the IGF-I and IGF-II receptors. *Mol Endocrinol.* 2: 404-411.
23. **Lewitt MS, Baxter RC.** 1989. Regulation of growth hormone-independent insulin-like growth factor- binding protein (BP-28) in cultured human fetal liver explants. *J Clin Endocrinol Metab.* 69: 246-252.
24. **Lin T.** 1986. Characterization of insulin and insulin and insulin-like growth factor I receptors of purified Leydig cells and their role in steroidogenesis in primary culture: a comparative study. *Endocrinology.* 119: 1641-1647.

25. **Lin T.** 1993. Expression and regulation of insulin-like growth factor-binding protein -1, -2, -3, and -4 messenger ribonucleic acids in purified rat Leydig cells and their biological effects. *Endocrinology*. 132: 1898-1904.
26. **Margot JB, Binkert C, Mary JL, Landwehr J, Heinrich G, Schwander J.** 1989. A low molecular weight insulin-like growth factor binding protein from rat: cDNA cloning and tissue distribution of its messenger RNA. *Mol Endocrinol*. 3: 1053-1060.
27. **McCusker R.H. y Clemmons D.R.** 1992. The insulin-like growth factor binding proteins: structure and biological functions in *The insulin-like growth factors: structure and biological functions*. Editor Paul N. Schfield. Ed. Oxford University Press. Cap. 6: 111-150.
28. **Merchant LH.** 1991. El sexo gonadal. En: *Memorias del Congreso Conmemorativo del Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM*. Tomo I. UNAM. pp. 451-461
29. **Moore A, Chen CL, Davis JR, Morris ID.** 1993. Insulin-like growth factor-I mRNA expression in the interstitial cells of the rat testis. *J Mol Endocrinol*. 11: 319-324.
30. **Moore A, Morris ID.** 1993. Paracrine effects via the epidermal growth factor receptor in the rodent testis may be mediated by non-Leydig interstitial cells. *J Endocrinol*. 136: 439-446.
31. **Moore A. y 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.

32. **Myers MG Jr, Backer JM, Sun XJ, Schoelsen S.** 1992. IRS-I activates phosphatidylinositol 3'kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89: 10350-10354.
33. **Ooi GT, Herington AC.** 1990. Recognition of insulin-like-growth-factor-binding proteins in serum and amniotic fluid by an antiserum against a low-molecular-mass insulin-like-growth-factor-inhibitor/binding protein. *J Biochem.* 267: 615-20.
34. **Ooi GT.** 1988. Recognition of insulin-like growth factor (IGF) serum binding proteins by an antibody raised against a specific IGF-inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 156: 783-791.
35. **Rappaport M S.** 1995. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein 3 in the rat testis: follicle-stimulating hormone dependence of mRNA expression and inhibition of IGF-I action on cultured Sertoli cells. *Biol Reprod.* 52: 419-425.
36. **Ria B.** 1988. Insulin-like growth factor I (IGF-I) receptors on Sertoli cells from immature rats and age-dependent testicular binding of IGF-I and insulin. *Mol Cell Endocrinol.* 55: 33-43.
37. **Rinderknecht E, Humbel R E.** 1978. The amino acid sequence of insulin - like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem.* 235: 2769-2776.
38. **Rotwein P, Shimatsu A,** 1987. Mosaic evolution of the insulin-like growth factors. Organization, sequence, and expression of the rat insulin-like growth factor I gene. *J Biol Chem.* 262: 7894-7900.
39. **Rouiller-Fabre V, Lecerf L, Gautier C, Saenz J, Habert R.** 1998. Expression and effect of the insulin-like growth factor I on rat fetal Leydig cell function and differentiation. *Endocrinology.* 139: 2926-2934.

40. **Rutanen EM, Pekonen F.** 1990. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Acta Endocrinol.* 123: 7-13.
41. **Sadler y Langman.** 1997. *Embriología Médica.* 7ª edición. Editorial Médica Panamericana. México. pp 269-270.
42. **Saez J M, Chatelain P, Perrard-Sapori M, Jaillard C, Naville D.** 1988. Differentiating effect of somatomedin-C/insulin-like growth factor-I and insulin on Leydig an Sertoli cells functions. *Reprod Nutr Dev.* 28: 989-1008.
43. **Shimasaki S, Ling N.** 1991. Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 and -6). *Prog Growth Factor Res.* 3: 243-266.
44. **Thomas A.** 1990. Insulin-like growth factor-binding protein (IGF-BP) inhibition of granulosa cell function: effect on cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate, deoxyribonucleic acid synthesis, and comparison with the effect of an IGF-I antibody. *Endocrinology.* 126: 2184-2189.
45. **Tilman C. y Capel B.** 2002. Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. *Recent Progr Horm Res.* 57: 1-10.
46. **Vanelli BG, Barni T, Natali A, Serio M, Balboni GC.** 1988. Insulin – like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis: an immunohistochemical study. *Fertil Steril.* 49: 666-669.
47. **Villalpando F I (a).** 2001. Péptidos en la biología de la reproducción de los mamíferos. En *biología de la reproducción II* de Javier Velásquez Moctezuma. UAM. Pp: 121-143.
48. **Villalpando F I (b).** 2001. Sinfonía de genes gonadales. *Ciencia y Desarrollo.* 27: 32-41.

49. **Villalpando F I, Olmos-López 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: 151-158.
50. **Villalpando Fierro I, Villafan Monroy H, Pacheco P.** 1996. Delayed expression of the insulin-like growth factor I (IGF-I) gene in the XY sex-reversed female mouse ovary. *Int J Dev Biol.* 40: 477-482.
51. **Ward A. y Elliss C J.** 1992. The insulin growth factor genes in *The insulin-like growth factors: structure and biological functions.* Editor Paul N. Schfield. Ed. Oxford University Press. Cap. 4: 45-71.
52. **Warner H y Woloschak M.** 1995. The insulin – like growth factor I receptor: molecular biology, heterogeneity, and regulation. En: *insulin – like growth factor: molecular and cellular aspects.* Le Roith (Ed). CRC Press, Boca Raton. Pp: 17-47.
53. **Yvonne W., and Yang H.** 1989. Structure, specificity, and regulation of the insulin- like growth factor-binding proteins in adult rat serum. *Endocrinology.* 125: 1540-1555.
54. **Zapf J, Froech E.R.** 1986. Insulin-like growth factor/somatomedins: structure, secretion, biological actions and physiological role., *Horm Res.* 24: 121-130.
55. **Zhous R.** 2003. IGF-binding protein-4: biochemical characteristics and functional consequences. *J Endocrinol.* 178: 177-193.