

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

***“PAPEL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A  
LA INSULINA TIPO I (IGF-I) EN LA DIFERENCIACIÓN  
MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL DE CÉLULAS DE  
LEYDIG Y MESENQUIMÁTICAS EMBRIONARIAS”***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

**DANIEL CERVANTES BAZÁN**

MÉXICO, D. F.

2006



**SEÑALADO ASIGNADO**



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.

**PRESIDENTE:** ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ

**VOCAL:** ARMANDO MUÑOZ COMONFORT

**SECRETARIO:** MARIA IRMA VILLALPANDO FIERRO

**1er. SUPLENTE:** ELPIDIO GARCÍA RAMIREZ

**2do. SUPLENTE:** EUCLIDES ÁVILA CHAVEZ

***SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA***

LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA MOLECULAR EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y FISIOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

**ASESOR DEL TEMA**

---

**DRA. MARÍA IRMA VILLALPANDO FIERRO**

**SUSTENTANTE**

---

**DANIEL CERVANTES BAZÁN**

**A LA DRA. IRMA VILLALPANDO  
FIERRO** POR EL APOYO, TIEMPO,  
ESFUERZO Y DEDICACIÓN  
PROPORCIONADO A LO LARGO  
DEL DESARROLLO DE ESTE  
TRABAJO

**A ERIKA FRANCO Y JUDITH  
MORALES** POR COMPARTIR  
TRABAJO Y MOMENTOS DE  
ESFUERZO, AMISTAD Y ARMONÍA  
EN EL LABORATORIO.

**A ESMERALDA LIRA** POR LA  
ASESORÍA Y APOYO TÉCNICO EN  
LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO.

**A DIOS QUE SIMPLE Y SENCILLAMENTE EXISTO GRACIAS A ÉL**

**A MIS PADRES POR TODO EL AMOR, APOYO INCONDICIONAL, ESFUERZOS Y EJEMPLO DE VIDA**

**A MIS HERMANOS CUÑADAS Y SOBRINOS POR SU AMOR COMPRENSIÓN Y APOYO EN MIS PROYECTOS**

**A MIS OTROS HERMANOS (GARY, LORE Y ELVIN), POR SU AMISTAD Y AMOR INCONDICIONAL QUE SIEMPRE ME HAN BRINDADO**

**A ADRY POR SU AMOR ÚNICO Y VERDADERO QUE SIEMPRE ME HA REGALADO Y EL APOYO BRINDADO PARA QUE SE REALIZARA ESTE SUEÑO**

---

**ÍNDICE**

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	2
1.	Origen y diferenciación de las gónadas	2
1.1	Morfogénesis gonadal	3
2.2	Fase de cresta genital	5
2.3	Etapa de gónada indiferenciada	7
2.4	Determinación sexual testicular	8
2.5	Genes masculinizantes	9
2.	El factor de crecimiento similar a la insulina tipo I	12
2.1	Organización del gen y la proteína	12
2.2	Expresión en diferentes tejidos	14
2.3	Participación en la función gonadal	16
2.4	Receptor para el IGF-I	18
2.5	Proteínas de unión del IGF-I	20
3.	Insulina	
3.1	Organización del gen	23
3.2	Organización de la proteína	24
4.	Esteroides sexuales	
4.1	Clasificación	26
4.2	Biosíntesis	27
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
IV.	HIPÓTESIS	30
V.	OBJETIVOS	31
VI.	MATERIAL Y MÉTODOS	
a)	Material biológico	32
b)	Cirugía experimental de embriones de ratón	32
c)	Disgregación celular	33
d)	Conteo celular	34
e)	Cultivo celular	34
f)	Extracción de testosterona	36
g)	Cuantificación de testosterona por análisis inmunoenzimático	36
h)	Análisis Estadístico.	37

<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS</b>	
1.	Cultivo Celular	38
2.	Cultivo de células mesenquimáticas del primordio anterior	
a)	Efecto del IGF-I en la secreción de testosterona	39
b)	Efecto de la insulina en la secreción de testosterona	40
3.	Cultivo de células testiculares	
a)	Efecto del IGF-I en la secreción de testosterona	41
b)	Efecto de la insulina en la secreción de testosterona	42
4.	Relación en la secreción de testosterona por el IGF-I en las células testiculares y mesenquimáticas de los miembros anteriores	43
5.	Relación en la secreción de testosterona por efecto de la Insulina en las células mesenquimáticas de los miembros anteriores y testiculares	44
6.	Relación en la secreción de testosterona por IGF-I e insulina en las células mesenquimáticas de los miembros anteriores y células testiculares	45
<b>VIII.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	46
<b>IX.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	50
<b>X.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	51



## **I. RESUMEN**

La diferenciación sexual testicular se inicia en la etapa embrionaria en los mamíferos. Estudios previos demostraron que la insulina y el factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-I) son cruciales para el desarrollo gonadal masculino. Sin embargo, el papel del IGF-I como promotor de la diferenciación de las células de Leydig es motivo de controversia actualmente. El objetivo de la presente tesis fue determinar si el IGF-I y la insulina a los 12 d.g. con las presuntas células de Leydig y el mesénquima de los miembros anteriores son capaces de diferenciarse a células secretoras de Leydig. Se aislaron los testículos y miembros anteriores de embriones de 12 d.g., se disgregaron, se sembraron  $1.5 \times 10^5$  células, se incubaron por separado con y sin 100 ng de IGF-I e insulina a 37°C, 72 horas y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se separó y se midió la testosterona (T) por técnicas de análisis inmunoenzimáticas (EIA). Los resultados obtenidos demostraron que el IGF-I y la insulina, promovieron la diferenciación de células no gonadales (mesénquima) y las testiculares a células de Leydig. Las células testiculares tuvieron una actividad endócrina significativamente superior en la síntesis de testosterona, comparados con el control. La concentración de testosterona obtenida con el IGF-I en células testiculares y mesenquimáticas fueron significativamente mayores que las obtenidas con la insulina. Los hallazgos del presente trabajo, plantean que el IGF-I y la insulina son reguladores de la actividad secretora de las células somáticas de Leydig del testículo embrionario.

## **II. INTRODUCCIÓN**

La función testicular en la vida adulta es controlada principalmente por la participación de hormonas protéicas como la FSH y LH producidas en la hipófisis. Sin embargo, en los últimos diez años se han publicado datos en los que se describe la regulación de la función testicular y la fertilidad por moléculas relacionadas con la insulina, como los factores de crecimiento similar a la insulina (IGF-I e IGF-II) y el receptor de insulina y del IGF-I (Revisado por Villalpando, 2001).

Por otro lado, estudios posteriores demostraron que el IGF-I es necesario para la actividad endocrina del testículo embrionario (Villalpando y Olmos-López, 2003). Sin embargo, no se sabe si este factor y la insulina inducen la diferenciación fisiológica de las células mesenquimáticas a células de Leydig.

### **1. ORIGEN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS GÓNADAS**

La diferenciación sexual es un proceso que se lleva a cabo secuencial y ordenadamente, en éste, el sexo cromosomal determina el sexo gonadal y éste a su vez influye en la diferenciación fenotípica de los individuos (Jost, 1947; 1953). El sexo se determina en los mamíferos en tres etapas, la primera es la determinación sexual cromosómica, establecida genotípicamente durante la fecundación cuando un espermatozoide X ó Y fecunda a un ovocito generalmente

con un cromosoma X, lo cual origina a un individuo homocigoto XX o heterocigoto XY que desarrollan ovarios o testículos respectivamente (Gilbert, 1994). Consecuentemente después de la determinación cromosómica es llevada a cabo la determinación sexual gonadal, cada embrión desarrollo un par de primordios gonadales y un sistema de conductos indiferenciados independientemente del sexo genético que posean, con la potencialidad de convertirse en ovarios o testículos de acuerdo al sexo genético. La última fase se caracteriza por la determinación sexual fenotípica donde se desarrollan los genitales sexuales internos y externos. En las hembras se diferencian los conductos de Müller en trompas de Falopio, útero y el tercio superior de la vagina y en el caso de los machos los conductos de Wolf se diferenciarán en el epidídimo, conductos deferentes y las vesículas seminales (Gilbert, 1994).

### **1.1 Morfogénesis gonadal**

Durante la morfogénesis de las gónadas existe una interacción entre las dos líneas celulares que componen la gónada: las células germinales primordiales o CGP's (precursoras de los ovocitos y espermatozoides) y las células somáticas (el resto de las células que conforman la gónada), células mesenquimáticas, células mioideas, células de Leydig y células de Sertoli, que se realiza entre dos tipos celulares que difieren tanto en su aparición como en el lugar de su origen (Ruiz,1988).

Aunque en los mamíferos no se ha demostrado experimentalmente el origen

extraembrionario de las CGP's, se cree que estas células presentan características morfológicas, histoquímicas y ultraestructurales, que permitieron su identificación en el endodermo del saco vitelino (Merchant-Larios, 1984). De esta manera las gónadas presentan un modelo de morfogénesis diferente al resto de los órganos, ya que en este caso existe la presencia de un componente celular que proviene del exterior y que juega un papel determinante en las dos principales etapas por las cuales pasan las gónadas durante su desarrollo: la etapa indiferenciada y la etapa de diferenciación sexual (Ruíz, 1988).

La diferenciación gonadal ocurre por la interacción de dos tipos celulares: las células germinales primordiales (CGP's) que se encuentran primariamente en el alantoides a los 8.5 d.g. en el ratón (Godin y Wylie, 1991) para posteriormente migrar hacia la región urogenital, y las células somáticas localizadas en la cresta urogenital (Merchant-Larios, 1984).

En el transcurso del desarrollo gonadal es posible distinguir tres fases: la formación de la cresta urogenital, el establecimiento de la gónada indiferenciada y la diferenciación sexual gonadal. Las dos primeras etapas serán llevadas a cabo por hembras y machos independientemente del sexo cromosómico que posean (Merchant-Larios, 1984).

## **1.2 Fase de cresta genital**

En todos los vertebrados los gametos se desarrollan a partir de las CGP's las cuales pueden ser reconocidas en el **mesodermo** extraembrionario gracias a su gran contenido de fosfatasa alcalina (Ginsburg y col., 1990). Es de esta zona que comienzan su migración hacia las crestas urogenitales, este proceso se realiza durante dos fases: en la primera se mueven del **endodermo** hacia el intestino posterior por un transporte pasivo del endodermo en invaginación. Durante la segunda fase ocurre un transporte activo a través del mesenterio dorsal intestinal hacia las crestas genitales, entre los días 9.5 - 11.5 (French-Constant y col., 1991). Durante esta migración el número de CGP's se incrementa de 100 a 4000 aproximadamente (Gidin y col., 1990). Se ha propuesto que existe un control de diversos factores de crecimiento en la proliferación de éstas células (Mercola y Stiles, 1998; Godin y col., 1990). Hasta el momento no se han comprobado con exactitud los factores que controlan la migración de las CGP's, aunque se ha demostrado que para su desplazamiento requieren de fibronectina como substrato (Alvarez-Buylla y Merchant-Larios, 1986). También se han encontrado evidencias que sugieren que las crestas genitales secretan una proteína perteneciente a la familia del TGF- $\beta$ 1 (Factor de crecimiento transformante beta 1) que es capaz de atraer a las CGP's del ratón (Godin y Wylie, 1991).

Cuando las CGP's comienzan a llegar a la zona urogenital, se encuentran con diferentes tipos de células somáticas de origen mesodérmico entre estas se

encuentran células mesoteliales o epiteliales, mesenquimatosas, mesonéfricas y endoteliales (Merchant-Larios, 1991). Los dos primeros tipos celulares participan directamente en la formación de la gónada indiferenciada como células precursoras. Las células mesonéfricas y endoteliales son en cambio, parte de tejidos ya diferenciados (el mesonefros y sistema circulatorio respectivamente) que participan solo indirectamente en la morfogénesis de la gónada.

Las cresta genital se evidencia como un engrosamiento en la parte ventral del mesonefros, que a su vez es derivado de las interacciones inductivas del mesodermo intermedio. Esta etapa se identifica en el ratón de 9 a 10.5 d.g. (Merchant-Larios, 1991).

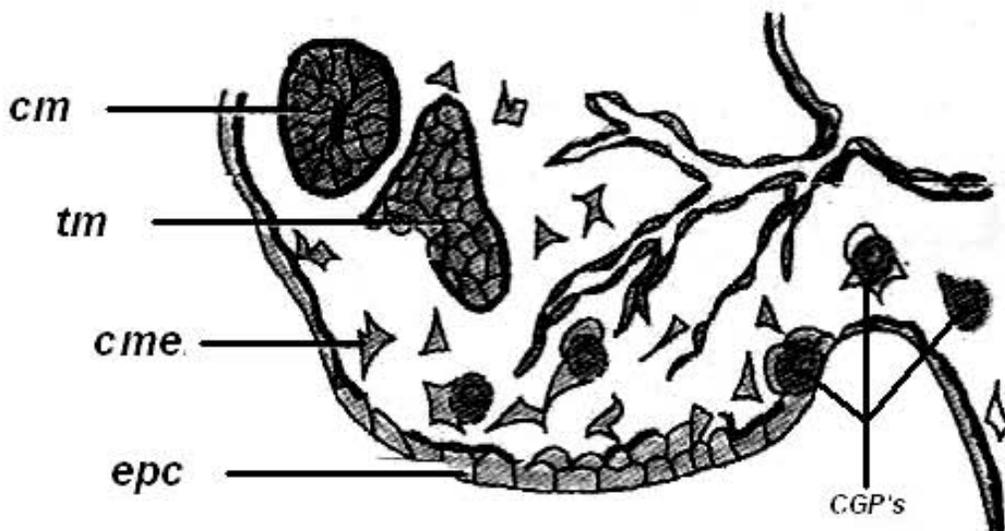


Figura 1.1. Esquema de la cresta genital de un embrión de ratón de 9.5 d.g. Se indican diferentes tipos de células que participan en el desarrollo de la gónada indiferenciada como: CGP's, células del epitelio celómico (epc), células mesenquimáticas (cme), los conductos mesonéfricos (cm) y los túbulos mesonéfricos formados a partir de la condensación del mesénquima urogenital (Tomado de Merchant-Larios, 1991).

### **1.3 Etapa de gónada indiferenciada**

La segunda fase del desarrollo gonadal del presunto ovario o testículo en los mamíferos corresponde a la etapa de gónada indiferenciada, la cual es común en hembras y machos. La gónada indiferenciada es un órgano bilateral localizada en la región ventral del mesonefros y está formada por tejido epitelial, mesenquimático y las CGP's (Brambell, 1972). La etapa de gónada indiferenciada corresponde a la proliferación de las células somáticas precursoras, de las foliculares y de las células intersticiales, las cuales originan los cordones sexuales y el tejido estromático que constituyen los precursores del ovario y el testículo (Merchant-Larios, 1976; Merchant-Larios, 1984). En esta etapa las CGP's y las células somáticas en la cresta genital están fuertemente compactadas y adheridas a la superficie del epitelio formando un primordio gonadal. Esta etapa se caracteriza por tres eventos morfogénéticos: la condensación de las células somáticas a lo largo de las crestas genitales, la deposición gradual de los componentes de la lámina basal alrededor de las células epiteliales, así como, una actividad mitótica disminuida de las células epiteliales. Conforme llegan las CGP's, las células somáticas proliferan formando en conjunto el "Blastema Gonadal" (Merchant-Larios, 1984). Estos movimientos morfogénéticos coordinados conllevan a la formación de los cordones gonadales (Merchant-Larios y Taketo, 1991). Al terminar esta etapa se puede apreciar en la gónada indiferenciada un componente epitelial que contiene a la mayoría de de las células germinales y un componente estromático a partir del cual se integrarán posteriormente los vasos sanguíneos,

las células precursoras del tejido conectivo de las gónadas y las células intersticiales esteroideogénicas (Merchant-Larios, 1984). En el ratón esta etapa corresponde de 9.5 a 11.5 d.g.

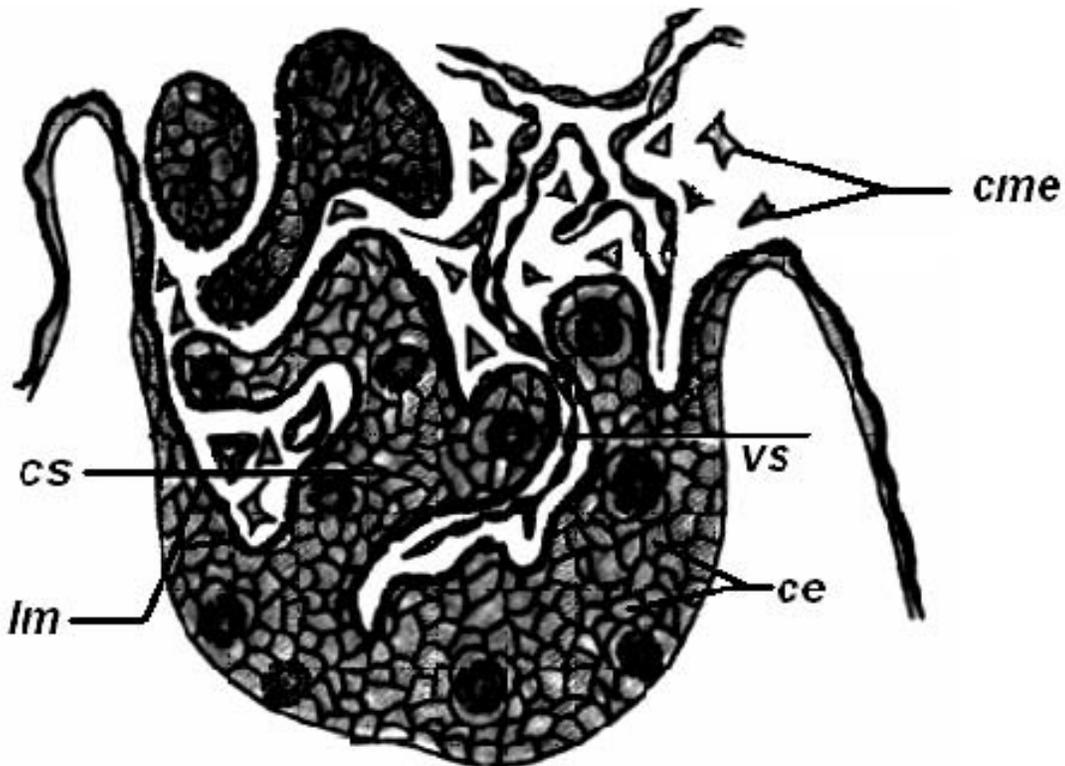


Figura. 1.2. Establecimiento de la gónada indiferenciada. Formación de los cordones sexuales (cs), células de tipo epitelial (ce) limitadas por una lámina basal (lm), células mesenquimatosas (cme) y vasos sanguíneos (vs) (Tomado de Merchant-Larios, 1991 Pág. 456).

#### **1.4 Determinación sexual testicular**

En los mamíferos, la primera manifestación estructural de la diferenciación sexual, se detecta en la gónada de los machos. En el ratón la diferenciación del testículo se inicia a los 12 d.g., primeramente es posible observarse una separación gradual

de los cordones sexuales del epitelio superficial de la gónada, esta se produce por un mayor compactamiento de los cordones así como por una invasión y proliferación de tejido mesenquimatoso y vasos sanguíneos provenientes de la región mesonéfrica. En la médula del testículo, los cordones sexuales reciben el nombre de “cordones seminíferos” y al adquirir un lumen en la pubertad se denominan “tubos seminíferos”. Estas estructuras conservan la lámina basal que envuelve tanto a las células somáticas epiteliales o pre-Sertoli, como a las germinales (Merchant-Larios, 1991). En el tejido estromático que rodea a los cordones seminíferos se encuentran células mioses, vasos sanguíneos, fibroblastos, y células de Leydig (Merchant -Larios, 1991). Ocurrida la diferenciación gonadal los testículos producen la hormona inhibidora de los conductos de Müller (MIS) secretada por las células de Sertoli aproximadamente a los 12 d.g. en el ratón y la testosterona producida por las células de Leydig a los 12.5-13 d.g., que estimulan el desarrollo del tracto masculino a partir de los conductos de Wolf (Münsterberg y Lovell-Badge, 1991; Donahue, 1992).

### **1.5 Genes masculinizantes**

Dentro del cromosoma Y cerca de la zona pseudoautosomal del brazo corto “p” que comprende aproximadamente 35 kb se encuentra localizado el gen determinante de la diferenciación testicular conocido como *SRY* en el humano y *Sry* en el ratón (Berta y col., 1990). Este gen pertenece a la superfamilia de proteínas caracterizadas por tener un motivo de unión al DNA conocido como

HMG (High mobility group) que comprende aproximadamente 70 a.a. (Rimini y col, 1995) y se encuentra agrupado dentro de una clase de factores de transcripción denominados proteínas SOX que poseen una homología de más del 60% con el *Sry* (Whitfield y col, 1993). Estudios de homología a nivel de secuencias han demostrado que el gen evolutivamente más cercano al *Sry* es el *Sox3*, que se localiza en el cromosoma X (Lim y col, 1998). El *Sry* induce una proliferación del epitelio celómico de las crestas gonadales en los fetos de sexo masculino (Schmahl, 2000) y de la migración de células mesenquimáticas provenientes del mesonefro hacia la cresta gonadal (Capel y col., 2000). Entre estas células mesonérficas, se encuentran los precursores de células de Leydig, de vasos sanguíneos y de otros elementos del tejido intersticial del testículo, así como de las células mioideas peritubulares. La presencia de éstas últimas parece ser determinante para que las futuras células de Sertoli, provenientes al menos en parte del epitelio celómico. Se ha propuesto la interacción entre las células mesonérficas y las células del epitelio celómico provocaría la diferenciación de las últimas hacia células de Sertoli (Capel y col., 2000), las cuales comenzarían a mostrar un patrón de expresión específico, caracterizado por un aumento de *Sox9* y de *AMH*, conjuntamente con una disminución de *DAX1* (Swain y Lovell-Badge, 1999).

Si bien no se conocen con precisión los mecanismos moleculares por los cuales actúa el *Sry*, existen evidencias experimentales que *Sry* y *DAX1*, cuyo gen se encuentra en el cromosoma X, interactúan en períodos tempranos del desarrollo

de las crestas gonadales (Swain y col., 1998). Se ha demostrado también que Sox9 se encuentra involucrado en la determinación sexual gonadal, este se encuentra localizado en el cromosoma 11 y su expresión se lleva a cabo en sitios donde sucede la condrogénesis, su expresión en el ratón se localiza en la cresta urogenital alrededor de los 10.5 a 11.5 d.g. y se lleva a cabo de manera diferencial entre machos y hembras (Lim y col., 1998). Durante la diferenciación del ovario su expresión disminuye, mientras que en el macho aumenta por lo que se ha relacionado directamente con la expresión del Sry. Existe un modelo que propone que el gen Sox3 y el Sry compiten por la unión en los sitios reguladores de la expresión del Sox9, cuando se trata de una hembra el factor que se está uniendo al Sox9 es el Sox3 y si es macho sucede de manera inversa (Lim y col., 1998).

## **2. FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA TIPO I**

Los factores de crecimiento similares a la insulina son moléculas mitogénicas que participan en la diferenciación y en la proliferación celular (Froesch y col., 1985; Zapf y Froesch, 1986). También se ha propuesto que estos factores juegan un papel importante en diversos procesos patológicos como el cáncer y otras enfermedades (Mercola y Stiles, 1988).

Los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGF's) fueron caracterizados bioquímicamente por Rinderknecht y Humble en 1979 a partir de plasma humano denominándolos IGF-I e IGF-II (Insulin-like growth factor I y II). Estas moléculas son péptidos con capacidad mitogénica de bajo peso molecular (7649 D el IGF-I y 7471 el IGF-II), poseen una cadena sencilla con tres puentes disulfuro intracatenarios que se encuentran estructuralmente relacionados con la insulina (Sara y Hall, 1990). El IGF maduro contiene los dominios A, B, C, D, y E, los dos primeros son homólogos a las cadenas A y B de la insulina (Sara y Hall, 1990; Giudice, 1992). El hígado es la principal fuente de secreción en la edad adulta del IGF- I, durante la etapa fetal también se encuentran en tejidos como riñón, hígado pulmón y en todo el sistema nervioso central, por lo que se consideran factores de secreción endócrina, parácrina y autócrina.

### **2.1 Organización del gen y la proteína**

El IGF-I está formado por seis exones, cinco intrones y dos promotores, los exones 1 y 2 codifican para regiones alternas 5' no traducidas 5' (UTR) y para los

codones que inician la traducción, localizados junto al marco de lectura abierto ubicado en los exones 3 y 4 y contienen parte de la información para los péptidos señal divergentes. El exon 3 también codifica para una región de éste y una zona del dominio B del IGF-I maduro. El exon 4 codifica para el resto del dominio B, los dominios C, A y D y la región amino terminal del péptido E, el 5 para una parte del péptido E y el 6 para el extremo carboxilo terminal del mismo y la región 3' no traducida 3' (UTR) (Humbel, 1984). Estudios de biología molecular en los que se analizó el DNA complementario del IGF-I en el ratón. Se determinó la presencia de dos precursores del IGF-I denominados A y B, los que difieren en el tamaño y la secuencia del extremo carbonilo terminal. En ambos la secuencia del péptido señal, la región codificante para el IGF-I y los primeros 16 a.a. del extremo carboxilo terminal del dominio E son iguales. La diferencia en la forma B del precursor se debe a una inserción de 52 bases, que inducen un fragmento de 17 a.a. en el extremo carboxilo terminal y provoca un desplazamiento en el marco de lectura del RNA originando otro RNA mensajero. La estructura del gen del IGF-I de ratón parece muy compleja, debido a que se observan variaciones en las regiones 5' (UTR) y en los sitios de poliadenilación que no están presentes en otras especies estudiadas. En el humano la localización del gen del IGF-I se encuentra en el extremo distal del autosoma 12 (Powell, 1987). En el ratón el IGF-I es similar a la insulina en estructura y función, induce la síntesis de lípidos y de ácidos nucleicos y estimula la proliferación y captación de glucosa y glucógeno. Este factor de crecimiento pesa 7.5 KD y está formado por una cadena de 70 residuos

de aminoácidos que está constituida por los dominios B, C, A, D, y E. los dominios A y B son homólogos estructurales de las cadenas A y B de la insulina y el C es análogo del péptido conector C de la protoinsulina. El dominio D y E son exclusivos de este factor, este último es cortado durante el procesamiento del precursor y se ha detectado en la circulación. Sin embargo, se desconoce su función. Existen datos de la presencia de varias especies de IGF-I en el cerebro de embriones de humano, útero de porcinos y calostro de los ovinos.(Daughaday, 1989).

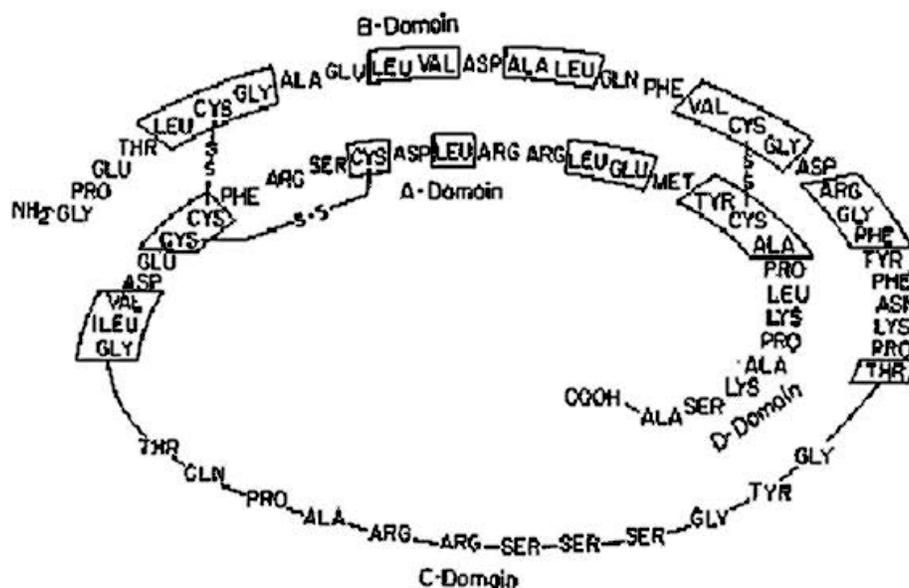


Figura. 2.1. Secuencia de la proteína del IGF-I, (Tomado de Clemmons,1989).

## 2.2 Expresión en diferentes tejidos

El IGF-I es capaz de estimular el crecimiento del cartílago, la síntesis de ARN, de ADN y de proteínas y de procesos anabólicos. Durante el embarazo, estimula la

división celular y el crecimiento de los tejidos maternos, a la vez que potencia los procesos anabólicos que dan como resultado el incremento del tejido graso, de las reservas de glucógeno hepático, así como el desarrollo de las glándulas mamarias entre otras modificaciones (Clemmons, 1995). En esencia el IGF-I tiene efectos similares a los de la insulina sobre el músculo y la placenta al estimular el transporte de aminoácidos y glucosa, así como inhibir la lipólisis en el tejido adiposo (Clemmons, 1995).

Los efectos biológicos desencadenados por el IGF-I *in Vitro* en diferentes tipos celulares puede ser muy rápidos, debido al catabolismo de proteínas y carbohidratos y a largo plazo en el que se involucran aspectos de diferenciación celular. El IGF-I es producido posnatalmente por diversos órganos como riñón, útero, pulmón y gónadas. Sin embargo, el hígado es el órgano que sintetiza los mayores niveles de este factor. Este se conoció inicialmente como Somatomedina-C, debido a que media la acción de la hormona de crecimiento y además, participa en funciones de proliferación, diferenciación y motilidad celular entre otras. El IGF-I también induce la expresión del protooncogen c-fos, que se asocia a procesos de diferenciación celular (Ong J, 1987). Asimismo, se sabe que es un factor de progresión del ciclo celular, induce la síntesis de la ciclina D1 en células derivadas de osteoblastos, inhibe la apoptosis en células hematopoyéticas y estimula la proliferación de otros tipos celulares como: condrocitos, músculo liso, fibroblastos, adipocitos, espermatogonias, oligodendrocitos, células de Sertoli y Leydig (Sara y Hall, 1990). La acción del IGF-I sobre estas dos últimas estirpes

celulares plantea la posibilidad de que éste participe como un factor parácrino en la maduración y diferenciación de las células precursoras de los gametos. Investigaciones recientes demuestran que este factor de crecimiento puede además, participar en el crecimiento de la masa cefálica y en otras funciones del cerebro. Este factor predomina en la etapa posnatal siendo regulado en la rata por la hormona del crecimiento y por esteroides sexuales. Sin embargo, el mecanismo no se ha esclarecido hasta el presente (D'Ercole, 1996).

### **2.3 Participación en la función gonadal**

La expresión del IGF-I se ha asociado en el control de la producción hormonal en las gónadas. En la etapa embrionaria el, IGF-I administrado *in Vitro* promueve la síntesis de testosterona y la diferenciación de cordones parecidos a los testiculares, después de siete días de cultivo (Taketo, 1991). La expresión del IGF-I se ha detectado en diferentes tipos celulares durante el desarrollo posnatal del ovario y del testículo. En la rata el RNA mensajero se localiza en las dos primeras semanas después del nacimiento en las células de Sertoli, Leydig, peritubulares y ocasionalmente en las espermatogonias. En el testículo del adulto en esta especie se expresan diferentes transcritos de 7.5, 4.7, 1.7, y 0.9 kb, sin embargo, se desconoce la relevancia biológica de estos hallazgos. En la rata adulta, únicamente se observa en los espermatoцитos en la etapa de paquiteno y en las espermátides, lo cual sugiere que este factor podría intervenir en la diferenciación y/o maduración de estas células. En el ratón los transcritos para el IGF-I se

localizan en el compartimento intersticial a los 14 d.p.p. y después de los 35 d.p.p. se observan sólo en las espermatídes (Hansson y col, 1989). Estudios realizados en ovarios de las hembras XY en la cepa de ratón B6. Y<sup>tir</sup> se observó que el RNA mensajero del IGF-I se produce desde el primer día en el ovario XX, mientras que en el ovario XY este mensajero se detectó hasta los 15 d.p.p. y la proteína de este factor se localiza en las células de la teca del ovario XX y XY (Villalpando y col, 1996). El IGF-I participa en la biosíntesis de esteroides sexuales. Existen evidencias experimentales de que el IGF-I potencia la expresión de enzimas claves para el metabolismo de esteroides, debido a que aumenta la velocidad de transcripción de estos genes en la célula de Leydig teca y granulosa. En las células de Leydig de cerdo cultivadas en la presencia del IGF-I se ve un incremento en la síntesis del receptor del RNA mensajero a LH (Chuzel y col, 1996) . El análisis de la función del IGF-I realizados en cultivos de células foliculares aisladas a los 25 días d.p.p., y en experimentos en los que se cultiva el órgano completo en las primeras etapas foliculogénesis, mostraron que este factor inhibe la producción de 17- $\beta$ -estradiol, testosterona y progesterona, lo cual sugiere que en la regulación de la función de este factor probablemente están involucrados otros factores endócrinos parácrinos y autócrinos. Posnatalmente la función del IGF-I parece ser mediada por diferentes hormonas y no se ha establecido completamente. En testículos de ratas hipofisectomizadas la LH, FSH y GH aumentan la expresión del RNA mensajero del IGF-I (Werner y col, 1991). También promueve que en las gónadas indiferenciadas genótipicamente XY,

después de 7 días de cultivo en medio libre de suero, se diferencien en testículos e incrementen sus producción de testosterona. Este factor no tiene el mismo efecto en gónadas diferenciadas (12 d.g.) y en cultivo (Taketo y col.,1991).

#### **2.4 Receptor para el IGF-I**

Los efectos biológicos de los IGF's dependen de la unión a glicoproteínas de membrana que funcionan como sus receptores. Hay dos receptores que reconocen específicamente a los IGF's. Estos receptores están presentes en todos los tipos de células. El receptor del IGF-I o receptor tipo 1 está localizado principalmente en fibroblastos, condrocitos, osteoblastos y células renales (Thissen, 1994). En el riñón normal, los receptores de IGF-I están localizados en el glomérulo y en algunos segmentos del túbulo distal y proximal así como en los ductos colectores (Wang, 1999).

Estructuralmente el receptor tipo I del IGF-I es un complejo heterotetramérico que consiste de dos subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$  con peso molecular de 300 a 350 KD, la especificidad de unión del ligando está conferida por las regiones ricas en cisteína del dominio extracelular de las subunidades alfa, mientras que la actividad de la tirosina reside en los dominios citoplásmicos de las cadenas beta (Werner, 1991). El receptor tipo 1 une a IGF-I e IGFII y a la insulina la une débilmente cuando ésta se encuentra en altas concentraciones (Rechler y col, 1985). El receptor tipo I presenta una afinidad de unión mucho mayor por el IGF-I (Thissen, 1994). Este

receptor es sintetizado como un simple polipéptido precursor (180 kD) que es subsecuentemente glicosilado y unido en las subunidades membranales  $\alpha$  y  $\beta$ . El complejo receptor de IGF-I traspasa la membrana plasmática vía las subunidades membranales  $\beta$  por dominios espaciados, porciones de residuos de 195 a.a. de las subunidades sobresalientes de la superficie celular asociados por uniones disulfuro (Daughaday, 1989).

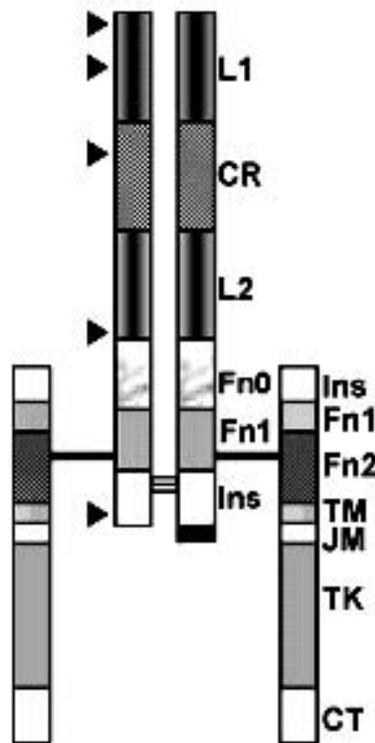


Figura. 2.2. Estructura del receptor de IGF-I (IGF-1R). El esquema muestra los sitios L1 y L2 (dominios largos ricos en leucina); CR (dominio rico en cisteína); Fn0, Fn1, Fn2 (dominios tipo III de fibronectina); Ins (dominio de inserto); TM (dominio transmembranal); JM (dominio yuxtamembranal; TK (tirosin cinasa) y CT dominio C-terminal. Modificado de Denley, 2005.

La activación del receptor IGF-I ocurre después de la unión con el ligando e involucra la autofosforilación de la subunidad beta del receptor. La fosforilación ocurre inicialmente en los residuos de tirosina 1131, 1135 y 1136, también se puede dar en residuos de serina y treonina. La autofosforilación de la subunidad beta produce la actividad tirosina cinasa. Varias proteínas más son fosforiladas después de la estimulación con IGF-I (Werner y col., 1994). La autofosforilación produce la iniciación de por lo menos dos cascadas de señalización. La primera es la activación de la cinasa PI-3 y la formación de fosfatidilinositol-3 fosfato (PIP3) que puede servir como marcador de crecimiento celular. La segunda vía involucra a las proteínas cinasas activadoras de la mitosis (MAPK por sus siglas en inglés) (Werner y col., 1994).

### **2.5 Proteínas de unión del IGF-I**

Las proteínas de unión de los IGF's (IGFBP's) son moléculas que presentan una alta afinidad por los IGF's y que se encuentran principalmente en líquidos extracelulares, jugando importantes papeles en el control de las acciones de los IGF's (Clemons, 1991; Baxter, 1991).

Actualmente han sido descritas seis formas diferentes de IGFBP's (IGFBP-1 a IGFBP-6). Las IGFBP's presentan afinidades muy altas por ambos IGF's, a menudo superiores a las que presentan los receptores de los IGF's por sus ligandos. Debido a que la insulina no se une a estas proteínas, las IGFBP's

podrían estar implicadas en los mecanismos reguladores diferenciales y coordinados de las acciones de estas dos clases de hormonas (IGF's e insulina). Las IGFBP-1, -2 y -3 presentan homologías estructurales entre sí, como son la presencia de regiones ricas en cisteínas. De estas tres IGFBP-1 y -2 contienen una secuencia de Arg-Gly-Asp cerca de su carboxilo terminan, lo cual podría mediar su fijación a proteínas de la matriz extracelular, denominadas integrinas (Rosenfeld y col., 1990; Clemons, 1991).

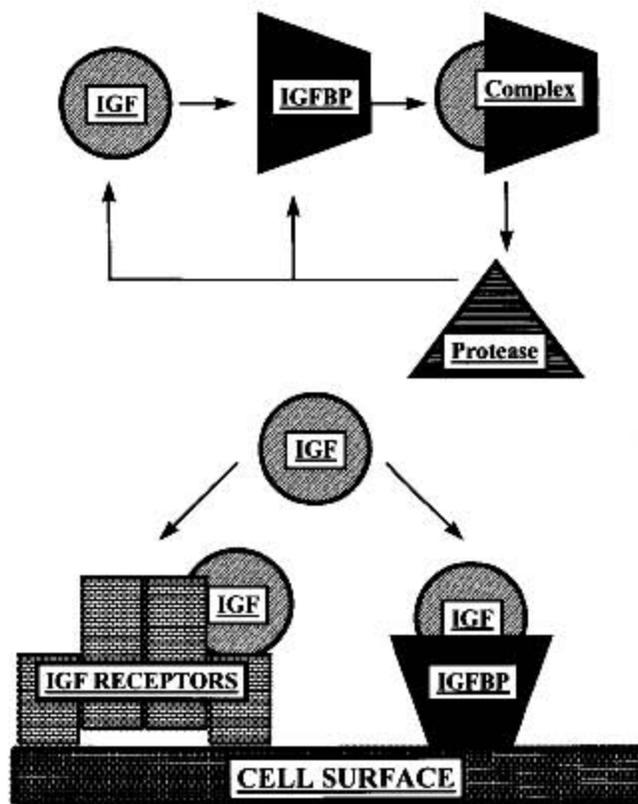


Figura. 2.3. Componentes del sistema IGF-I. El esquema muestra la interacción de las IGFBP's con el IGF y su presentación con el IGF-1R. Modificado de Brett, 1999.

Las IGFBP's pueden regular: I) la cantidad y el transporte de los IGF's en los compartimientos vasculares, II) el transporte de los IGF's en líquidos intersticiales hacia células y tejidos específicos, III) la cantidad de IGF's disponible por interaccionar con sus receptores específicos , IV) el metabolismo de los IGF's en los fluidos intersticiales y V) la acción de los IGF's en sus células blanco, potenciándola o inhibiéndola (Clemons, 1991; Baxter, 1991).

### 3. INSULINA

#### 3.1 Organización del gen

La estructura del gen de la insulina está altamente conservada entre varias especies. Este consta de tres exones y dos intrones (Bell y col., 1980). El exón 1 se encuentra localizado en la región 5' no traducible del gen, el exón 2 contiene secuencias que codifican para el péptido señal, la cadena B de la insulina y una parte del péptido C, mientras que el exón 3 codifica para el resto del péptido C, la cadena A de la insulina y secuencias 3' no traducibles. La secuencia y longitud de los intrones es muy variable entre especies, sin embargo, la longitud relativa (el intrón 1 es mas corto que el 2) y la posición son altamente conservadas.

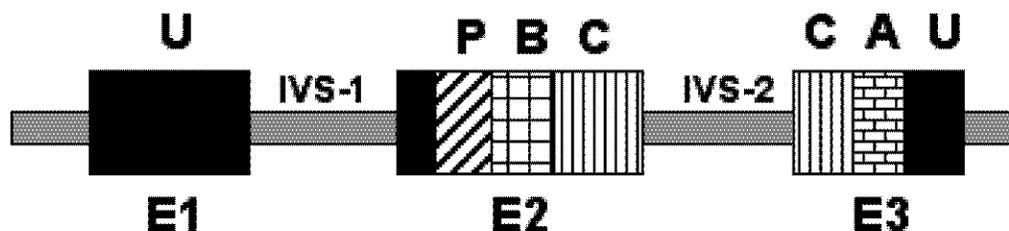


Figura. 3.1. Estructura del gen de la insulina. El esquema indica la disposición de los exones E1-E3 y los intrones IVS-1 e IVS-2. modificado de Clark y Docherty, 1992.

El gen de la insulina está presente como una sola copia en muchos vertebrados incluyendo al hombre, sin embargo en la rata y el ratón, existen dos genes de la insulina no alélicos, el tipo I y II, que son sintetizados casi en la misma proporción (52-48%)(Lomedico y col, 1979; Wentworth y col, 1986). El intrón 2 está ausente en el gen tipo I de la rata y el ratón. Los genes I y II de preproinsulina de rata se

encuentran separados uno del otro por 100, 000 Kb en el cromosoma 1 (Soares y col., 1985).

### 3.2 Organización de la proteína

La insulina es una molécula de 5.8 KD que es sintetizada en el páncreas. Está formada por dos cadenas polipeptídicas, la cadena A (21 aa) y la cadena B (30 aa), conectadas por dos enlaces disulfuro intermoleculares (A7-B7 y A20-B19) y un enlace intermolecular entre A6 y A11 (Hunter SJ, 1998).

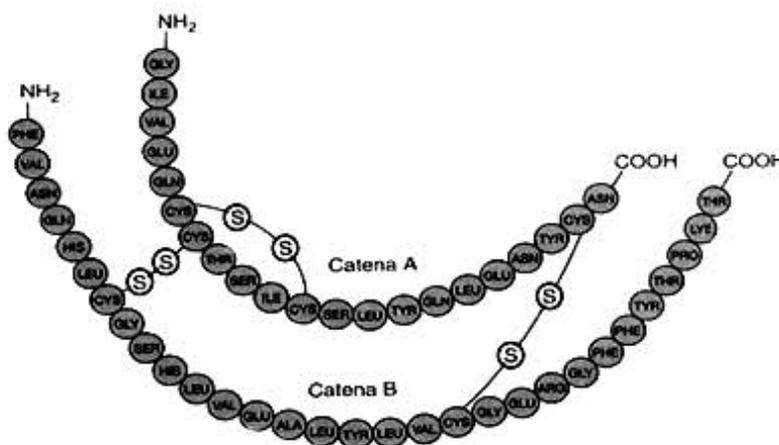


Figura 3.2. Secuencia de aminoácidos de la insulina. Tomado de Mathews, 1999.

La insulina es biosintetizada y secretada por el páncreas, este órgano posee células endocrinas, que secretan hormonas directamente al torrente sanguíneo. La insulina se sintetiza en las células  $\beta$  pancreáticas (en los islotes de Langerhans) en forma de prehormona. La preproinsulina, al perder 23 aminoácidos de la secuencia líder, se convierte a proinsulina unida por puentes disulfuro

intracatenarios y por el péptido C o péptido conector. Después de este proceso, la proinsulina se transforma en insulina por acción de endoproteasas específicas, quedando como hormona funcional (Hunter, 1998).

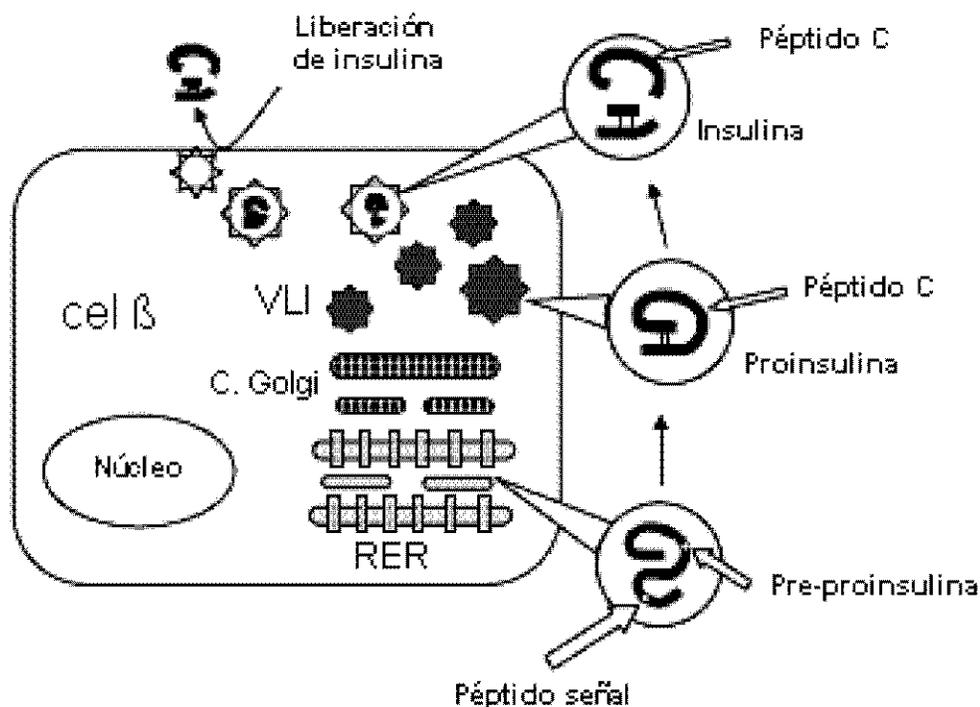


Figura 3.3. Síntesis y secreción de la insulina por las células  $\beta$  del páncreas. Tomado de Cruz, 2000 pág 135.

La insulina es regulada por una gran cantidad de factores incluyendo la glucosa, algunos aminoácidos, neurotransmisores y hormonas (Mathews, 1999).

## 4. ESTEROIDES SEXUALES

### 4.1 Clasificación

Las gónadas (testículos y ovarios), además de producir espermatozoides u óvulos, segregan hormonas esteroides (andrógenos y estrógenos) que regulan la diferenciación sexual, la expresión de las características sexuales secundarias y los modelos de comportamiento sexual. Aunque los testículos como los ovarios sintetizan tanto andrógenos como estrógenos, los testículos predominantemente secretan andrógenos (hormonas sexuales masculinas), mientras los estrógenos (hormonas sexuales femeninas) son sintetizados principalmente por los ovarios. (Fortune y Armstrong, 1977).

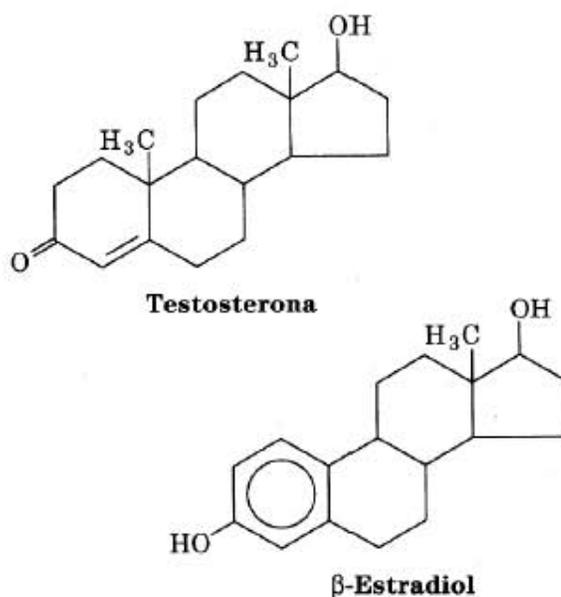


Figura 4.1. Hormonas sexuales masculina (testosterona) y femenina (β-estradiol). Tomado de Voet, 1990 pág 1243.

## **4.2 Biosíntesis**

El colesterol en el testículo, igual que en otros tejidos esteroidogénicos, es el principal sustrato en la síntesis de hormonas esteroides. Este es capaz de sintetizarse a partir de acetato (como Acetil-Coenzima A) o integrarse a la célula por el transporte a través de lipoproteínas plasmáticas. En las células de Leydig el colesterol se encuentra como gotas de lípidos que serán utilizadas durante la síntesis de andrógenos (Saez,1994). Se ha detectado RNA mensajero para las enzimas 20,22 desmolasa (P450scc) 3-β hidroxisteroide deshidrogenasa, 17-α hidroxilasa (P450C17) y aromatasa P450 (P450arom) en el testículo embrionario de ratón, estas enzimas participan en la síntesis de esteroides antes de que se diferencie estructuralmente este órgano (Greco, 1994).

Los andrógenos, son los esteroides que secretan principalmente las células de Leydig, la testosterona es el esteroide más importante para el aparato reproductor masculino, es la responsable de la diferenciación de la uretra, la próstata y los genitales externos de los machos, para poder llevar a cabo estas funciones, la testosterona es transformada en dihidrotestosterona por acción de la enzima 5α-reductasa (George, 1988).

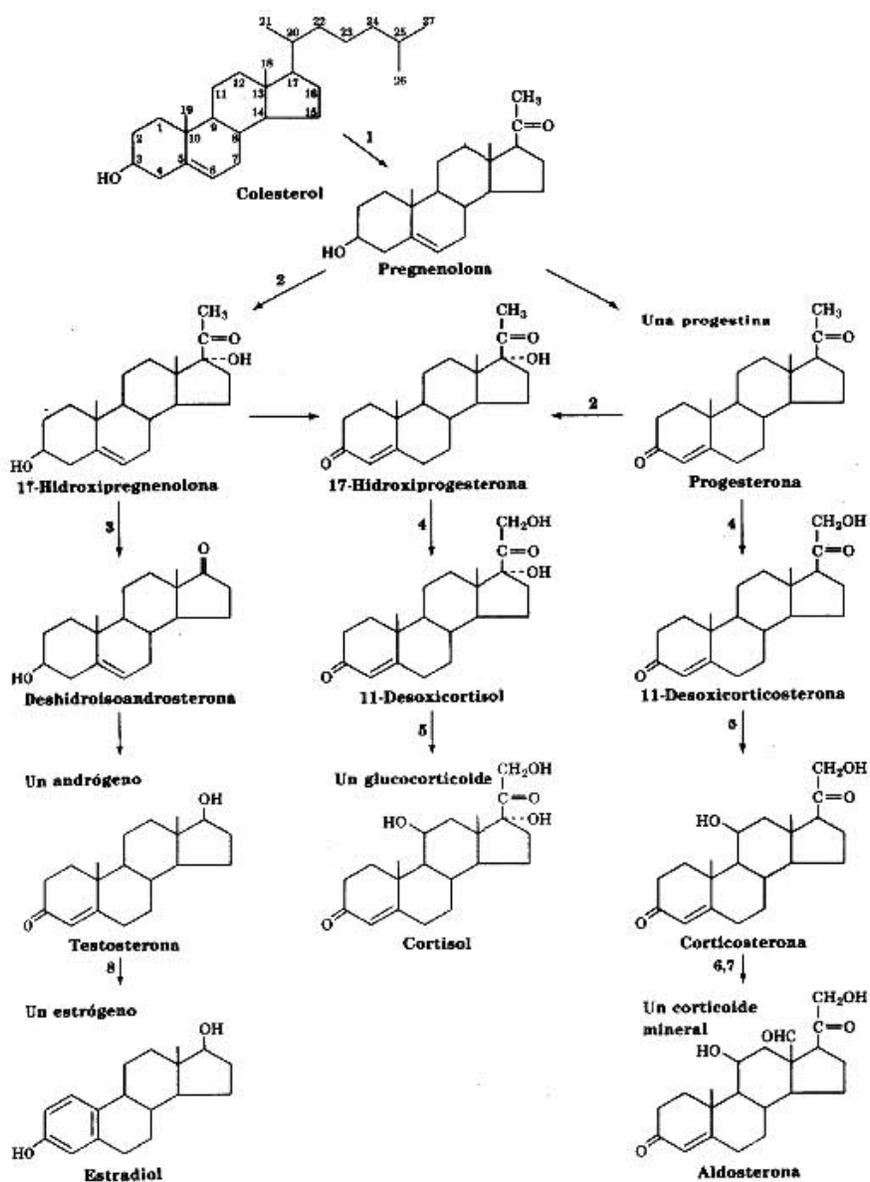


Figura 4.2. Síntesis de esteroides. Tomado de Voet, 1990 pág 703.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Investigaciones hechas en la rata adulta demostraron que la insulina promueve la producción de esteroides gonadales. Se ha descrito que el IGF-I también regula la secreción de hormonas sexuales en la vida adulta de diferentes especies de vertebrados. Estudios hechos comprobaron que el IGF-I en los testículos embrionarios de ratón aumenta tres veces los niveles de producción de 17- $\alpha$ -hidroxiprogesterona y testosterona de los 12 a los 18 d.g. Por otro lado, en experimentos hechos con ratones knockout en donde se impidió la expresión del IGF-I y su receptor en los testículos se observó que en la etapa adulta estos animales disminuyeron la secreción de testosterona y la espermatogénesis; produciendo 22% menos de espermatozoides. Estos datos sugieren que el IGF-I es un regulador de la función de la célula de Leydig. Asimismo, investigaciones realizadas en rata por Rouiller-Fabre y colaboradores, 1989, plantearon que a los 17.0 d.g. el IGF-I induce la diferenciación morfológica de las células de Leydig. Sin embargo, no se ha determinado si el IGF-I en presencia de células indiferenciadas como el tejido mesenquimático también conocido como tejido conectivo, promueve la diferenciación morfológica y funcional hacia células de Leydig. Una forma de demostrar el papel del IGF-I como factor de diferenciación es utilizando células de mesénquima de los miembros anteriores de embriones de 12 d.g. Por otro lado, tampoco se ha determinado la función de la insulina en el testículo en la etapa embrionaria.

## **IV. HIPÓTESIS**

➤ Estudios previos demostraron que el IGF-I y la insulina indujeron la diferenciación de las células mesenquimáticas a células de Leydig en la rata. De tal forma que la presencia del IGF-I e insulina en células mesenquimáticas de ratón de 12 d.g. inducirían la diferenciación morfológica, bioquímica y funcional a células de Leydig. Y por lo tanto, se esperaría que éstas células promovieran la producción de testosterona. Así mismo, en las células gonadales se esperaría mayor cantidad de testosterona por la adición de IGF-I exógeno.

## **V. OBJETIVOS**

1. Determinar si el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I a los 12 d.g. induce la secreción de testosterona y la diferenciación de las células mesenquimáticas a células de Leydig.
2. Establecer si las células mesenquimáticas de los miembros anteriores tratadas con IGF-I se diferencian fisiológicamente a células de Leydig a los 12 d.g.
3. Determinar si la insulina a los 12 d.g. promueve la síntesis de testosterona en células indiferenciadas del testículo.
4. Determinar si la insulina potencia la diferenciación de células mesenquimáticas del primordio anterior a células de Leydig a los 12 d.g.

## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **a) Material biológico**

Se utilizaron ratonas adultas gestantes de la cepa CD1, las cuales se mantuvieron a una temperatura de 18°C, con ciclo de luz/oscuridad de 12/12 y 80% de humedad relativa en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Los animales mantuvieron una dieta con alimento esterilizable Harlan Tekland México LM-485 y con agua estéril acidificada a pH 2.5.

### **b) Cirugía experimental de embriones de ratón**

Ratonas gestantes de la cepa CD1 fueron sacrificadas a los 12 d.g. La eutanasia se realizó mediante dislocación cervical, inmediatamente después fue realizada una incisión abdominal en forma de “V” y se extrajo el útero. Los embriones aislados se disecaron y transfirieron a una caja de Petri estéril con medio de cultivo M199 suplementado. Posteriormente se separaron los embriones macho y se les extirparon los testículos y los miembros posteriores y anteriores para su posterior manipulación (Fig. 6.1).

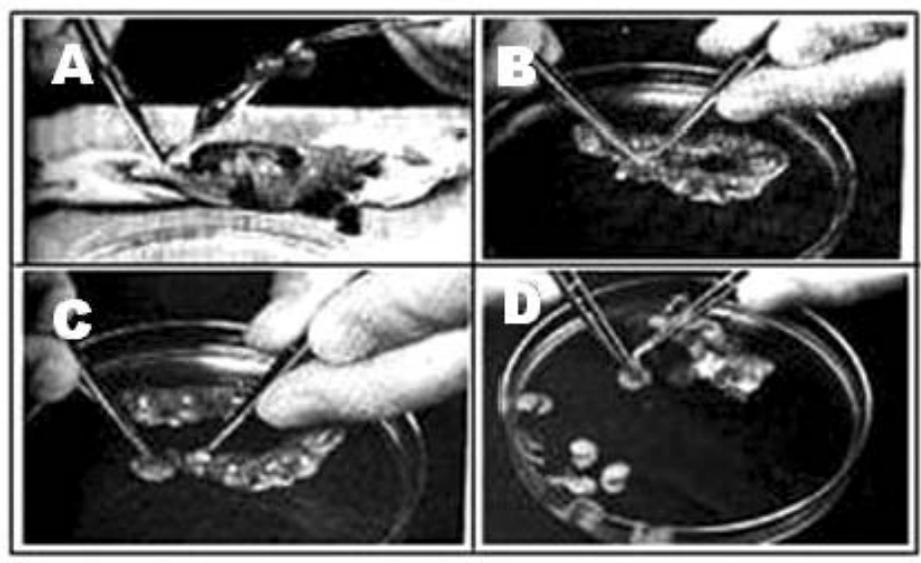


Figura. 6.1. Procedimiento del aislamiento de los embriones de ratón de 11.5 d.g.  
A) Cavidad abdominal. B) Extracción del útero. C) Aislamiento del embrión.  
D) Obtención de la gónada y/o miembro anterior.

### c) Disgregación celular

Se aislaron un promedio de 30 miembros anteriores y 25 testículos en tubos Eppendorf con medio de cultivo M199 estéril. Ambos tejidos fueron lavados con 500  $\mu\text{L}$  de PBS libre de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ , el medio y el PBS se retiraron con una pipeta Pasteur siliconizada. Posteriormente se realizaron tres lavados con 100  $\mu\text{L}$  de EDTA 0.1mM cada uno. Inmediatamente después se incubaron los tejidos con una solución de tripsina 0.1% a 37 °C, 90 rpm por 13 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó una disgregación manualmente con una pipeta Pasteur siliconizada y se detuvo la reacción con solución de inhibidor de tripsina 0.2%. Después de este procedimiento se prosiguió a centrifugar la suspensión celular obtenida 10 min a 1800 rpm con el fin de obtener el botón de las células

disgregadas. Este fue resuspendido en 500  $\mu\text{L}$  de medio D'MEM suplementado con albúmina 0.1%, bicarbonato de sodio 7.5%, L-glutamina 200 mM, penicilina G-sódica con sulfato de estreptomicina 5 000 U/  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , piruvato de sodio 11mg/mL y amortiguador HEPES 250 mM.

**d) Conteo celular**

Después de la disgregación celular se realizó un conteo de las células viables para su cultivo, el conteo se realizó utilizando una solución 1:1 de la suspensión celular y el colorante azul de tripano al 0.2% (v/v). Se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular y 10  $\mu\text{L}$  del colorante y se mezclaron perfectamente, después se adicionó un volumen de 10  $\mu\text{L}$  de esta mezcla en una cámara de Neubauer limpia. Se observó en un microscopio óptico modelo Galen<sup>™</sup> III y se contaron las células contenidas en los cuatro cuadrantes externos de la cámara. El total de células se calculó para obtener el número contenido por mililitro, con la siguiente ecuación:

$$\# \text{ cel/mL} = (\# \text{ cel en 4 cuadrantes})(2500)(\text{Factor de dilución})$$

**e) Cultivo celular**

Conociendo el número de células contenidas en la muestra, se realizó el cálculo para obtener un volumen en el cual se contara con una cantidad de 150, 000 células. Dentro de una campana de flujo laminar para proporcionar un ambiente estéril, se adicionó a 1 mL de Medio Esencial Dulbeco Modificado (D'MEM)

suplementado contenido en cajas Petri la muestra respectiva con las 150, 000 células de cada tejido. Se realizó un promedio de 12 experimentos por tejido con los siguientes tratamientos:

**Tabla 1. Dosis de insulina e IGF-I empleada en las células de los miembros anteriores de embriones de ratón de 12 d.g.**

<b>TEJIDO</b>	<b>IGF-I (ng)</b>	<b>INSULINA (ng)</b>
<b>MIEMBROS ANTERIORES</b>	100	100
	0 (control)	0 (control)

**Tabla 2. Dosis de insulina e IGF-I empleada en las células de los testículos de embriones de ratón de 12 d.g.**

<b>TEJIDO</b>	<b>IGF-I (ng)</b>	<b>INSULINA (ng)</b>
<b>TESTÍCULOS</b>	100	100
	0 (control)	0 (control)

Después de verificar que las células se encontraban suspendidas en el medio utilizando un microscopio óptico Galen<sup>™</sup> III, las muestras fueron incubadas durante un periodo de 72 horas a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub> (Fig. 7.1). Durante este tiempo se monitoreó el desarrollo de las células en el medio de cultivo. Después del tiempo de incubación se recolectaron los medios de cultivo en tubos de ensaye

Pyrex de vidrio de 13 mm x 10 mm y se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior cuantificación de testosterona.

**f) Extracción de testosterona**

Las muestras de medio de cultivo almacenadas fueron descongeladas a temperatura ambiente, posteriormente fueron realizados cuatro lavados de 3 mL cada uno con una mezcla de hexano-etanol 7:3 (v/v) en un embudo de separación de 25 mL, la fase orgánica fue recolectada en tubos de ensaye y se dejó evaporar a temperatura ambiente 24 horas en una campana de extracción para su análisis inmunoenzimático (IEA).

**g) Cuantificación de testosterona por análisis inmunoenzimático**

Después de evaporarse totalmente el disolvente, los esteroides fueron resuspendidos en 500  $\mu\text{L}$  de PBS estéril. Los tubos se agitaron en un vortex durante 2 minutos. Para la cuantificación se utilizó un estuche de ELISA Diagnostic System Laboratories Inc., los pozos que iban a ser utilizados fueron marcados, se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de los estándares (0,5,10,20,40 ng/mL), controles y muestras experimentales. Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de solución del conjugado y un volumen de 100  $\mu\text{L}$  del anticuerpo antitestosterona a cada uno de los pozos y se incubó 1 hora a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación constante de 500 rpm. Después de transcurrir el tiempo de incubación, los pozos fueron lavados cinco ocasiones con una solución especial de lavado contenida en el estuche (1 ml solución concentrada +

24 ml H<sub>2</sub>O destilada), la solución fue decantada sobre papel absorbente. Después del proceso de lavado se adicionaron 100 µL de una solución reveladora (TMB solución cromógena) y se mantuvo en oscuridad 30 minutos a 500 rpm. Transcurrido este tiempo, la reacción fue parada con 100 µL de una solución de ácido sulfúrico 0.2 M y se leyó la absorbancia en un lector BioRad 3550 a una longitud de onda de 450 nm.

#### **h) Análisis estadístico**

Los resultados experimentales fueron analizados estadísticamente utilizando la prueba de t - student con un nivel de significancia del 99.5%, ( $t_{0.995}$ ).



## VII. RESULTADOS

### 1. Cultivo celular

Durante el proceso de cultivo celular, el desarrollo celular fue monitoreado durante el periodo de incubación. El desarrollo celular obtenido (Figura 7.1) fue adecuado, se puede observar la formación de la matriz extracelular y los contactos que se establecen entre las células gonadales.

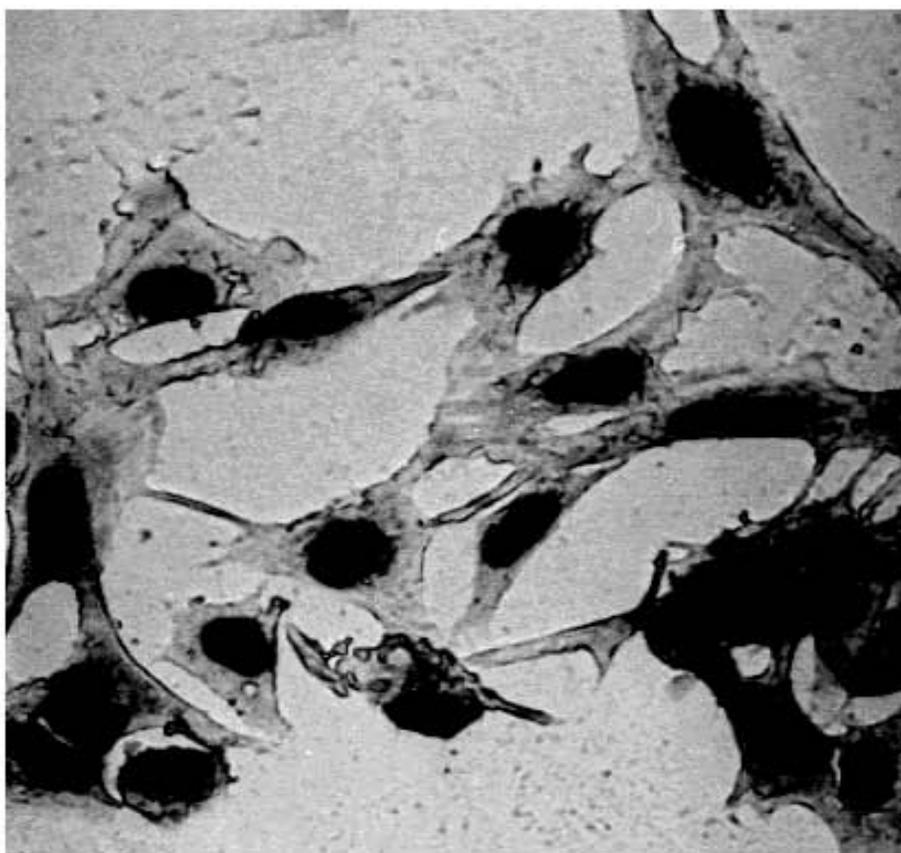


Figura 7.1. Fotografía que muestra el crecimiento de células testiculares de 12 d.g. en medio de cultivo teñido con Giemsa. 400X.

## 2. Cultivo de células mesenquimáticas del primordio anterior

### a) Efecto del IGF-I en la secreción de testosterona

Los resultados que arrojaron los experimentos realizados con IGF-I en las células mesenquimáticas embrionarias de los miembros posteriores de ratón de 12 d.g. mostraron que cuando dichas células se trataron con el IGF-I, secretaron una cantidad mayor de testosterona que en ausencia del IGF-I (Figura. 7.2)

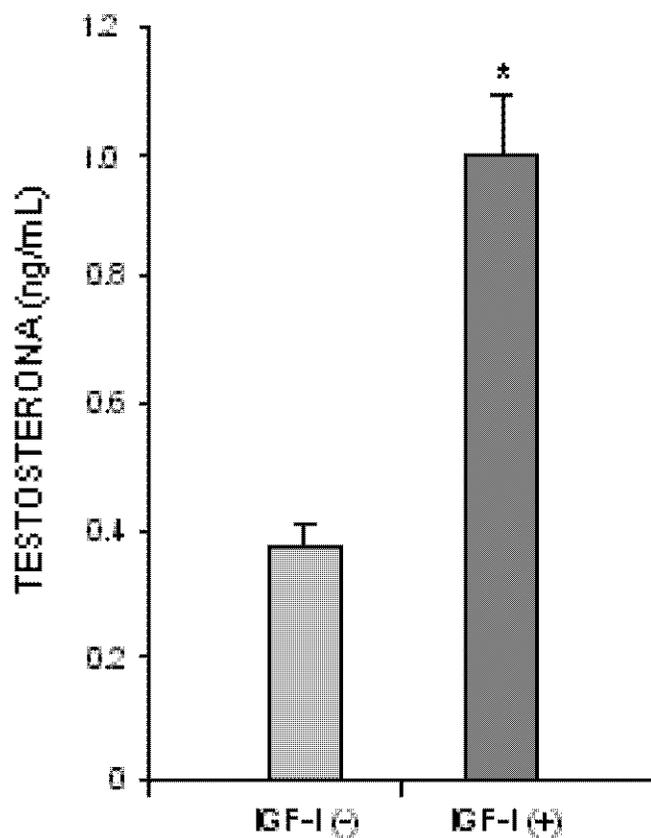


Figura 7.2. Producción de testosterona por efecto de IGF-I en las células mesenquimáticas embrionarias (12 d.g.) de los miembros anteriores. La gráfica muestra el promedio de 12 experimentos por variable y el error estándar \*,t-student,  $t_{.995}$ .

**b) Efecto de la insulina en la secreción de testosterona**

La figura 7.3 muestra la secreción de testosterona en las células mesenquimáticas embrionarias de los miembros anteriores de ratón de 12 d.g. Se observa que cuando estas células se trataron con insulina fueron capaces de sintetizar una cantidad significativamente mayor de testosterona que cuando dicho péptido no se adicionó en el medio.

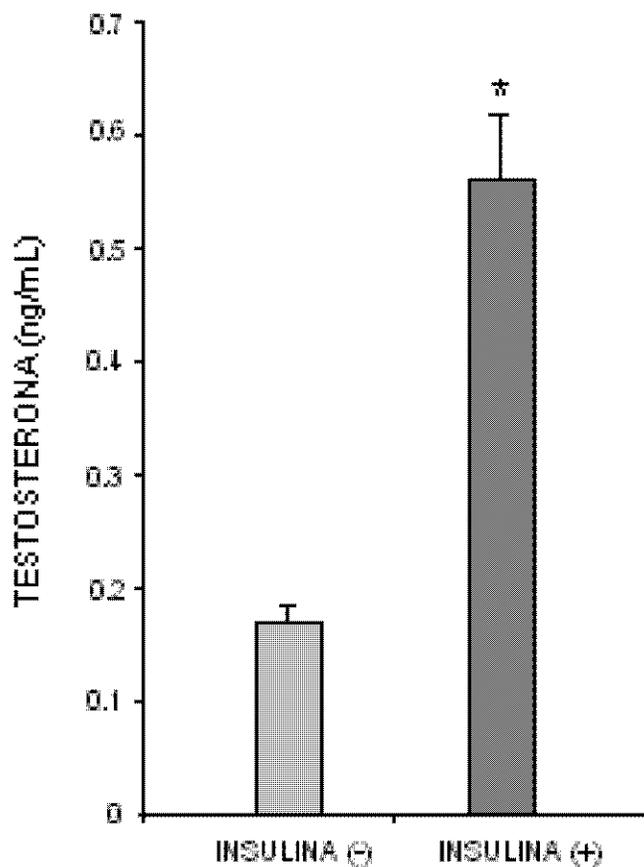


Figura 7.3. Producción de testosterona por efecto la insulina en las células mesenquimáticas embrionarias (12 d.g.) de los miembros anteriores. La gráfica muestra el promedio de 12 experimentos por variable y el error estándar \*,t-student.  $t_{.995}$ .

### 3. Cultivo de células testiculares

#### a) Efecto del IGF-I en la secreción de testosterona

Con lo que respecta a los experimentos realizados en las células testiculares, se observó que cuando en estas células se encontró presente el IGF-I produjeron una cantidad mayor de testosterona al ser comparada con las células a las cuales no se le adicionó el IGF-I (Figura 7.4).

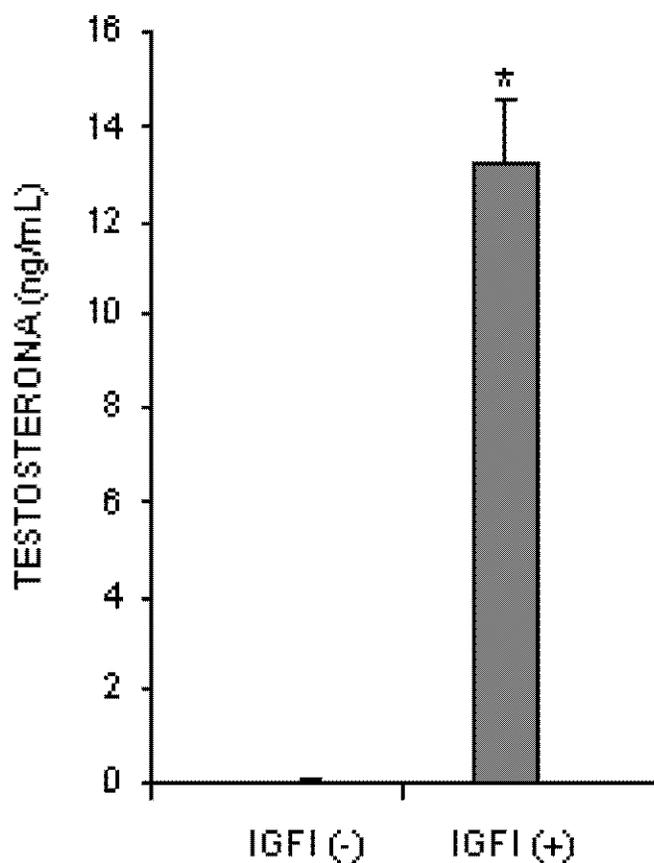


Figura 7.4. Producción de testosterona por IGF-I en los testículos embrionarios de 12 d.g. La gráfica muestra el promedio de 12 experimentos por variable y el error estándar \*, t-student,  $t_{,995}$ .

**b) Efecto de la insulina en la secreción de testosterona**

La comparación de las cantidades de testosterona producida por las células testiculares mostró que cuando la insulina es administrada a dichas células, estas son capaces de segregar cantidades significativamente mayores de esta hormona.

La figura 7.5 muestra tal comportamiento.

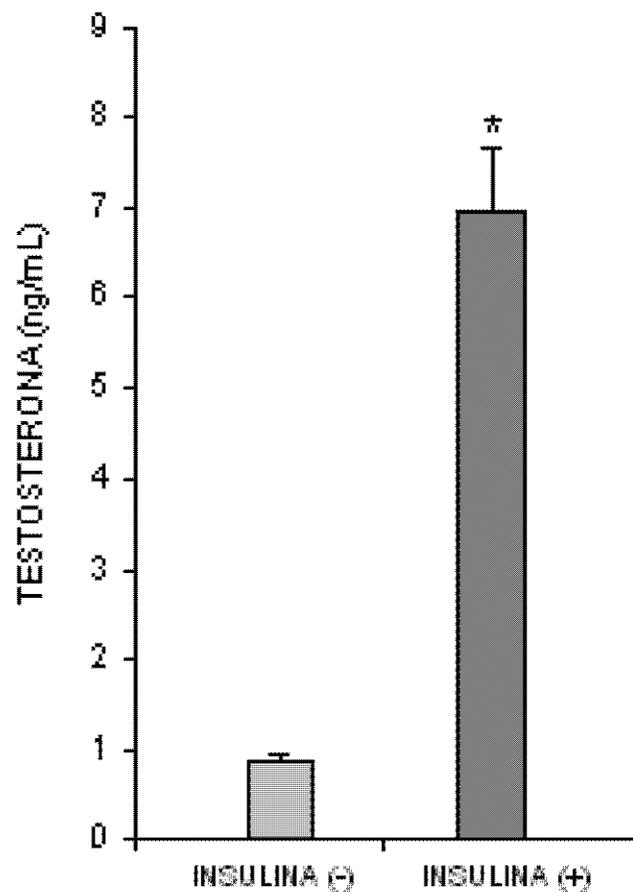


Figura 7.5. Producción de testosterona por efecto de la insulina en los testículos embrionarios de 12 d.g. La gráfica muestra el promedio de 12 experimentos por variable y el error estándar \*, t-student,  $t_{.995}$ .

#### 4. Relación en la secreción de testosterona por IGF-I en las células testiculares y mesenquimáticas de los miembros anteriores

Comparando la secreción de testosterona producida por el efecto del IGF-I en los tejidos que se utilizaron para este trabajo. Observamos que la producción de esta hormona fue significativamente mayor en las células testiculares que en las células mesenquimáticas de los miembros anteriores, se produce alrededor de trece veces la cantidad de testosterona en las células testiculares que en las de mesénquima de los miembros anteriores de embriones de 12 d.g. (Figura 7.6).

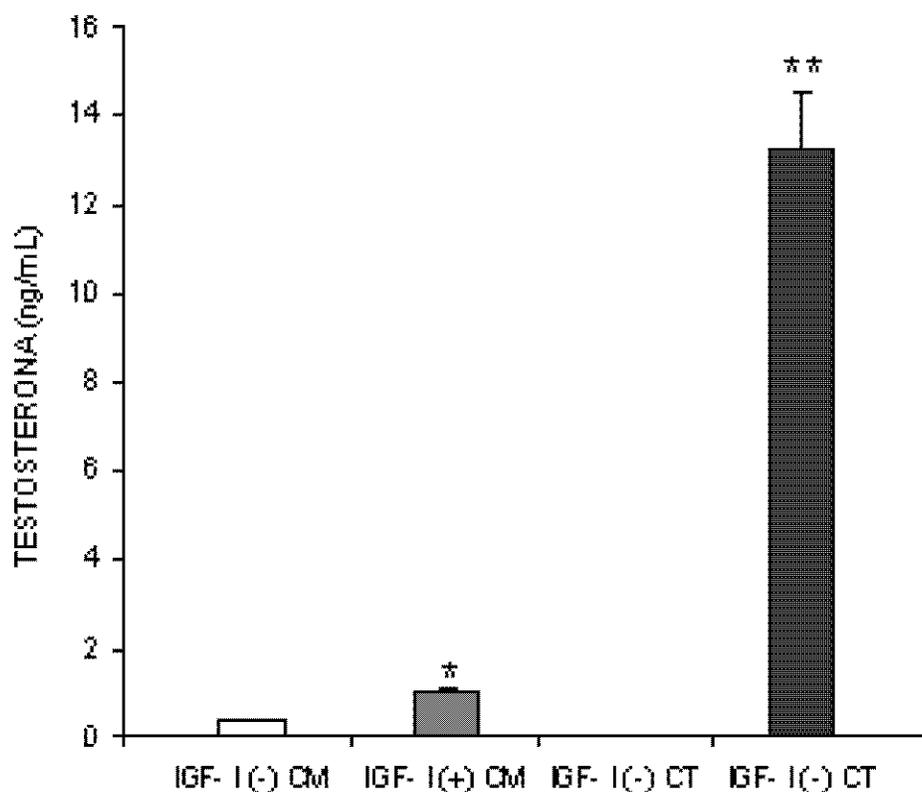


Figura 7.6. Producción de testosterona por efecto del IGF-I en las células mesenquimáticas de los miembros (CM) y testículos (CT) de embriones de 12 d.g. La gráfica muestra el promedio de 12 experimentos por variable y el error estándar \*, \*\*, t-student,  $t_{.995}$ .

## 5. Relación en la secreción de testosterona por efecto de la insulina en las células mesenquimáticas de los miembros anteriores y testiculares

El comportamiento en la secreción de testosterona por efecto de la insulina, mostró que en las células testiculares, la producción de ésta hormona es doce veces mayor que en las células mesenquimáticas de los miembros anteriores en embriones de ratón de 12 d.g. (Figura 7.7).

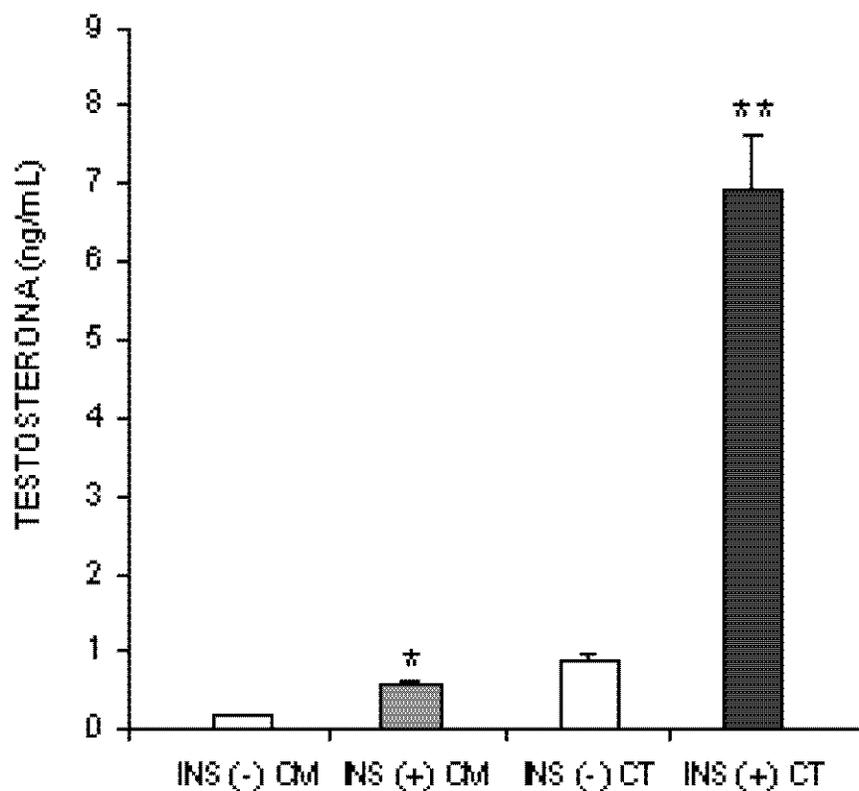


Figura 7.7. Producción de testosterona por efecto de la insulina en las células mesenquimáticas de los miembros anteriores (CM) y testículos (CT) de embriones de 12 d.g. La gráfica muestra el promedio de 12 experimentos por variable y el error estándar \*, \*\*, t-student,  $t_{.995}$ .

## 6. Relación en la secreción de testosterona por IGF-I e insulina en las células mesenquimáticas de los miembros anteriores y células testiculares

Los resultados que se obtuvieron en los experimentos muestran que tanto el IGF-I como la insulina producen una cantidad significativamente mayor en la secreción de testosterona en las células testiculares que en las de mesénquima de los miembros anteriores en embriones de 12 d.g. También puede observarse que existe un mayor efecto secretor por parte del IGF-I con respecto a la insulina. La figura 7.8 muestra éste comportamiento.

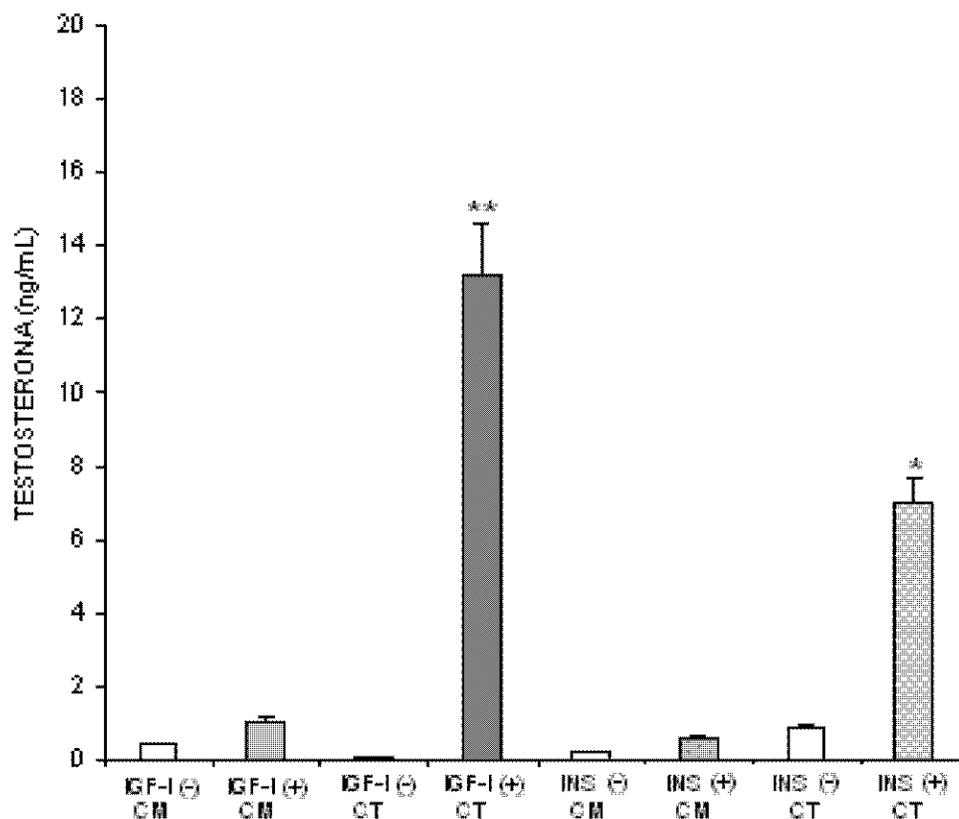


Figura 7.8. Producción de testosterona por efecto del IGF-I e insulina en las células mesenquimáticas de los miembros anteriores (CM) y testículos (CT). La gráfica muestra el promedio de 12 experimentos por variable y el error estándar \* t-student,  $t_{.995}$  del grupo.

## VIII. DISCUSIÓN

En el presente estudio se describe el efecto del IGF-I y la insulina en la diferenciación de las células del mesénquima de los miembros anteriores y de las células gonadales a células de Leydig, así como en la secreción de testosterona.

De acuerdo con los resultados obtenidos se observó que el IGF-I posee la capacidad de inducir la producción de testosterona en las células gonadales cultivadas con el IGF-I a los 12 d.g. Estos datos están de acuerdo con los hallazgos realizados en células testiculares *in vitro* de rata en la etapa fetal de 16 y 18 d.g. (Roullier-Fabre y col, 1989) en los que se propone que el IGF-I es un inductor de la diferenciación de las células de Leydig. Estudios previos demuestran que el IGF-I es un regulador de la función secretora de las células de Leydig en el testículo adulto en varias especies de vertebrados (Clemon, 1995).

En esta etapa se ha propuesto que el aumento en la síntesis de esteroides ocurre debido a que el IGF-I induce la expresión del RNA mensajero de enzimas que participan en la biosíntesis de esteroides (Werner y col, 1991). Es posible que el IGF-I induzca la expresión de genes que regulan la expresión enzimas esteroideogénicas y de otros factores relacionados también con el metabolismo de esteroides gonadales en etapa embrionaria. Con respecto al efecto del IGF-I en las células mesenquimáticas de los miembros anteriores, observamos que este factor fue capaz de promover la diferenciación de células mesenquimáticas a

células secretoras, como las células de Leydig, esto se observó en la producción de testosterona secretada por el IGF-I en el medio de cultivo de las células. La diferenciación fisiológica y el comportamiento de estas células pudo deberse a que el receptor del IGF-I se encuentra en fibroblastos y condrocitos de las extremidades anteriores provocando la diferenciación a células masculinas (Thissen, 1994). Aunque se sabe que la insulina e IGF-I comparten algunos genes en la cascada de señales, hasta la fecha no se ha descrito la vía de señalización que ocurre en las células testiculares.

Es probable que la testosterona detectada en el mesénquima de los miembros anteriores sea la producida normalmente en tejido blanco como la piel, aunque este proceso sólo se ha descrito en la etapa adulta (Straus y col, 1981). Comparando la producción de testosterona en células somáticas testiculares con respecto a células mesenquimáticas del primordio de la mano, las primeras tuvieron una mayor síntesis de esta hormona ya que en los testículos se produce normalmente esta hormona masculina (Taketo, 1991; Villalpando-López Olmos, 2003). La mayor cantidad de testosterona determinada con el IGF-I podría además ser explicada porque, este factor pudo haber inducido la diferenciación del tejido mesenquimático que se encuentra alrededor de los cordones sexuales a células de Leydig en etapas muy tempranas de la diferenciación. A los 10.5 d.g., justo antes de que ocurra la diferenciación sexual de la gónada por el *Sry*, este gen se expresa en la cresta genital (Koopman y col, 1990) que es el área donde se

desarrollará el futuro testículo. El hallazgo de que a los 12 d.g. del desarrollo gonadal se pudo regular la capacidad secretora de estas células plantea que las células testiculares ya están comprometidas a desarrollarse en glándulas sexuales masculinas con capacidad de biosintetizar testosterona. Probablemente desde la etapa inicial de su diferenciación de acuerdo al sexo genético del individuo.

Por otra parte, los resultados de las pruebas con insulina mostraron que el efecto de esta hormona es similar al exhibido por el IGF-I. Este comportamiento pudo deberse a que son moléculas pertenecientes a la misma familia y que poseen similitud en su estructura. Además, ambas proteínas cuentan con receptores de características y funciones similares y comparten algunos sustratos (Sara y Hall, 1990) de la cascada de señalización. La vía de señales se ha estudiado en diferentes tipos celulares y en diferentes tejidos (Giudice, 1992), pero aún falta por establecer qué genes se expresan para explicar a nivel molecular el mecanismo de señales de células gonadales.

Comparando la actividad de la insulina con la producción de testosterona comprobamos que el IGF-I posee una mayor capacidad de inducción y diferenciación de la actividad secretora de las glándulas reproductoras masculinas y actividad en la diferenciación celular. Este factor produjo una cantidad significativamente mayor de testosterona en tejido testicular con respecto a las

células mesenquimáticas aisladas del miembro anterior tratadas con insulina. Este comportamiento puede ser atribuido a que el IGF-I posee además proteínas de unión acarreadoras como las IGFBP1y IGFBP3 (Clemons, 1991; Baxter, 1991), entre las cuales la primera juega un papel importante en la regulación de la secreción de testosterona en las células testiculares aisladas (Guerra-Dávalos, 2005). Además en estudios recientes se observó que el IGF-I producido localmente tiene varias funciones, inducir la proliferación de las células somáticas (Castrejón-López; Villalpando y col, 2006), así como ser un inductor de la diferenciación morfológica y regulador de la actividad endócrina del testículo fetal (Villalpando y col 2006). En resumen, el IGF-I y la insulina participan en la producción de testosterona del testículo fetal y promueven la diferenciación del tejido mesenquimático a células de Leydig del ratón *Mus musculus* en la etapa embrionaria. Sin embargo, para poder establecer mejor el papel del IGF-I y la insulina en la diferenciación de las células mesenquimáticas. Hace falta realizar experimentos complementarios, utilizando cultivos con tejido de embriones de ratón hembra para comprobar su función en la fase uterina. Además podrían utilizarse cultivos de líneas celulares mesenquimáticas de ratón como la 3T3 para determinar si el origen genético de estos tejidos influyen en la diferenciación del mesénquima a células de Leydig.

## IX. CONCLUSIONES

- el IGF-I es un inductor de la diferenciación de tejido indiferenciado de mesénquima de los miembros anteriores de embriones a células de Leydig a los 12 d.g.
- La insulina tiene un efecto menor con respecto al IGF-I en la inducción de la diferenciación bioquímica de las células mesenquimáticas de miembros anteriores a células secretoras de Leydig.
- La insulina promueve la función secretora de las células gonadales de Leydig del testículo fetal.
- El IGF-I es el regulador más eficaz de la actividad secretora de las células somáticas de Leydig del testículo fetal.

## **X. BIBLIOGRAFÍA**

**Bell GI, Pichet RL, Rutter WJ, Cordel B, Tischer E, Goodman HM.** 1980. Sequence of the human insulin gene. *Nature* 284, 26-32.

**Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN y Fellow M.** 1990. Genetic evidence equating SRY and testis-determining factor. *Nature* 348: 448-4850.

**Castrejón-López CE.** 2005. Papel del Factor de Crecimiento Similar a la Insulina Tipo I (IGF-I) en la proliferación y actividad endócrina del testículo embrionario del ratón. Universidad Nacional Autónoma de México.

**Clemmons DR, Busby WH, Arai T, Nam TJ, Clarke JB, Jones JI, Ankrapp DK.** 1995. Role of insulin-like growth factor binding proteins in the control of IGF actions. *Prog Growth Factor Res* 6: 357-366.

**Clemmons DR, Thissen J, Maes M.** 1989. Insuline-like growth factor-I (IGF-I) infusion into hypophysectomied or protein deprived rats induces specific IGF-I binding proteins in serum. *Endocrinology* 125:2967-2972.

**Daughaday WH, Rotwein P.** 1989. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 10: 68-91.

**D' Ercole AJ, Ye P, Calikoglu AS, Gutiérrez-Ospina G.** 1996. The role of the Insulin-like growth factors in the central nervous system. *Mol Neurobiol* 13: 227-255.

**Fortune J and Armstrong D.** 1977. Androgen production by theca and granulosa isolated from preestrus rat follicles. *Endocrinology* 1000: 1341-1347.

**Gilbert SF.** 1994. Sex determination, Cap 21. En *Developmental Biology*. 759-787.

**Ginsburg M, Snow MHL, Mc Laren A.** 1990. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110: 521-528.

**George FW, Wilson JD.** 1988. Sex determination and differentiation. Cap1. En *the Physiology of reproduction*, Knobil E, Neill. Pag 3-21. Raven Press Ltd, New York.

**Greco TL, Payne AH.** 1994. Ontogeny of expression of the genes for steroidogenic enzymes P450 side-chain cleavage, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, P450 17  $\alpha$ -Hidroxilase/C<sub>17-20</sub> liase, and P450 aromatase in fetal mouse gonads. *Endocrinology* 135: 262-268

**Hansson HA, Billing H, Isgaard J.** 1989 Insulin-Like Growth Factor I in the Developing and mature rats testis: Immunohistochemical aspects. *Biol Reprod* 40: 1321-1328.

**Harper ME, Ullrich A and Saunders GF.** Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. *Proc Natl Acad Sci* 78: 4458-4460.

**Humbel RE.** 1984. Insulin-like growth factors, somatomedins, and multiplication stimulating activity: chemistry. En *Hormonal proteins and peptides* Li CH (ed) Academic Press 57-59.

**Hunter SJ, Garvey WT.** 1998. Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors signal transduction, and glucose transport effector system. *AmJ Med* 105: 331-345.

**Jones JI, Clemmons DR.** 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 16: 3-34.

**Jost A.** 1947. Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. II Action des Androgènes Synthèse sur l'histogénèse génitale. *Arch. D' Anat. Micros Morphol Exp* 36: 242.

**Jost A.** 1953. Problems in fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Rec Prog Horm Res* 8: 379.

**Kato H, Faria TN Stannard B, Roberts CTJ, Le Roith D.** 1993. Role of tyrosin kinase activity in signal transduction by the Insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor. Characterization of kinase-deficient IGF-I receptors and the action of an IGF-I mimetic antibody (alpha IR-3). *J Biol Chem* 268: 2655-2661.

**McLaren A, Buehr M.** 1990. Development of mouse germ cells in cultures of fetal gonads. *Cell Differ Dev* 31: 185-195.

**Merchant-Larios H.** 1976. The role of germ cells in the morphogenesis and cytodifferentiation of rat ovary 464-472.

**Merchant-Larios H.** 1991. El sexo gonadal. En memorias del congreso conmemorativo del jubileo del instituto de investigaciones biomédicas de la UNAM. Tomo I UNAM 451-461.

**Merchant-Larios H, Taketo T.** 1991. Testicular differentiation in mammals under normal and experimental condition. *J Electron Microscop Tech* 19: 158-171.

**Merchant-Larios H.** 1984, Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis. In ultrastructure of reproduction Ed. Martinus Nijhoff Publ Chap. 3: 19-30.

**Münsterberg A, Lovell-Badge R.** 1991. Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 113: 613-624.

**Ong J, Yamashita S, Melmed S.** 1987. Insulin-like growth factor I induces c-fos messenger ribonucleic acid in L6 rat skeletal muscle cells. *Endocrinology* 120: 353-357.

**Powell DR, Lee PDK, Chang D, Lin F, Hintz R.** 1987. Antiserum developed for the E peptide region of the Insulin-like growth factor IA prohormone recognizes a serum protein by both immunoblot and radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 55: 868-875.

**Rechler MM, Nissley SP.** 1985. The nature and regulation of the receptors for insulinlike growth factors. *Ann Rev Physiol* 47:425-42.

**Rotwein PS, Pollock K, Didier D, Krivi G.** 1986. Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene. *J Biol Chem* 261: 4828-4832.

**Ruíz-Durá MF.** 1988. Fundamentos de embriología y fisiología de la reproducción. Universidad Nacional Autónoma de México. *Omega* 2: 25-41.

**Saez JM.** 1994. Leydig cells: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Endocr Rev* 15: 574-625.

**Sara VR, Hall K.** 1990. Insulin-Like Growth Factors and their Binding Proteins. *Physiol Rev* 70: 591-614.

**Shimatsu A, Rotwein PS.** 1987. Mosaic evolution of the insulin-like growth factors. *J Biol Chem* 262: 7894-7900.

**Soares MB, Schon E, Henderson A, Karathanasis SK, Cate R, Zeitlin S, Chirgwin J and Joose J.** 1985. RNA-mediated gene duplication: the rat preproinsulin I gene is a functional retroposon. *Mol Cell Biol* 5: 2090-2103.

**Taketo T, Saed J, Roberge S, Matsuo N, Koide S.** 1991 Regulation of testicular differentiation and testosterone production in the fetal mouse gonad *in vitro*. *J. Steroid Biochem Mol Biol* 38: 523-531.

**Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE.** 1994. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev* 15(1):80-95.

**Villalpando FI.** 2001. Péptidos en la biología de la reproducción de los mamíferos. En biología de la reproducción II de Javier Velásquez Moctezuma. UAM. pág 121-143.

**Villalpando FI.** 2001. Sinfonía de genes gonadales. *Ciencia y desarrollo* 160:32-41.

**Villalpando FI, Olmos-López V.** 2003. Insulin-Like Growth factor I (IGF-I) regulates endocrine activity of the embrionic testis in the mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86:151-158.

**Wang SN, Lapage J, Hirschberg R.** 1999. Glomerular ultrafiltration of IGF-I may contribute to increased renal sodium retention in diabetic nephropathy. *J Lab Clin Med* 134(2):154-60.

**Werner H, Adamo M, Roberts CT, Leroith D.** 1994. Molecular and cellular aspects of insulin-like growth factor action. *Vitam Horm.* 48:1-39.

**Werner H, Woloschak M, Staumard B, Shen-Orr Z, Roberts CT Jr, Le Roith D.** 1991. The insulin-like growth factor I receptor: molecular biology, heterogeneity, and regulation. En insulin-like growth factors: molecular and cellular aspects. Le Roith 8<sup>th</sup> ed. CRC Press, Boca Raton, Pag. 17-47.