

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO ONTOGÉNÉTICO DE LA EXPRESIÓN
DEL RNA mensajero DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
SIMILAR A INSULINA TIPO II (IGF-II) Y EL EFECTO DE LA
INSULINA EN SU EXPRESIÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

Erika Franco Carrera



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: FERNANDO GARCIA TAMAYO

VOCAL: RAQUEL ORTEGA MUÑOZ

SECRETARIO: MARIA IRMA VILLALPANDO FIERRO

1er. SUPLENTE: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

2do. SUPLENTE: MARCOS FLORES ALAMO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

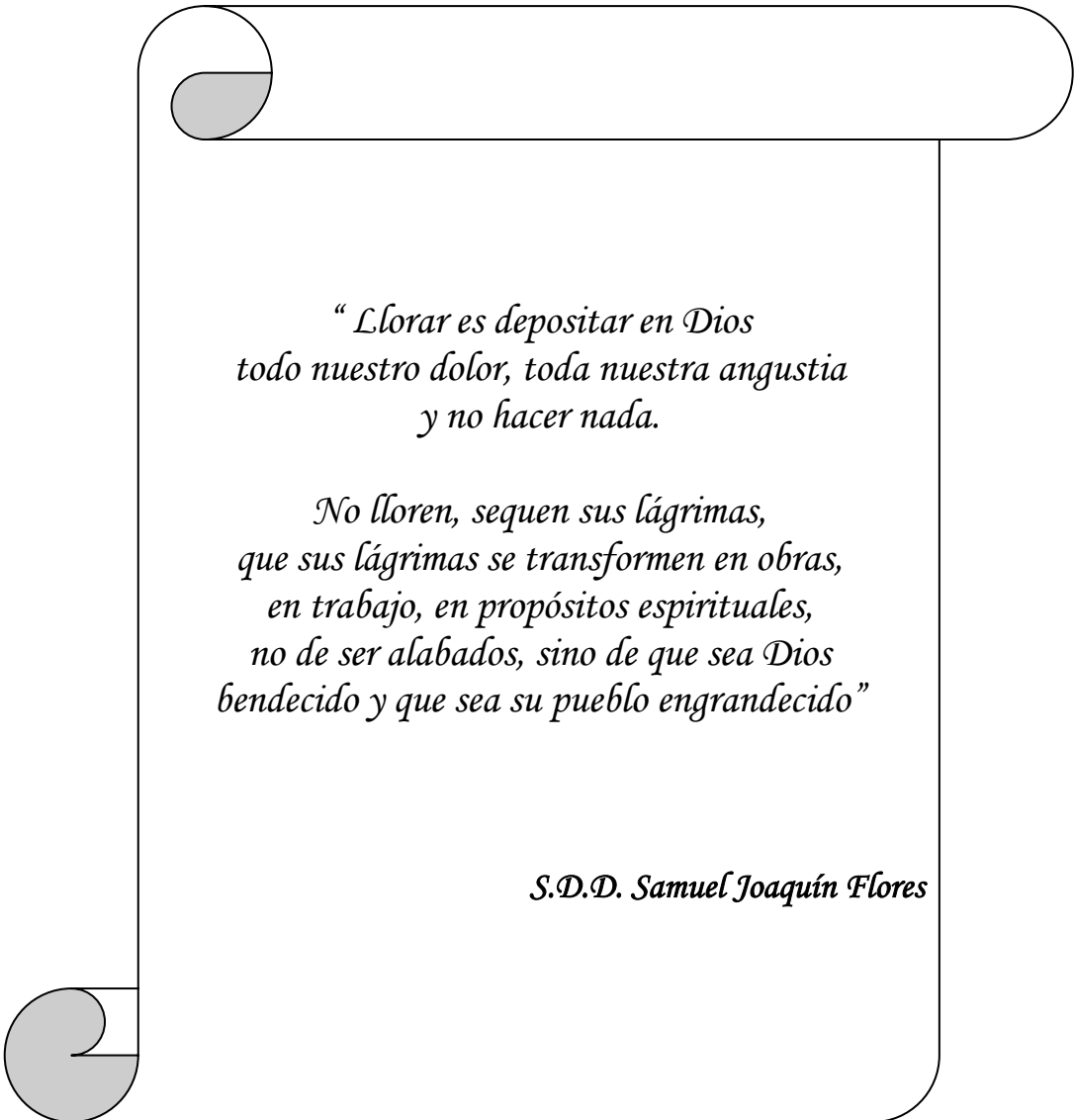
LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA MOLECULAR EN EL DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA CELULAR Y FISIOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS, UNAM.

ASESOR DEL TEMA

DRA. MARÍA IRMA VILLALPANDO FIERRO

SUSTENTANTE

ERIKA FRANCO CARRERA



*“ Llorar es depositar en Dios
todo nuestro dolor, toda nuestra angustia
y no hacer nada.*

*No lloren, sequen sus lágrimas,
que sus lágrimas se transformen en obras,
en trabajo, en propósitos espirituales,
no de ser alabados, sino de que sea Dios
bendecido y que sea su pueblo engrandecido”*

S.D.D. Samuel Joaquín Flores

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Irma Villalpando Fierro por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por compartir su conocimiento y experiencia en la biología molecular así como sus deliciosos platillos árabes con los que nos deleitaba en los cumpleaños ¡Gracias!.

A la Biol.. Esmeralda Lira por todo el apoyo que me brindaste en la realización de los experimentos y por lo divertido que era entrar al bioterio.

A la Universidad Nacional Autónoma de México de la cual me siento muy dichosa y orgullosa de ser egresada de ella, por ser la única universidad del país y de Latinoamérica que esta dentro de las 100 mejores universidades del mundo.

A la Facultad de Química que en la encuesta del periódico Reforma "Las Mejores Universidades 2004-2005" la carrera QFB campus CU obtuvo el primer lugar. Facultad que se convirtió en mi segundo hogar, recordare con mucho cariño mi estancia en ella.

Al Departamento del Biología y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM por haber prestado sus instalaciones en la realización de esta tesis.

A DEGAPA proyecto IN 216205 por el apoyo para la realización de esta investigación.

A Cesar Luna Toledo por su colaboración en los tramites de esta tesis.

DEDICATORIAS

Al creador del universo nuestro DIOS que me permitió vida, sabiduría, fuerza y perseverancia, por permitirme saber un poquito de lo que el creó. " Por que Jehová da la sabiduría, y de su boca viene el conocimiento y la inteligencia"(Pr2,6).Por que todo lo que tengo y todo lo que soy es por DIOS.

A mi Señor Jesucristo por que siempre ha escuchado mis oraciones y durante toda mi carrera vi sus milagros.

Al Apóstol de Dios Samuel Joaquín Flores por enseñarme a ser cada día mejor persona, mejor estudiante, mejor ciudadana, mejor hija y mejor cristiana , y por permitirme limpiar mis lagrimas al sentir su brazo en mi hombro.

Al:

D.E. David Chávez Joaquín	y esposa	Maria Hernández
D.E. Ambrosio Vázquez	y esposa	Cetura Mosqueda Joaquín
O.E. Josué Mora	y esposa	Ada Pantoja
D.E. Eliud Ramírez	y esposa	Susana Carrillo

Por que cada uno de ustedes en el momento preciso me dieron consejos, apoyo moral no permitiendo que me sintiera sola.

DEDICATORIAS

Al Dr. Héctor León Garza ejemplo de que en México hay excelentes Médicos reconocidos internacionalmente y además un hombre con calidad humana que me dio la oportunidad de trabajar durante toda la carrera con él y que si no fuera por su apoyo, enseñanza y flexibilidad de horario todo hubiera sido más difícil.

A mi MAMI, gracias por que nunca me dejaste sola, porque siempre estuviste ahí en mis desvelos y en la enfermedad. Porque festejaste conmigo mis triunfos y te afligiste en mis tropiezos y por que se que darías la vida por alguno de tus hijos.

A mis hermanos Karla, Fermín y David por haberme hecho la vida mas divertida.

A mis hermosos sobrinos que son una de mis motivaciones de vida Eliam, Salma, Elisa y la pequeña Sinaí.

A cada uno de mis abuelitos, tíos, primos y parientes que se me pudieran estar pasando.

DEDICATORIAS

A Daniel Cervantes amigo, compañero, confidente gracias a ti la estancia en la facultad fue mas ligera y divertida.

A mis súper amigochos Dalila, Inés, Claudia, Noemí, Luis, Joab, Evaristo, Raúl, Adriana, Marisol que siempre tuve en ustedes apoyo, comprensión, paciencia y se que en mas de una ocasión me llevaron en oración y me brindaron palabras de aliento y me hicieron sentir que si se podía. DLP.

A mis amigos de la facultad Judith, Nancy, Eder, Marcelino, Amalia, Carolina, Adriana, Ana Cabañas, Elena, Jorge y muchos mas que no terminaría de mencionar, por que nos dimos cuenta que solos no podíamos seguir el camino dentro de la facultad, por las divertidas que pasábamos en el centro recreativo de la facultad (la biblioteca).

A ti que por mas de 10 años has estado dentro de mi corazón.

¡Ah! y a mi Papá

A TODOS 1000 GRACIA

ÍNDICE

	Página
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
1.- Formación y desarrollo de la gónada del ratón.....	2
a) Origen de las glándulas reproductoras.....	2
b) Establecimiento del sexo cromosómico.....	2
c) Formación de la gónada.....	2
<i>i)</i> Cresta genital.....	2
<i>ii)</i> Gónada Indiferenciada.....	6
<i>iii)</i> Diferenciación testicular.....	7
2.- El gen primario de la diferenciación testicular.....	11
a) Ubicación.....	11
b) Organización.....	12
c) Expresión en células somáticas.....	12
3.- Genes autosomales que participan en la diferenciación testicular.....	12
4.- Factor de crecimiento similar a insulina tipo II (IGF-II).....	14
a) Organización molecular del gen en roedores.....	15
5.- Organización del receptor del IGF-II.....	17
a) Aspectos moleculares.....	17
b) Función.....	18
c) Expresión en tejido.....	18
6.- Regulación del IGF-II.....	19
a) Papel en la esteroidogénesis.....	19
b) Función en la diferenciación celular.....	20
7.- Aspectos generales de la insulina.....	20
a) Tipos de insulina.....	21
b) Gen.....	23
c) Características de la insulina empleada.....	24



III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS.....	25
IV. OBJETIVOS.....	27
V. MATERIAL Y METODO.....	28
1. Reactivos.....	28
2. Animales.....	28
3. Generación de embriones de ratón.....	28
4. Muestras biológicas.....	28
5. Tratamiento administrado.....	29
6. Identificación del sexo gonadal.....	29
7. Análisis de genes.....	30
a) Diseño de oligonucleotidos sintéticos.....	30
b) Extracción del RNA total testicular.....	31
c) Obtención del DNA complementario.....	32
d) Amplificación del gen por PCR.....	32
e) Visualización del producto amplificado.....	33
VI. RESULTADOS.....	34
1.- Expresión de RNAm del <i>Igf-II</i>	34
a) Desarrollo normal.....	34
b) Expresión del <i>Igf-II</i> en el grupo tratado con insulina NPH.....	35
2.- La insulina regula negativamente al gen <i>Igf-II</i>	36
VII. DISCUSIÓN.....	37
VII. CONCLUSIONES.....	41
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	42
X. APÉNDICE.....	49





II. RESUMEN

La determinación sexual del ovario y testículo se lleva a cabo en la etapa intrauterina. Investigaciones recientes demostraron que el factor de crecimiento semejante a insulina tipo II (*Igf-II*) es producido por las células de Leydig en la etapa embrionaria. Sin embargo, el papel del *Igf-II* se ha estudiado poco tanto en la vida adulta como en la etapa embrionaria. La expresión del RNAm se ha descrito en ovarios XX y ovarios XY durante el desarrollo uterino. Sin embargo, la expresión del RNAm no se ha descrito durante el desarrollo normal del testículo del ratón prenatal. El objetivo de esta investigación fue estudiar la expresión del RNAm del *Igf-II* en el testículo de los 12 a los 18 dg en la etapa embrionaria en el ratón CD1 y evaluar el efecto de la insulina en la regulación del gen *Igf-II*. A las ratonas preñadas de 18 y 16 dg se les administró 5 UI de insulina cada 24 horas dos días antes de la cirugía. Asimismo, se emplearon ratonas preñadas como control sin ningún tratamiento de las edades antes mencionadas las cuales fueron sacrificadas por dislocación cervical. Se aislaron los embriones y se obtuvieron los testículos, tanto del grupo control como del tratado con insulina, se extrajo el RNA total y se analizó por RT-PCR. Los resultados muestran que la expresión del RNAm del *Igf-II* se incrementa a lo largo del desarrollo embrionario de los 12-18 dg en testículos normales. La expresión del transcripto del gen constitutivo *Hprt*, a lo largo del desarrollo fue constante. Se propone que la insulina regula negativamente la expresión del *Igf-II* en el testículo embrionario del ratón CD1.



II. INTRODUCCIÓN

1. Formación y desarrollo de la gónada del ratón

Las glándulas reproductoras se forman a partir de tres tipos de células: las somáticas como Sertoli, Leydig y las células germinales primordiales (CGPs) (Godin y Wylie,1991).

a) Origen de las glándulas reproductoras

La formación y desarrollo de las gónadas en los mamíferos se lleva a cabo en tres etapas: a) Establecimiento del sexo cromosómico, b) Formación de la gónada y c) diferenciación fenotípica.

b) Establecimiento del sexo cromosómico

Este proceso se inicia en el momento de la fertilización y unión de un espermatozoide que puede tener el cromosoma "X" ó "Y", con el ovocito el cual solo aporta el cromosoma "X". Si el ovocito es fecundado por un espermatozoide "X", el producto se diferenciará como hembra, y si es fecundado por un espermatozoide "Y" el cigoto se desarrollará como macho, lo cual da origen al dimorfismo sexual cromosómico característico de los mamíferos (Kofman-Alfaro y col, 1982).

a) Formación de la gónada

i) Crestas genital

La cresta genital está formada de dos tipos de células: las células somáticas que tienen un origen mesodérmico y las CGPs de origen extragonadal que se localizan en el alantoides a los 8.5 días de gestación (d.g), en el ratón estas células migran a la región urogenital (Kofman-Alvaro y col,1982).

Las CGPs se reconocen en la ontogénesis, debido a que son mas grandes que las células somáticas, tienen citoplasma claro, núcleos grandes y



redondos y un alto contenido de glucógeno y fosfatasa alcalina (Kofman-Alfaro y col, 1982).

Las CGPs se ubican inicialmente en el saco vitelino (Fig.1.). En los mamíferos estas células migran desde su origen hasta el intestino posterior del embrión donde se formarán las gónadas, y se desplazan por medio de dos diferentes movimientos: a) movimiento pasivo donde las CGPs son trasportadas por los tejidos que las rodean desplazándose por crecimiento diferencial del embrión. De tal forma que el endodermo crece y se desplaza hacia el interior del embrión para formar parte del intestino posterior (Merchant Larios, 1993). b)Para salir del intestino posterior las CGPs deben atravesar la lamina basal que lo recubre por lo que requiere un movimiento activo mediado por pseudópodos. Las CGPs tienen la capacidad de romper la lamina basal del intestino por medio de enzimas que hidrolizan los componentes que forman la matriz extracelular como la colágena, mucopolisacaridos y glicoproteínas y así, continuar su camino hacia las futuras crestas genitales a través de las células (Merchant Larios, 1993).



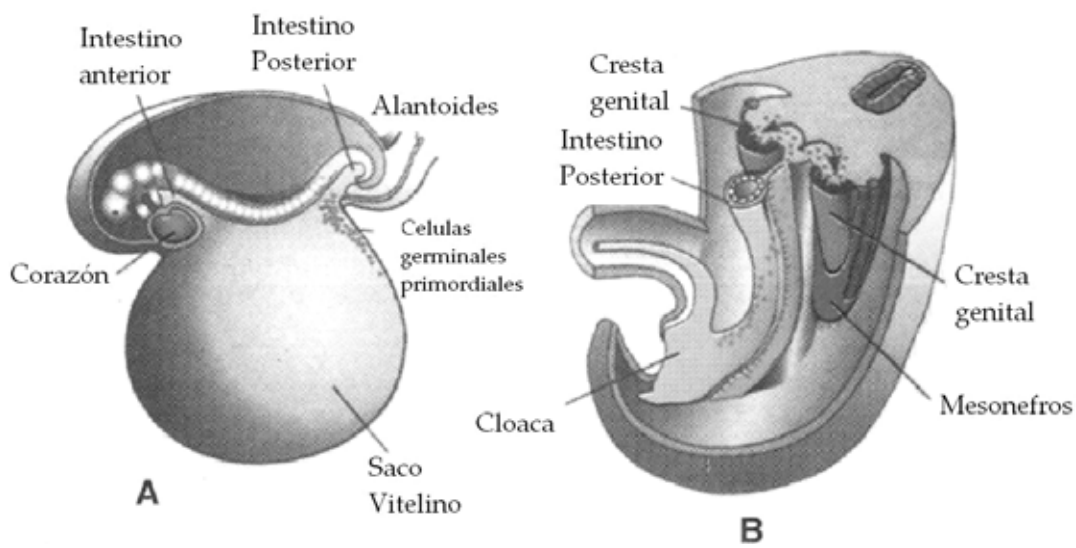


Fig. 1. A. Embrión de 9-12 días de gestación. B. Camino que siguen las células germinales primordiales desde el intestino posterior hacia la cresta genital, (Lagman, 2004).

Existen varias teorías de cómo las CGPs migran hacia lo que formarán las crestas genitales. El primero es por quimiotaxis a causa de un gradiente de concentración de algún factor secretado por las células de epitelio celómico ubicado en la región urogenital. Hasta ahora no se he podido caracterizar químicamente al factor quimiotáctico (Merchant Larios, 1993).

El segundo mecanismo posible es el llamado “guía por contacto” donde se propone que existen receptores específicos en la superficie de las CGPs las cuales son capaces de adherirse colectivamente a moléculas presentes en la superficie de las células mesenquimáticas y en la matriz extracelular. Estas células son guiadas a un camino predeterminado ya que solo las células somáticas distribuidas en la cresta genital sintetizaría y depositaría en su superficie moléculas de adhesión (Merchant Larios, 1993).

El último mecanismo posible menciona una organización topográfica de las células somáticas del embrión formando un túnel donde las CGPs serán guiadas hacia la cresta genital (Merchant Larios, 1993), (Fig. 2.).

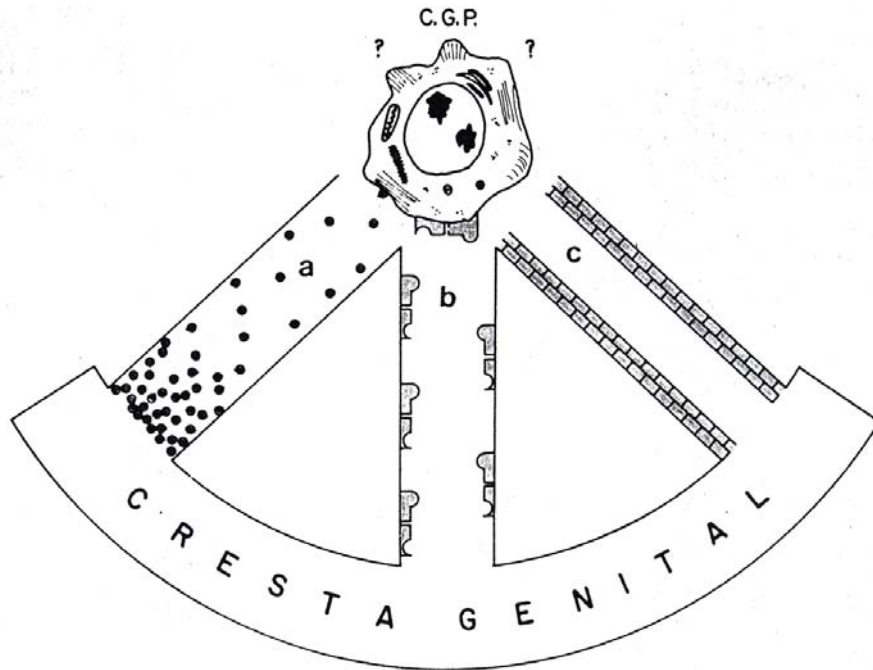


Fig.2. Posibles mecanismos que guían a las CGPs hacia la cresta genital. a) gradiente de concentración; b) guía por contacto; c) arreglo topográfico de las células somáticas (Merchant Larios, 1993).

Cuando las CGPs empiezan a llegar a la región urogenital en esta zona ya se encuentran diferentes tipos de células somáticas de origen mesodérmico como las células mesoteliales, mesenquimáticas, mesonéfricas y endoteliales (Fig. 3).

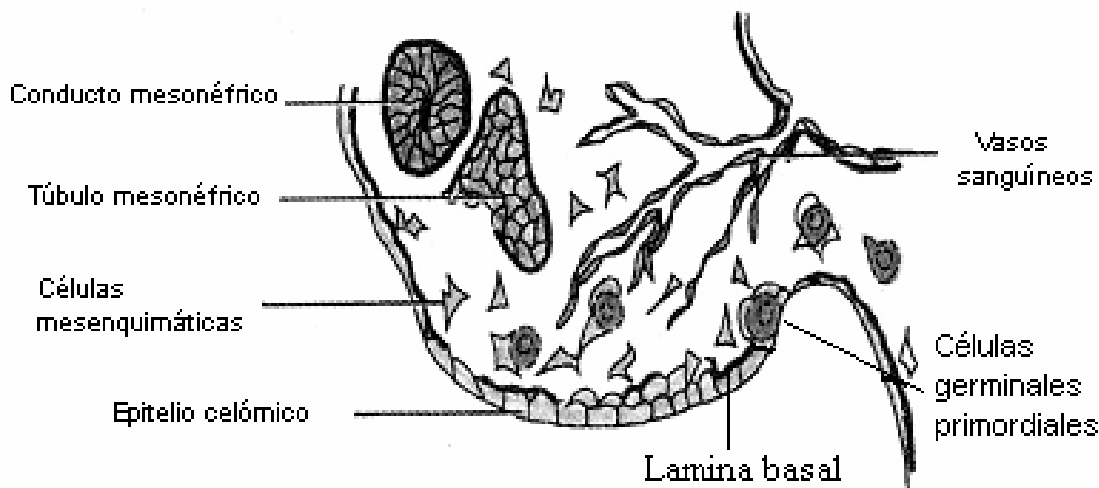


Fig. 3. Esquema de la cresta genital de un embrión de ratón de 10.5 dg (Merchant Larios, 1993).

ii) Gónada indiferenciada

Las células mesoteliales y las mesenquimáticas son las que participan directamente en la formación de la gónada indiferenciada como células precursoras los tejidos formados por éstas que reciben el nombre de epitelio germinal. Las CGPs inician un activo proceso de proliferación que coincide cronológicamente con la división de las células somáticas mesenquimatosas y del epitelio celómico dando origen al blastema gonadal situado en la parte ventral del mesonefros.

La gónada indiferenciada se organiza en dos tipos de tejidos a) el tejido que contiene a las CGPs rodeada por células somáticas precursoras de las células de Sertoli o de la granulosa, b) el tejido estromático que origina al tejido conectivo, vasos sanguíneos y tejido intersticial esteroideogénico. En el ratón este evento ocurre entre los 9.5-11.5 d.g (Kofman-Alfaro y col, 1982), (Fig.4).

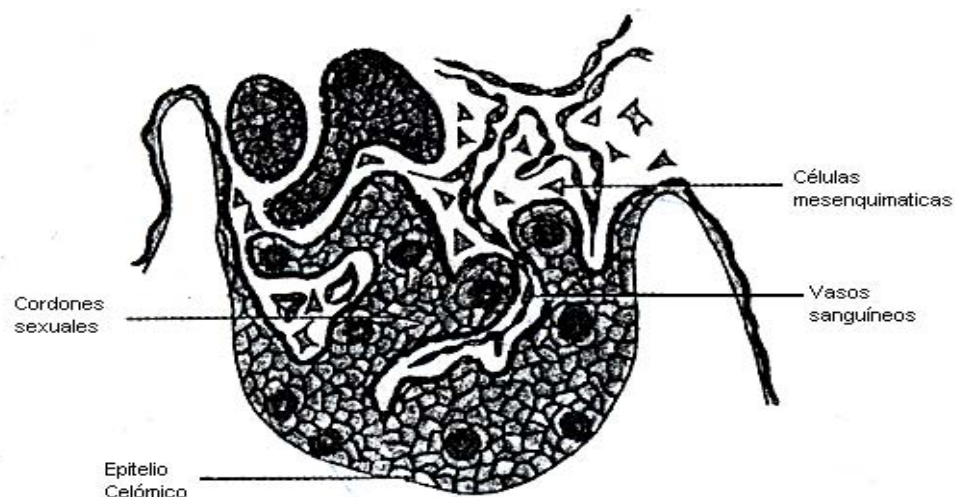
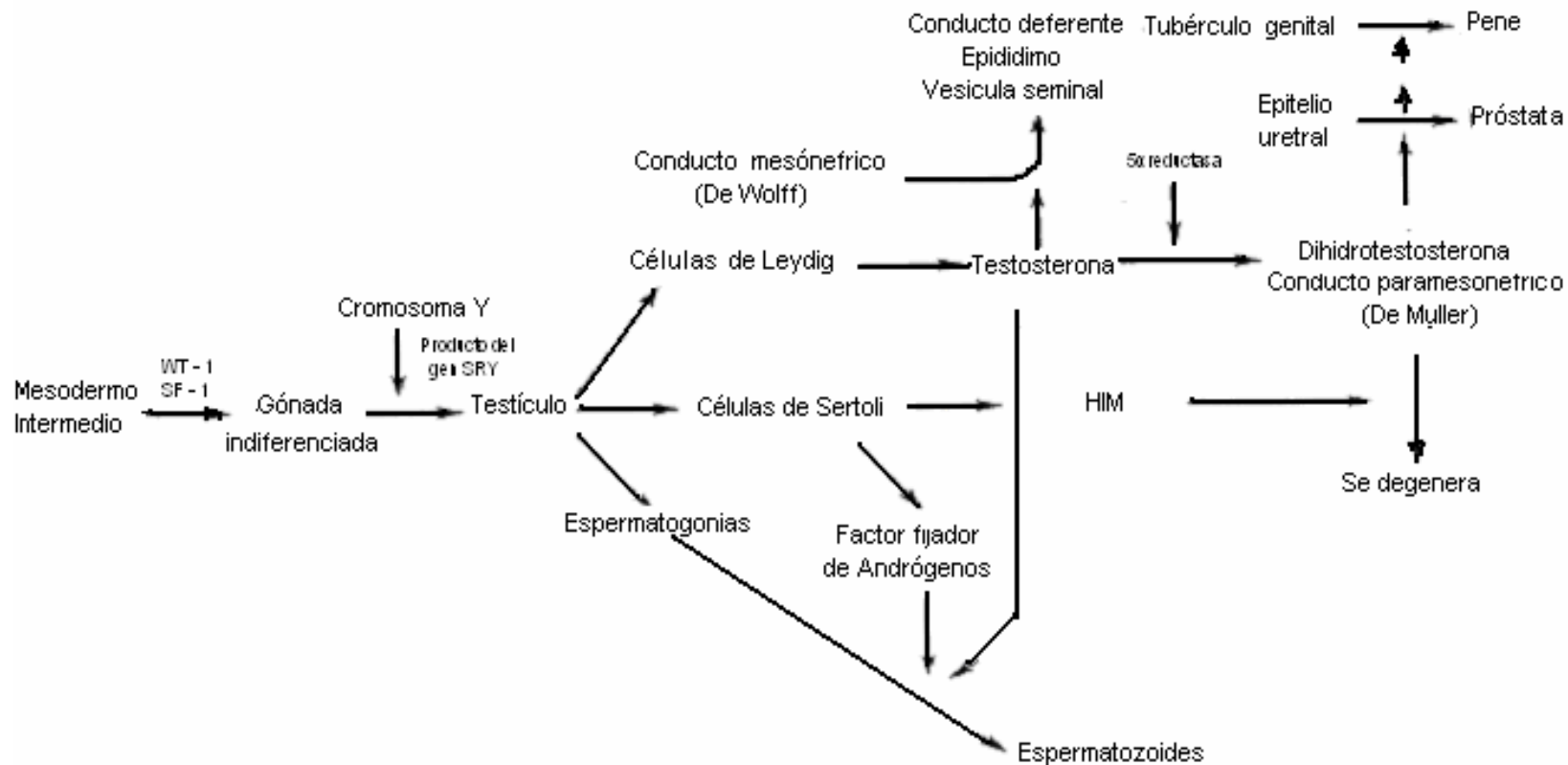


Fig. 4. Gónada indiferenciada de ratón 11.5 d.g.,(Merchant Larios, 1993).

iii) Diferenciación testicular

La diferenciación testicular se inicia a partir de la expresión del gen determinante del testículo llamado *Sry* el cual se expresa en las células de Sertoli a los 10.5 dg (Koopman, cols, 1990). Este gen desencadena una serie de eventos y expresiones en genes autosomales los cuales contribuyen con la diferenciación externa e interna del aparato reproductor masculino (Esquema 1).



Esquema 1. Esquema que muestra la diferenciación de la gónada masculina, WT- 1: gen autosomal que participa en la diferenciación testicular, SF-1: gen para el factor esteroidogénico, HIM: hormona inhibidora de los conductos de Müller (Carlson, 2000)

De los 11.0 a los 12 d.g. en el ratón CD1 se observa una compactación de los cordones sexuales y una proliferación activa del tejido mesenquimatoso y vasos sanguíneos desde la región mesonéfrica provocando una separación de los cordones testiculares del epitelio superficial de la gónada, los cuales son llamados cordones seminíferos. Dentro de ellos se encuentran las CGPs que se diferencian a proespermatozonias y células de Sertoli. Fuera de los cordones se encuentran las células mesenquimáticas que tienen función de soporte y nutrición éstas se diferencian a células de Leydig, fibroblastos y células mioideas, (Merchant Larios, 1993).

Las estructuras primordiales del tracto genital que da origen a los genitales internos son dos sistemas de conductos los cuales están presentes en las etapas iniciales del desarrollo gonadal en ambos sexos y son: Los conductos de Wolff (mesonéfricos) y los conductos de Müller (paramesonéfricos)(Rey, 2001).

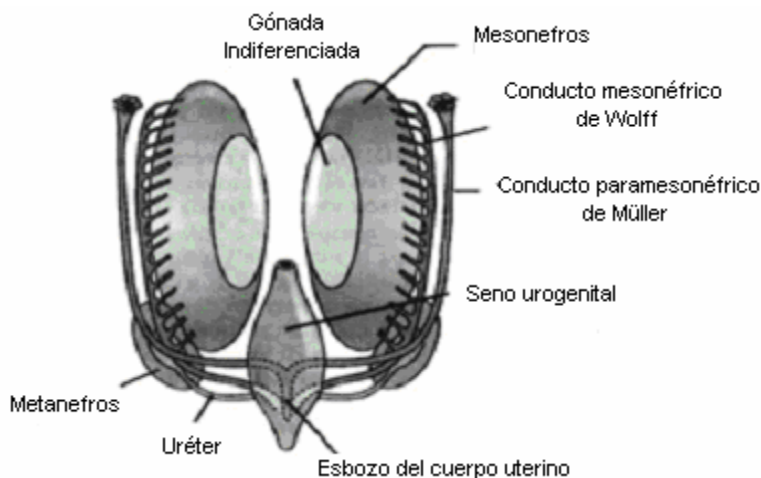


Fig. 5. Conductos de Müller y de Wolf, (Moore , 1999).

El fenotipo masculino es el resultado del efecto de tres hormonas: a) Hormona inhibidora de los conductos de Müller (HIM) que media el primer evento en la diferenciación genital masculina en la cual hay regresión de los conductos de Müller, esta hormona es secretada por las células de Sertoli y su efecto es local (Jamin y cols,2003). b) Testosterona, una vez que se inicia la síntesis de la HIM las células intersticiales del testículo fetal se diferencian en células de Leydig donde se produce la testosterona. El efecto se ejerce sobre los conductos Wolff los cuales se diferencian a epidídimo, vesícula seminal, conducto eyaculador, túbulos espermatozoides; esta hormona es secretada a la circulación sistémica (Rey,2001). c) La 5 α -Dihidrotestosterona (5 α -DHT) es producida por el metabolismo intracelular de la testosterona mediada por la 5 α -reductasa, induce la virilización de genitales externos, y los pliegues genitales se alargan y se fusionan para formar el pene y la uretra masculina, (Kofman-Alvarado y cols., 1982).

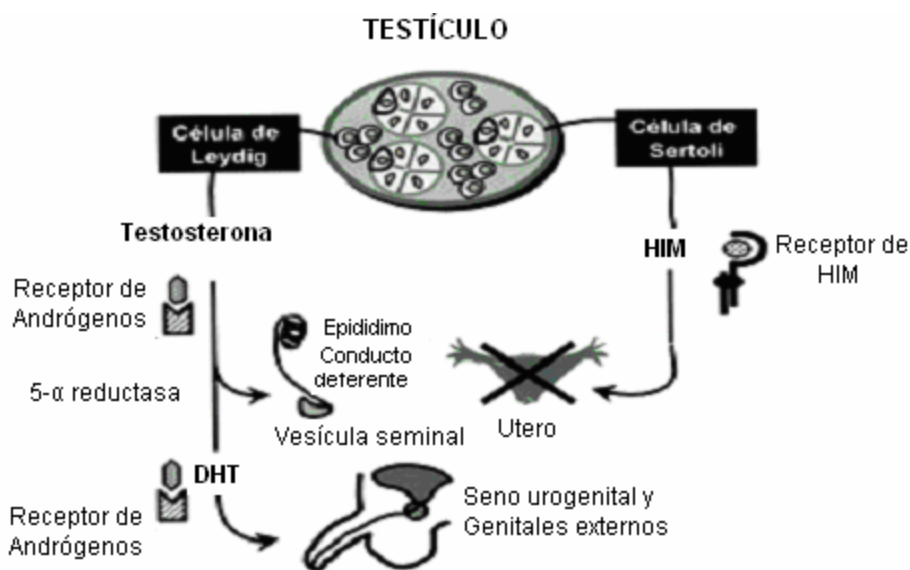


Fig.6. Regulación hormonal de la diferenciación sexual fetal fenotípica (Rey,2001).

2. Gen primario de la diferenciación testicular

Se han realizado diversos experimentos que establecen que el gen *Sry* es el que determina la diferenciación testicular. El empleo de ratones transgénicos que se produjeron a partir de ovocitos fecundados que tienen un DNA foráneo los cuales se produjeron incorporado a la información genética del embrión en desarrollo. Cuando se inyecta el DNA que tiene solo *Sry* de ratón en óvocitos de ratón normales XX, la mayoría de los ratones se desarrollaron como machos (Merchant Larios, 1993).

a) Ubicación

El gen *Sry* debe su nombre a las siglas en ingles (Sex-determining region on the Y-chromosome) este gen se ubica dentro del cromosoma "Y" en el brazo corto Yp11.3 en humanos (Mcelreaveryk,1999; Pardo y Castillo, 2002).

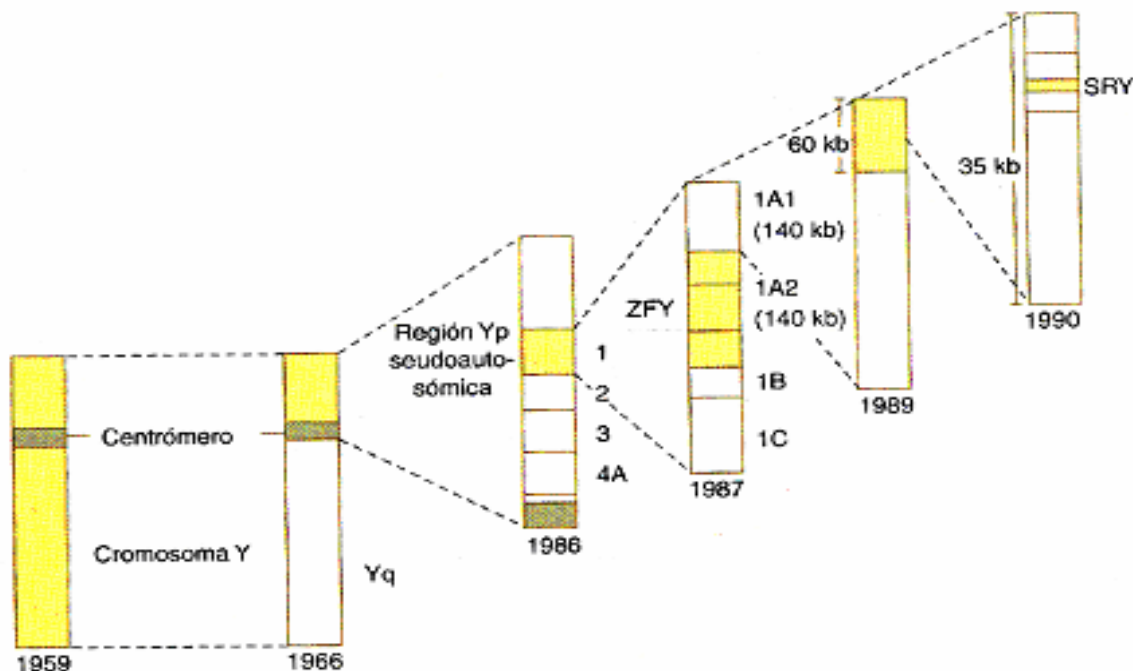


Fig.7. Historia del avance de la localización del gen de la determinación sexual en el cromosoma "Y" (Carlson, 2000).

b) Organización

El *Sry* forma parte de una superfamilia de proteínas que tienen un motivo de unión al DNA llamado HMG (High Mobility Group). (Rimini y col., 1995). Éste está formado de 2739 pb y contiene solo un exón con un marco de lectura abierto el cual está rodeado de una secuencia repetida e invertida de 17 kb (Gubbay y col., 1992).

Se ha postulado que el *Sry* al unirse a su secuencia respectiva induce un ángulo de 76° en el DNA lo que promueve y/o reprime la expresión de otros genes implicados en la diferenciación sexual (Pontiggia y col., 1994, Jeske y col., 1996).

c) Expresión en células somáticas

Durante el desarrollo embrionario del ratón se demostró mediante la técnica de transcriptasa reversa la expresión del gen *Sry* en células gonadales de los 10.5 dg a los 13.5 dg (Jeske y col., 1996).

Se ha visto que en las primeras etapas del desarrollo gonadal el sexo de las células somáticas dependen de la expresión del *Sry* ya que si este gen no se expresa o se ve retrasada su expresión las células somáticas se diferenciarán a pre-foliculares y el desarrollo se llevará hacia el sexo femenino. Si la expresión del *Sry* es normal las células somáticas se diferenciarán en pre-Sertoli dando lugar al testículo (McLaren, 1991).

3.- Genes autosomales que participan en la diferenciación testicular

La diferenciación sexual es un proceso poligénético, se han identificado algunos genes autosomales que participan en la diferenciación gonadal.



Sf-1: El gen para el factor esteroideogénico, se ubica en el cromosoma 9 q33 y se expresa en todos los tejidos esteroideogénicos primarios como la corteza adrenal, células de Leydig, células de la teca y de la granulosa. Codifica para receptores que tienen un ligando desconocido y posee la capacidad para unirse al DNA. Se ha postulado que mediante esta capacidad funcionan como un regulador transcripcional positivo para los genes de las enzimas que median la síntesis de andrógenos fetales como la 17 α hidroxilasa (Roberts, 1999). Se expresa diferencialmente en la gónada femenina y masculina en desarrollo y se expresa a los 9.0-9.5 dg en el ratón (Luo y col., 1994) y por estudios experimentales se sabe que facilita la expresión del gen MIS.

WT1: el gen presenta 10 exones, capaz de unirse al DNA y reprimir la transcripción de un gen. Se expresa en riñón, gónada indiferenciada, células de Sertoli y células de la granulosa, básicamente participa en el desarrollo urogenital, (Kreidberg y col., 1993). Mutaciones en este gen producen el síndrome de Denys-Drasch que se caracteriza por altas malformaciones, como genitales ambiguos. También es responsable del tumor de Wilms en hígado de niños donde se observa altas concentraciones de IGF-II (Kreidberg y col., 1993).

LIM-1: ubicado en el cromosoma 11p13 presenta 5 exones y codifica para una proteína de 384 aminoácidos. Se expresa en gónadas, cerebro, amígdalas y timo. (Roberts, 1999).

MIS: gen que codifica para la sustancia inhibidora de los conductos de Müller su transcripción es promovida por los genes SF-1, SOX9, WT1 y



GATA4. Su expresión está limitada a los testículos fetales y ovarios postnatales. (Pardo, 2002).

SOX9: codifica una proteína de 509 aminoácidos, en los tejidos donde se lleva a cabo la condrogénesis es donde se expresa (Foster y col., 1994).

Durante la diferenciación de ovario su expresión disminuye por lo que ha relacionado directamente con la expresión del SRY.

GATA-4: su expresión se ha encontrado en las células somáticas de la gónada indiferenciada y en los testículos fetales solo se expresa una vez que se han formado los conductos de Müller (Pardo, 2002).

4. Factor de crecimiento similar a insulina tipo II (*Igf-II*)

Llamada también somatomedina C, este factor de crecimiento desempeña un papel importante durante el desarrollo fetal, participa en la diferenciación, división celular y posiblemente actúa en el metabolismo (O'dell, 1998). Los niveles más altos se encuentran en la etapa embrionaria específicamente en la etapa de dos células y en las derivadas de trofoectodermo (Adashi, 1997). En la etapa embrionaria el IGF-II está regulado por el láctogeno placentario, después del nacimiento disminuye la expresión y sólo se encuentra en el hígado siendo su principal fuente endócrina, células musculares y células de la corteza cerebral (Villalpando, 2001). El IGF-II maduro presenta una identidad con la secuencia de aminoácidos (a.a) del 47% con la insulina además conserva los tres enlaces disulfuro lo que le da una estructura tridimensional semejante a la insulina por lo que es reconocida por el receptor de insulina con poca afinidad. (O'Dell, 1998),(Fig. 8).



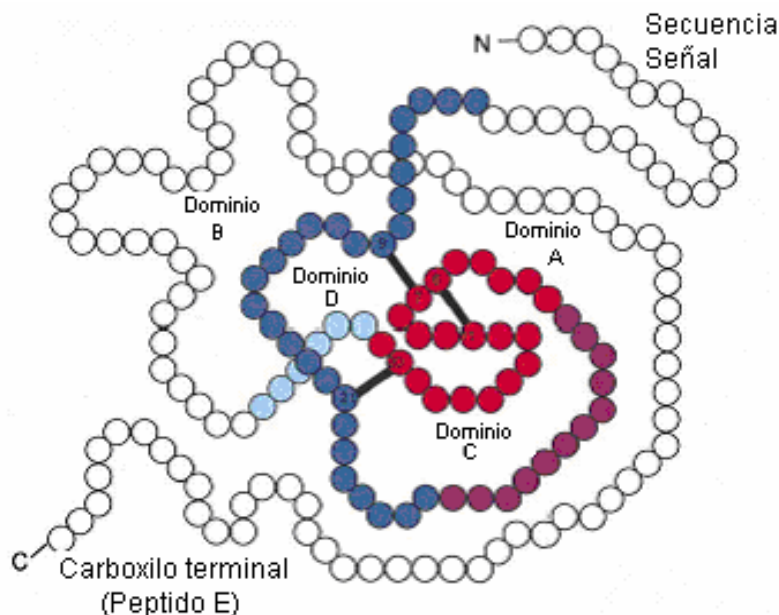


Fig.8. Estructura de la pre-hormona de IGF-II. Las barras sólidas indican los puentes disulfuro, (O'Dell,1998).

El IGF-II en humanos está relacionado en el síndrome de Beckwith-Wiedemann caracterizado por macrosomía fetal y un aumento de la incidencia de cáncer en la infancia y en el tumor de Wilms donde la concentración de IGF-II es elevada (O'Dell, 1998).

a) Organización molecular del gen en roedores

En ratones el gen que codifica para dicho factor se localiza en el autosoma 7 junto con el de la insulina donde ambos comparten la misma polaridad de transcripción. Está constituido por 6 exones, 5 intrones y 2 promotores (Fig 9). El péptido maduro está formado de 67 a.a. y tiene un precursor de 180 a.a codificados por los exones 4 y 6 (Stempie y col., 1986).

El exon 4 codifica para 24 a.a correspondientes al péptido señal y para los primeros 28 a.a del péptido maduro.

El exon 5 codifica los primeros 11 a.a del dominio E de 89 a.a. que corresponden al extremo carboxi terminal de la proteína. El exon 6 contiene los últimos 78 a.a del dominio y una región 3 que no se traduce (Stempien y col., 1986).

Los exones 4 y 5 del humano son similares a los exones 2 y 3 de la rata.

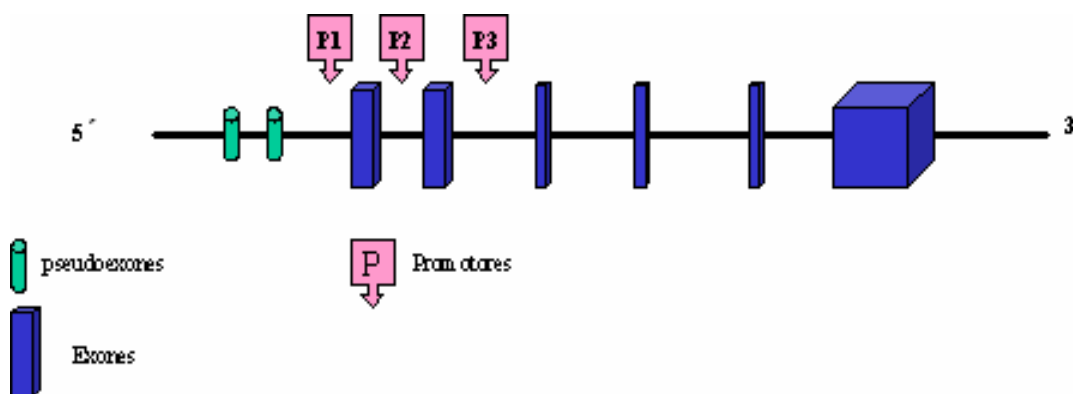


Fig.9. Organización del gen *Igf-II* del ratón. (Modificado de Lizárraga Sánchez, 1997).

En el ratón el *Igf-II* es transcrito por tres promotores distintos (P1,P2 y P3) localizados dentro de los 3 primeros exones. El promotor P1 contiene 3 sitios de iniciación de la transcripción distribuidos en una región de 550 pb y carece de elementos reguladores típicos. Los promotores P2 y P3 tienen regiones regulatorias típicas como cajas TAATA y ricas en CG ambos presentan un solo sitio de inicio para la transcripción (Rotwein y Hall, 1990).

La expresión diferencial de estos promotores pueden explicar las diversas especies de RNAm que se encuentran en los distintos órganos, tejidos y en las etapas del desarrollo tanto de la rata, ratón y humano (Stempien y col.,1986; Gangji y col.,1998).

Existen 20 genes que son conocidos como genes de impronta parental (parental imprinting) el *Igf-II* pertenece a este grupo en donde solo se expresa uno de los alelos en este caso sea el paterno o el materno (Hu y col, 1995).

5.- Organización del receptor de *Igf-II*

Los efectos biológicos de los IGF-II dependen de la unión a glicoproteínas de membrana que funcionan como sus receptores. El IGF-II reconoce con mucha afinidad al receptor tipo II con menor afinidad al receptor tipo I y con poca afinidad al receptor de insulina (O'Dell, 1998).

a) Aspectos moleculares

El receptor tipo II presenta una identidad del 79% con el receptor de manosa 6-fosfato tiene un peso molecular de 250 kDa, es una glucoproteína de cadena sencilla, el 90% de su estructura es lineal y extracelular. Su dominio tiene una repetición de 15 veces la misma secuencia conservada, no presenta actividad de tirosina cinasa como en el receptor tipo I (Mac Donald,1998). Se piensa que en el receptor debe estar acoplado a una proteína G (Leal, 2003), Ver Fig.10.

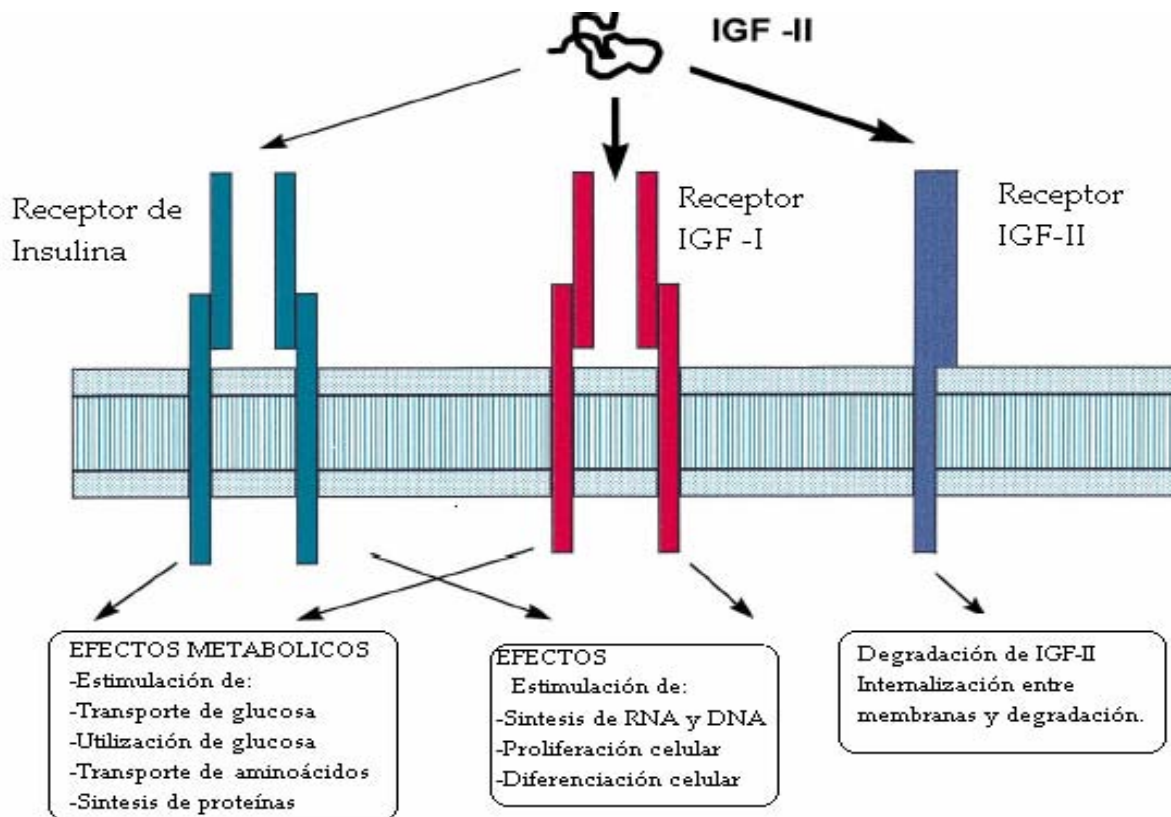


Fig. 10. Interacción del IGF-II con los receptores, (O'Dell, 1998).

b) Función

El receptor tipo II manosa 6-fosfato está involucrado en la señalización de enzimas lisosomales del aparato de golgi a los lisosomas y en la internalización y degradación del IGF-II (O'Dell, 1998). En etapa adulta la unión del IGF-II con su receptor inhibe la apoptosis de varios tejidos como las células del páncreas (Haeflten, 2004).

c) Expresión en tejidos

En etapa embrionaria el IGF-II en ratón se expresa en los tejidos derivados del trofoectodermo y después en el endodermo primitivo parietal y el



viceral. Después se observa en el mesodermo extraembrionario y posteriormente en el mesodermo embrionario. En todos los componentes que formarán la placenta el gen del IGF-II se ve expresado intensamente (Lee y col, 1990). También se observa en los tejidos derivados de los somitas, mesodermo cardiaco, cartílago, tejido vascular, hipófisis e hígado (Bondy y col.,1990).

En adulto su expresión se encuentra en meninges y músculo estriado (Gray y col., 1987). Una deleción en el gen demostró una disminución en el desarrollo de la placenta lo que nos revela su participación directa en su desarrollo (DeChiara, 1990).Un aspecto muy importante es que la expresión del IGF-II es mayor en la etapa fetal que en la adulta (Brice y col., 1989).

6.- Regulación del IGF-II

a) Papel de la estereoidogénesis

La formación de hormonas esteroides en el desarrollo gonadal es importante ya que se ve involucrado en la diferenciación de las características sexuales secundarias y en la regulación de diferentes funciones.

Estudios realizados *in vivo* y en cultivo celular de adrenales demostraron que el IGF-II incrementa la secreción basal de cortisol y del sulfato de dehidroepiandrosteronas (DHEA-S) inducidas por la hormona adrenocorticotrópicas en células fetales adrenales ya que incrementa la expresión de la aromatasa P450, 17 α -hidroxilasa y 3- β hidroxisteroide deshidrogenasa (Mesiano y Jaffe, 1993). La insulina y el IGF-II tienen un efecto sinérgico en la estereoidogénesis de la células de la granulosa (Mason



y col., 1994) y ambos regulan la producción de andrógenos en células de la teca (Nahum y col., 1995). Se ha demostrado que durante el desarrollo testicular de los porcinos el RNAm del IGF-II disminuye mientras que el del IGF-I aumenta, pero el aumento de IGF-II está relacionado con el aumento del tamaño folicular (Yuan y col., 1996). En cultivos de células intersticiales de Leydig se postula un aumento de la esteroidogénesis por medio de un control parácrino de este factor (DeMellow y col., 1987). También se han detectado la expresión de las proteínas acarreadoras IGBP-4 y 5 que tienen afinidad por IGF-II en células de la granulosa (Liu y col., 1993).

b) Función en la diferenciación celular

El crecimiento y diferenciación de los tejidos fetales ocurre a través de complejas vías de desarrollo en la cual los factores de crecimiento como el IGF-II juegan un papel fundamental en este proceso. Estudios *in vitro* demostraron que el IGF-II induce la diferenciación de las células precursoras del hueso llamado osteoblastos a osteoclastos (Gangji, y col, 1998). Sin embargo, el papel del IGF-II como promotor de la diferenciación debe ser aún determinado en otros tipos celulares.

7.- Aspectos generales de la insulina

Insulina es una hormona peptídica encargada de regular la concentración plasmática de glucosa y el metabolismo de los carbohidratos para la producción de energía. Es una molécula de 5,734 kDa, constituida por dos cadenas peptídicas. Una cadena A de 21 aminoácidos y otra cadena B de 30 aminoácidos, (Fig. 11).



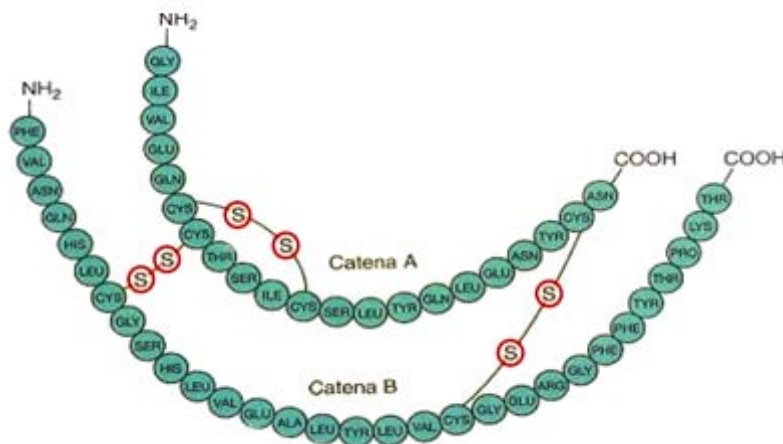


Fig.11 Estructura de la insulina, (Andrew, 1992).

Es secretada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, en forma de precursor inactivo (proinsulina), el cual pasa por el aparato del golgi, donde es modificado eliminando una parte del péptido C y uniendo los dos fragmentos restantes mediante puentes disulfuro, (Ashcroft, 1992.).

a) Tipos de insulina

La insulina puede clasificarse con base a la especie de origen y así dividirlas en animales y humanas. La insulina a su vez puede clasificarse en: a) Semisintética, que se obtiene mediante la sustitución del aminoácido terminal de la cadena B de la insulina porcina (alanina), introduciendo en su lugar treonina, transformándola en insulina humana. (Adrew,1992). b) Biosintética: el grupo Lilly de Indiana logró introducir el código genético a un plásmido (DNA humano circular) capaz de replicarse solo, dentro de



un colibacilo que recibía la orden ribosómica para formar insulina, de una composición exactamente a la humana. Se han desarrollado dos vías para fabricar insulina estimulando a los colibacilos a crear cadenas A de insulina mientras otros crean la cadena B para después unirlos. Otra opción es la creación de proinsulina por medio de los colibacilos que posteriormente es manipulada, para liberarse y quedar exactamente en insulina humana (Andrew, 1992).

Dado su menor inmunogenicidad, las insulinas animales han desplazado a las porcinas, bovinas o porcinas/bovinas, es importante mencionar que la insulina bovina confiere una propiedad especial a esta molécula ya que esta se absorbe mas lentamente.

Otra manera de clasificarlas es por su espectro de acción y pueden dividirse de la siguiente manera: a) Ultrarápidas: su inicio de acción es a los 15 minutos, efecto máximo 30 minutos y su duración es de 180 minutos. b) Insulinas Rápidas. Inicio de acción 30 minutos, efecto máximo entre 1 y 3 horas después de administrada la inyección su acción termina a las 8 horas. c) Insulina Intermedia: Inicio 2 horas el pico máximo de acción es de 6 y 10 horas y su acción dura 24 horas. Comúnmente conocida como Insulina NPH isofágica, las siglas NPH significan Neutral Protamine Hagedorn en honor a Hans Christian Hagedorn descubridor de esta insulina ya que logra su acción intermedia por la unión de una proteína de salmón la protamina a las moléculas de insulina (Velasco, 2004). d) Insulinas prolongadas: Su comienzo es a las 4 horas después de su administración, su máximo efecto es entre las 8 y 24 horas, finalizando a las 28 horas. e) Mezclas Fijas: Su actividad es un



compendio de las de insulinas rápidas e intermedias que las constituyen.(Velasco, 2004).

b) 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.

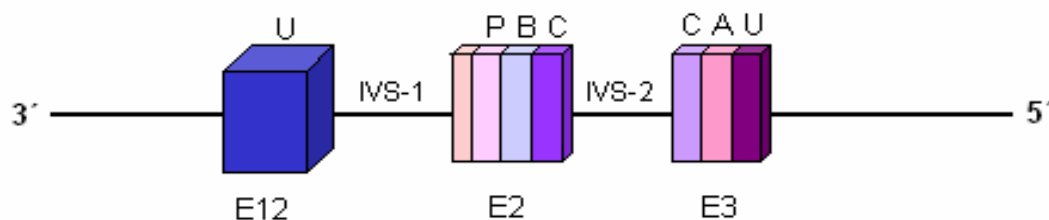


Fig. 12 Estructura del gen de la insulina. E1-E3: exones IVS-1 e IVS-2: intrones U: denota las extremidades 3' a 5' de la región del RNAm; P,B,C, y A: zonas que codifican los pre-peptidos modificado de Clark y Docherty, 1992.

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 et al, 1979; Wentworth et al, 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). El gen de la insulina humana se localiza cerca del final del brazo corto del cromosoma 11 (Harper et al, 1981) , flanqueado sobre el sitio 5´ con el gen para de tiroxina hidroxilasa y sobre el sitio 3´ con el gen para IGF-II (Bell et al, 1985; O'Malley and Rotwein, 1988).

b) Características de la insulina empleada

Para la realización de este experimento de utilizo: **HUMULIN* N**

Frasco con 10 ml con 1000 unidades. Cada ml contiene 100 unidades de insulina NPH.

Insulina humana NPH Origen ADN recombinante, Lilly , insulina de acción intermedia. Esta insulina es estructuralmente idéntica a la insulina producida por el páncreas humano. Es biosintética ya que se sintetiza en una cepa especial de laboratorio no patógena de *Escherichia coli*, que ha sido modificada genéticamente mediante la adición de un gen humano, (PLM, 2005). Humulin N es una suspensión estéril de un precipitado cristalino, blanco, de insulina humana isofagica, suspendida en un amortiguador de fosfato isotónico.

Su administración debe ser por vía subcutánea que debe ser en la parte superior de brazos, muslos, glúteos o abdomen.



III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

Se ha propuesto que el factor de crecimiento similar a insulina tipo II (IGF-II) es un promotor de la diferenciación de diferentes tejidos del ratón en la etapa embrionaria aunque este aspecto ha sido poco estudiado. Asimismo, se ha descrito que éste participa en la producción de hormonas sexuales en el testículo y ovario adulto aunque hasta la fecha esta función no se ha establecido en la etapa embrionaria. El RNA de este factor se estudió a los 18 dg en la cepa del ratón B6Y^{Tir} en el cual a través de retrocruzas entre la cepa *Mus musculus domesticus* se generan hembras XY. En esta etapa se estudiaron la expresión del RNAm desde los 12 a los 18 dg. Sin embargo, durante, el desarrollo normal del testículo la expresión del *Igf-II* no se ha abordado. Estudios recientes en el ratón demostraron que la insulina su receptor y moléculas relacionadas a esta familia de proteínas como el Factor de Crecimiento Similar a Insulina Tipo I y II son necesarias para la diferenciación testicular. Por otra parte se ha descrito que el efecto biológico de la insulina es mediado a través de un receptor específico, aunque hay estudios que proponen que debido a la semejanza estructural de la insulina con el *Igf-II* éste podría tener algún efecto en la regulación del RNA mensajero maduro o de la proteína del *Igf-II*. Pero no se sabe si la insulina en la etapa embrionaria regula la expresión del *Igf-II*.

Con base en los antecedentes expuestos se plantean la siguiente hipótesis:



HIPÓTESIS

Estudios previos plantean que hay una interacción con el receptor del *Igf-II* en fase adulta de tal forma que la administración de insulina intermedia NPH (Humulin * N Laboratorios Lilly) podría provocar una disminución en la expresión del gen *Igf-II*, en los testículos embrionarios del ratón.



IV. OBJETIVOS

- 1 Estudiar la expresión del RNAm del *Igf-II* en el testículo de 12 a 18 d.g. de la etapa de inicio de la diferenciación sexual a la perinatal en el ratón CD1.
- 2 Determinar el efecto de la insulina intermedia NPH (Humulin * N Laboratorios Lilly) en la expresión del *Igf-II* en las edades mencionadas.



V. MATERIAL Y METODO

1. Reactivos

Todos los reactivos sales y soluciones fueron preparados con reactivos de pureza grado analítico.

2. Animales de Bioterio

Se emplearon ratonas adultas de la cepa CD1, las cuales fueron mantenidas en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas a 18 °C con ciclos de luz y oscuridad de 12/12 horas. Los animales fueron alimentados con alimento esterilizable Harlan Tekland México LM-485 y con agua estéril acidificada a pH de 2.5 y con una humedad relativa del 80%.

3. Generación de embriones de ratón

Cuatro hembras adultas y un macho de 7-9 semanas se colocaron en una caja de acrílico estéril con SANI-CHIPS estéril de Harlan Tekland México Grade Laboratory. El día que se detectó el tapón de copulación se denominó día cero de la gestación. Se emplearon embriones de 12-18 días de gestación (d.g.).

4. Muestras biológicas

Las ratonas preñadas de 12-18 dg se sacrificaron por dislocación cervical, después se les practicó una incisión en forma de "V" en la región abdominal. Los embriones se obtuvieron y se manipularon con pinzas estériles y fueron transferidos a una caja Petri estéril. Las gónadas se aislaron en medio de cultivo M199, se lavaron con solución salina isotónica (NaCl 0.9%) estéril y se congelaron a -20°C.



5. Tratamiento administrado

Inicialmente a 5 ratonas preñadas de 16 d.g se les administraron 20UI de Insulina humana de acción intermedia (Humulin * N Laboratorios Lilly) vía intraperitoneal, a las 24 horas después de la administración todas las ratonas murieron. Un segundo grupo de ratonas preñadas de la misma edad gestacional se les administró 10UI de insulina después de 24 horas de la administración solo 2 ratonas sobrevivieron. El tercer grupo de ratonas de 16 d.g se les administró 5 UI de insulina a las cuales después de 24 horas de administración se encontraron todas vivas, a los 17 d.g se les inyectó nuevamente 5UI de insulina y a los 18 d.g se sacrificaron para obtener los testículos embrionarios.

Por lo que el tratamiento para cada edad gestacional se resume en la Tabla 1:

Tabla 1. Administración de insulina a embriones.

5 UI de Insulina		
Periodo de administración de Insulina (dg)	Día de cirugía (dg)	Numero de animales
14 – 15	16	4
16 – 17	18	4

6. Identificación del sexo gonadal

El sexo gonadal de los embriones se estableció por la presencia de los cordones sexuales altamente vascularizados bajo un microscopio estereoscopio *Stereomaster*.



7. Análisis de genes

a) Diseño de oligonucleótidos sintéticos

Los oligonucleótidos que se emplearon para la amplificación del IGF-II se diseñaron de acuerdo al DNAC de ratón descrito por Stempien y col. 1986. La secuencia del fragmento amplificado del *Igf-II* de ratón que corresponden al precursor de la proteína:

ATG TTG GTG CTT CTC ATC TCT TTG GCC TTC GCC TTG TGC TGC
ATC GCT GCT TAC GGC CCC GGA GAG ACT CTG TGC GGA GGG GAG
CTT GAC ACG CTT CAG TTT GTC TGT TCG GAC CGC GGC TTC TAC
TTC AGC AGG CCT TCA AGC CGT GCC AAC CGT CGC AGC CGT GGC
ATC GTG GAA GAG TGC TGC TTC CGC AGC TGC GAC CTG GCC CTC
CTG GAG ACA TAC TGT GCC ACC CCC GCC AAG TCC GAG AGG GAC
GTG TCT ACC TCT CAG GCC GTA CTT CCG GAC TTC CCC AGA TAC
CCC GTG GGC AAG TTC TTC CAA TAT GAC ACC TGG AGA CAG TCC
GCG GGA CGC CTG CGC AGA GGC CTG CCT GCC CTC CTG CGT GCC
CGC CGG GGT CGC ATG CTT GCC AAA GAG **CTC AAA GAG TTC**
AGA GAG GCC

Se usaron oligonucleótidos de 18 pb los cuales delimitan un fragmento de 429 pb.

5' ATG TTG GTG CTT CTC ATC 3' (sentido)

3' CTC TCT GAA CTC TTT GAG 5' (antisentido)



Se utilizó como control en la amplificación del transcrito del *Igf-II* un gen que se expresa constitutivamente, la enzima *Hprt* (Hipoxantina-fosforribosil-transferasa), esta enzima participa en las rutas de salvamento de nucleótidos, principalmente en la recuperación de purinas en vertebrados que son reutilizados en la biosíntesis de nucleótidos (Nelson y cols., 2000).

Para esta enzima los oligonucleótidos utilizados fueron los descritos por Lee y Taketo (1994) y delimitan un fragmento de 353 pb.

5'CCT GCT GGA TTA CAT TAA AGC ACTG 3' (sentido)

3'GTC AAG GGC ATA TCC AAC AAC AAAC 5'(antisentido)

Para cada edad se realizaron tres repeticiones, del *Igf-II* y del *Hprt*.

b) Extracción de RNA total testicular

Se realizó la extracción de 4 testículos de 12 a 18 dg y se les adicionaron 600 µL de Reactivo TRIZOL (GIBCO-BRL). Se homogenizó el tejido empleando un rotor TRI-R-Stir-R con pistilo a una velocidad aproximada de 350 rpm de 10 a 20 seg. Se incubó 5 min a temperatura ambiente, se les adicionaron 120 µL de cloroformo agitando vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente de 2 a 3 min. Las muestras fueron centrifugadas a 14 000 rpm a 4 °C por 50 min, una vez que se separaron las fases se transfirió la fase acuosa a otro tubo Eppendorf. Se le adicionó 300 µl de alcohol isopropílico, y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugo a 14000 rpm, 10 min a 4°C, se decantó y se le agregaron 600 µL de etanol al



75%, por 24 horas. Se centrifugó a 8000 rpm 5 min a 4 °C, se decantó en una gasa estéril y se colocaron las muestras al vacío, 15 min a temperatura ambiente. El RNA obtenido se resuspendió en 3 µl de agua de DEPC.

c) Obtención del DNA complementario

La reacción de transcriptasa reversa (RT) se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones.

El RNA se desnaturalizó a una temperatura de 99°C 5 min en un termociclador (Gene Amp PCR System 9600), se le adicionó MgCl₂ (Applied Biosystems) 25mM, Solución amortiguadora (Applied Biosystems), 40U de inhibidor de RNAasa (Roche) , Oligo de dT,(Roche) 8nM, dNTPs (Applied Biosystems de México) 10nM y 50U de MulV Transcriptasa Reversa (Applied Biosystems). El volumen en total fue de 20 µl y las condiciones del termociclador fueron (Gene Amp PCR System 9600) fueron:

10 min a 25°C

60 min a 42°C 1 ciclo

1 min a 99°C.

d) Amplificación del gen por PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Applied Biosystems) por cada 100 µL de reacción bajo las siguientes condiciones: 40 pmol de cada oligonucleótido por cada 100 µL de reacción, MgCl₂ (Applied Biosystems) 25 mM, Buffer solución amortiguadora (Applied Biosystems) 15 mM; los ciclos de amplificación utilizados fueron:



94°C	2 min	
55°C	15 seg	1 ciclo
72°C	30 seg	
94°C	15 seg	
55°C	15 seg	28 ciclos
72°C	30 seg	
94°C	15 seg	
55°C	15 seg	1 ciclo
72°C	10 min	

Para amplificar los productos tratados con insulina se realizó una modificación en el último ciclo de amplificación a 72°C el tiempo fue de 20 min.

e) Visualización del producto amplificado

El producto de PCR se separó por electroforesis en geles de Agarosa Sigma® Tipo I:Low al 2.0% en TBE al 1X, se tomaron 10 µL de producto de PCR con 0.5 µL de buffer de carga y se realizó una electroforesis a 100V a temperatura ambiente. La detección de los productos de PCR se visualizó tiñendo con bromuro de etidio (50 µL/L) de la casa comercial GIBCO. El gel se fotografió con un Fotoman Polaroid GELCAM (apertura diafragma 11, tiempo de



exposición 1 seg). Se utilizó 1.5 μ L de marcador de peso molecular (Low DNA mass™ Ladder, Gibco BRL).



VI. RESULTADOS

1. Expresión del RNAm del *Igf-II* durante el desarrollo normal

a) Desarrollo normal

La determinación de la expresión del RNAm del *Igf-II* en testículos embrionarios de ratón de la cepa CD1 arrojó los siguientes resultados. A los 12 dg fase en la que ocurre la diferenciación testicular, se observó que la expresión del *Igf-II* es baja comparado con la banda observada a los 14 dg. Los transcritos del *Igf-II* aumentaron de los 16 a 18 dg (Fig. 13).

La expresión del RNAm de la *Hprt* fue constante de los 12 a los 18 dg. El tamaño de los transcritos generados del *Igf-II* tuvieron un peso molecular de 429 pb y la enzima *Hprt* presentó un peso molecular de 352 pb. Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado (Fig.13).



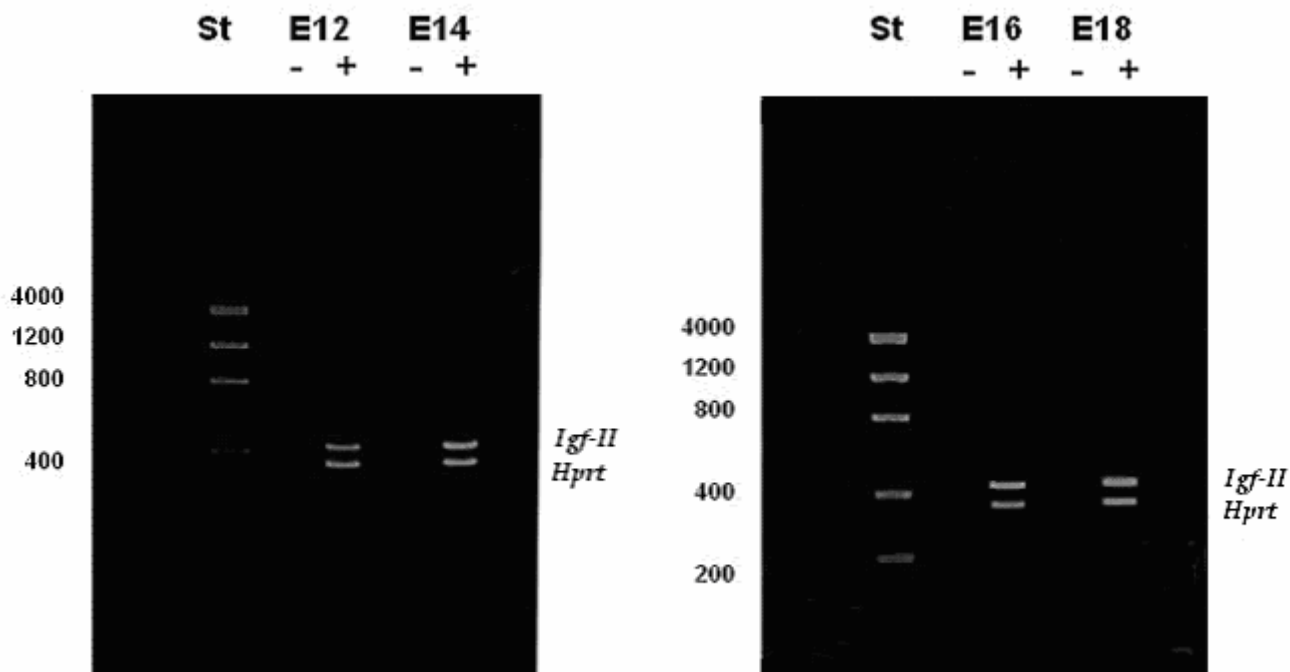


Fig. 13. Expresión del *Igf-II* y gen de la enzima *Hprt* durante el desarrollo embrionario en testículo. St: Marcador de peso molecular E12-E18: Edades gestacionales estudiadas. El experimento control se muestra como (-) sin transcriptasa reversa y el experimental con signo (+), *Igf-II*: Factor de crecimiento similar a insulina tipo II, *Hprt*: Hipoxantina-fosforribosil-transferasa.

b) Expresión del *Igf-II* en el grupo tratado con Insulina NPH

El grupo experimental estuvo conformado por 4 animales; 3 experimentales y un control a las experimentales como se mencionó se les administró 5 UI de insulina intermedia NPH vía intraperitoneal. Sólo se estudiaron dos edades 16 y 18 dg. Observándose para ambas edades una disminución en la expresión del transcripto para *Igf-II*, debido a que este se expresó menos de la mitad que el grosor de la banda observada en los grupos control. No se amplificaron las edades iniciales debido a que tuvimos muchos problemas técnicos para amplificar el grupo experimental a los 16 dg y observamos una expresión menor a la que se observó a los 12 dg en el desarrollo normal.

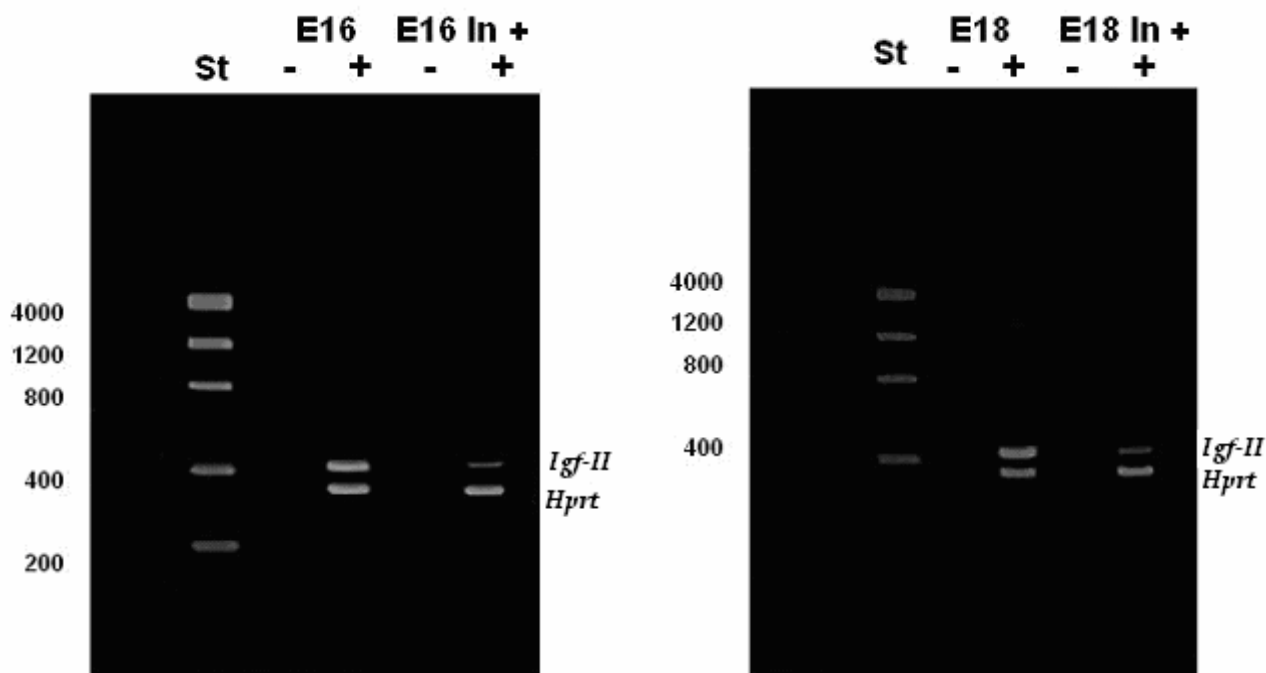


Fig.14. Participación de la insulina en la regulación de la expresión del *Igf-II* durante el desarrollo embrionario en testículo. St: Marcador de peso molecular E16-E18: 16dg-18dg, In+: expresión de *Igf-II* en embriones de ratón tratadas con insulina. El experimento control se muestra como (-) sin transcriptasa reversa y el experimental con signo (+), *Igf-II*: Factor de crecimiento similar a insulina tipo II, *Hprt*: Hipoxantina-fosforribosil-transferasa.

2.- La insulina regula negativamente al gen *Igf-II*

Se detectó que la insulina disminuye la expresión del *Igf-II*; debido a que la banda visualizada es cualitativamente más pequeña que la observada en el grupo control.

VII. DISCUSIÓN

El presente trabajo describe el desarrollo ontogénico del *Igf-II* en el testículo del ratón *Mus musculus* y la regulación del RNAm de este gen por la insulina.

El *Igf-II* se ha estudiado poco en etapas embrionarias, se sabe que su máxima expresión se lleva a cabo en esta fase expresándose en los tejidos que darán origen a la placenta y se reduce su expresión después del nacimiento (Brice y col., 1989). El mensajero maduro del *Igf-II* que se expresa en las gónadas fetales es el mismo que se transcribe en la placenta del ratón, esto se determinó después de haber hecho una secuenciación de los productos obtenidos por análisis de RT-PCR en ratones de la cepa B6(C57BL/6J) conocida como B6 (Castillo-Cobian, 1999). Los resultados obtenidos en la presente investigación apoyan observaciones previas realizadas en los ovarios de las hembras del ratón de la cepa B6.Y^{TIR} (Lizárraga -Sánchez, 1997). El estudio del *Igf-II* en el ovario de ratones XX y XY de la cepa B6Y^{TIR} describe que la expresión en los ovarios XX fue constante a lo largo del desarrollo embrionario, mientras que en los ovarios XY se detectó una disminución a los 11 dg (Lizárraga-Sanchez, 1997). Estos hallazgos sugiere que el *Igf-II* en los testículos se expresa poco en general en gónadas portadoras del cromosoma Y. La presencia de este gen durante el periodo de la gónada que corresponden a las etapas fetales E16, E18 plantea que el *Igf-II* podría estar participando como mitogéno y promover la diferenciación de las células testiculares. Estas funciones se han descrito en otro tipo de tejidos (Mercola y Stiles, 1988; Sara y Hall, 1990; Giudice, 1992),



pero hasta el presente la función del *Igf-II* en el testículo embrionario no se ha determinado, ni tampoco se sabe que lo regula en la fase uterina. Es interesante saber que la insulina regula la expresión del *Igf-II* específicamente en el testículo embrionario de ratón de la cepa CD1. Lo cual plantea que los receptores del factor de crecimiento similar a insulina tipo II interactúa con alguna de las proteínas que participan en la cascada de señales de la insulina: a) Comprobamos que las dosis mayores de 5 UI de insulina son mortales para el ratón.

b) Al amplificar el transcrito para *Igf-II* en el grupo experimental a los 18 dg observamos una disminución drástica en la expresión del *Igf-II* la cual fue menor a la observada a los 12 dg del desarrollo normal del testículo embrionario (Fig. 14). El transcrito de la *Hprt* se mantuvo constante durante el desarrollo mencionado ya que este es un gen constitutivo el cual participa en la ruta de salvamento de nucleótidos (Nelson, 2000) y no se esperaba encontrar ninguna variación. De tal manera que la baja expresión observada no fue debido a una falla técnica lo que impidió la detección de este gen en el grupo experimental. Estos hallazgos confirman nuestra hipótesis de que la baja expresión de este gen es causada por la insulina al final del desarrollo por la completa inhibición del *Igf-II* en etapas mas tempranas.

Sin embargo, la amplificación del transcrito del *Igf-II* a los 16 dg presentó muchos problemas técnicos debido a que no lo podíamos visualizar en el gel. Se tuvo que modificar el programa de amplificación aumentando 10 min mas el tiempo de elongación obteniéndose una banda como se observa en la (Fig. 14) una expresión menor comparada al grupo control. Un hallazgo



interesante con respecto al *Igf-II* es el hecho de que el RNAm se expresa mas que la proteína ya que ésta se detecta en las células de Leydig y en las células de Sertoli en intensidad moderada (Morales, 2006). Estos datos plantean que la proteína podría ser regulada negativamente después de la traducción.

La observación de que la insulina regula negativamente la expresión del *Igf-II* en el testículo embrionario puede deberse a la semejanza estructural que ambas moléculas presentan ya que comparten el reconocimiento de varias proteínas que participan en la vía de señales de la insulina como el sustrato, receptor a Insulina conocido como ISR-1 del cual se conocen varios tipos . El *Igf-II* al reconocer el receptor a insulina activa efectos metabólicos como transporte de glucosa y aminoácidos, aunque tiene poca afinidad por este receptor (O'Dell, 1998).El *Igf-II* reconoce con mayor afinidad el receptor para el *Igf-I* que al de la insulina. Además el *Igf-II* al unirse a este tipo de receptor estimula la síntesis de DNA, proliferación y diferenciación celular. Sin embargo el papel del *Igf-II* es motivo de controversia en la actualidad ya que aparentemente al unirse a su receptor manosa 6-fosfato este se ve involucrado en la internalización y degradación del *Igf-II* (O'Dell, 1998). Es posible que al administrarles insulina la concentración plasmática de esta hormona haya aumentado los receptores del *Igf-II*. Se ha descrito que el receptor del *Igf-I* tiene mayor afinidad por la insulina que por el *Igf-II*, por lo tanto el *Igf-II* presente se vería obligado a solo reconocer el receptor manosa 6-fosfato y como resultado de esta unión la degradación de dicho factor por lo que se observa una disminución en su expresión (O'Dell, 1998).



Otra posible explicación sería que la insulina regule negativamente a nivel de transcripción, la expresión del RNAm del *Igf-II* a través de la activación de represores o correpresores. Tendrían que realizar experimentos para determinar el posible mecanismo de la disminución de la expresión del transcripto del *Igf-II* por la insulina en testículo embrionario.

Durante el desarrollo normal del testículo la proteína del *Igf-II* se expresó poco a lo 12 dg edad en la que ocurren los principales eventos morfológicos y de diferenciación del testículo mientras que el RNAm del *Igf-I* es mas abundante (Villalpando y cols, 2003). Es posible que su función se requiera en etapas fetales únicamente.

Aunque en la presente tesis no se evaluó el papel de este factor de crecimiento, datos recientemente obtenidos plantean que el *Igf-II* regula también la producción de testosterona en el testículo fetal a los 18 dg de células aisladas de testículo fetal. Asimismo, a los 18 dg se demostró que las células testiculares producen este factor de crecimiento, (Morales, 2006).

Finalmente la interacción que parece darse entre la insulina y el *Igf-II* permite sugerir que la expresión del RNAm del *Igf-II* en testículos embrionarios está regulado negativamente por la insulina y por factores de crecimiento similares a insulina tipo I y II conjuntamente.

VII. CONCLUSIONES

1. La expresión del RNAm del *Igf-II* en el grupo control se incrementa de acuerdo a la edad de desarrollo testicular de los 12 etapa inicial de la diferenciación testicular hasta la etapa perinatal a los 18 dg.
2. La insulina regula negativamente la expresión del *Igf-II*, debido a que abate la expresión del *Igf-II* de los 12-14 dg.
3. La insulina disminuye la expresión del *Igf-II* en la etapa fetal a los 16 dg.



IX. BIBLIOGRAFIA

1. Adashi EY., Resnick C.E., Payne W., Rosenfeld R.G., Matsumoto T., Hunter M.K., Gargosky S.H., Zhou and Bondy C.A. 1997. The mouse intraovarian insulin-like growth factor: departures from the paradigm. **Endocrinology**. 138: 3881-3890.
2. Andrew R. and Docherty. 1992. *Insulin: Molecular Biology to Pathology*. Oxford University Press. pag. 37-40.
3. Ashcroft F. and Ashcroft S. 1992. *Insulin: Molecular Biology to Pathology*. Oxford University Press, 30-36.
4. Bell G.I., Pictet, R.L., Rutter W.J., Cordell B., Tischer E., and Goodman. 1980. Sequence of the human insulin gene. **Nature**. 284: 26-32.
5. Bell, G.I., Gerhard, D.S., Fong, N.M., Sanchez-Pescador R., and Rall L.B. 1985. Isolation of the human insulin like growth factor genes insulin-like growth factor II and insulin genes are contiguous. **Proc Natl Acad Sci USA**. 82: 6450- 6454.
6. Bondy C.A., Wener H., Roberts C.T. y LeRoith D. 1990. Cellular pattern of Insulin like growth factor- I (IGF-I) and type I IGF receptor gene expression in early organogenesis: comparison with IGF-I gene expression. **Mol Endocrinol**. 4:1386-1398.
7. Blanchard M. G. and Josse N. 1974. : Source of the antimüllerian hormone synthesized by the fetal testis, müllerian inhibiting activity of fetal bovine Sertoli cell in tissue culture. **Ped Rev**. 8:968-978.
8. Brice A.L., Cheetham J.E., Bolton V.N., Hill N.C.W. y Shofield P.N. 1989. Temporal changes in the expression of the IGF-II gene associated with tissue maturation in the human fetus. **Development**. 117:273-281.



9. Capel B., Swain A. Swain A., Nicolis S., Hancker A. Walter M. Koopman P. Goodfellow P. and Lovell-Badge R. 1993. Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testi. **Cell**. 73:1019-1030.
10. Carlson BM.2000. Embriología Humana y Biología del desarrollo. Editorial Hartcourt S.A. pag. 376-391.
11. Castillo Cobian A. 2000. Secuenciación del factor similar a insulina tipo II durante el desarrollo oncogénico de la gónada de ratón B6Y^{DOM} y su expresión en la cepa silvestre *Mus-musculus*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
12. DeChiara T. M., Efstratiadis D.J., Robertson E.J. 1990. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an IGF-II gene disrupted by targeting. **Nature**. 345:78-80.
13. DeMellow J.S., Handelsman D.J., Baxter R.C. 1987. Short-term exposure to insulin-like growth factors simulates testosterone production by testicular interstitial cell. **Acta Endocrinol.** (Copenh). 115:483-489.
14. Foster J.W., Dominguez-Stegilch M.A., Guioli S., Kwok C., Weller P.A., Stevanovic M., Weissenbach J., Mansour S., Young I.D., Goodfellow P.N., Brook J.D., Schafer A.J. 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY – related gen. **Nature**. 372: 525-530.
15. Froech E.R., Schmid C., Schwander S, Zapp J. 1985. Actions of the insulin like growth factor. **Rev Physiol**. 47: 443-467.
16. Gangj V., Rydziel S., Gabbitas B., Canalis E. 1998. Insulin-like growth factor II promoter expression in cultured rodent osteoblasts and adult rat bone. **Endocrinology**. 139: 2287-2292.
17. Gangj V., Rydziel S., Gabbitas B., Canalis E. 1998. Insulin-like growth factor II promoter expression in cultured rodent osteoblasts and adult rat bone. **Endocrinology**. 139: 2287-2292.



18. Giudice L.C. 1992. Insulin like growth factor and ovarian follicular development. **Endocr Rev.** 13:641-666.
19. Godin I, Wylie C. 1991. TGF β 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cell in culture. **Development.** 113: 1451-1457.
20. Gray A., Tam A.W., Dull T.J., Hayflick J., Pintar J., Cavenee W.K., Koufos A. Y Ullrich A. 1987. Tissue-specific and developmentally regulated trascription of the IGF-II gene. **DNA.** 6: 283-295.
21. Gubia J., Vivian N., Economou A., Jackson D. Goodfellow P. and Lovell-Badge R. 1992. Inverted repeat structure of the Sry locus in mice . **Proc Natl Acad Sci USA.** 89: 7953-7957.
22. Haeften T.W. and Twickler Th. 2004. Insulin Like growth factor and pancreas beta cell. **Eur J Clin Investig.** 34:249-255.
- 23.. Harper, M. E., Ullrich, A. And Saunders, G.F. 1981. Localisation of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. **Proc Natl Sci USA.** 78: 4458-4460.
24. Hu J.F., Vu T.H. Y Hoffman A.R. 1995. Differential biallelic activation of three insulin-like growth factor II promoters in the mouse central nervous system. **Mol Reprod Dev.** 44: 153-158.
25. Jamin S.,Arago N., Mishina Y., Hanks M., Behringer R. 2003. Genetic studies of the ANH/MIS signaling pathway for Müllerian duct regression. **Mol Cell Endocrinology.** 211:15-19.
26. Jeske Y.W.A., Mishisa Y., Cohan D.R., Behringer R.R. Y Koopman P.1996. Analysis of the role of Amh and Fra1 in the Sry regulatory pathway. **Mol Reprod Dev.** 44: 153-158.
27. Kofman S., Merchant H., Pérez G. 1982. Diferenciación sexual. Bases biológicas del diformismo sexual. **Investigación Clínica.** 34: 349-359.



28. Koopman P., Münstenberg A., Capel B., Vivian N., Lovell-Badge R. 1990. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. **Nature**. 348: 450-452.
29. Kreidberg J.A., Sariola H., Loring J.M., Pelletier J., Housman D., Jaerisch R. 1993. WT-1 is required for early kidney development. **Cell**. 47: 679-691.
30. Langman. 2004. **Embriología Médica con orientación clínica**. Editorial Panamericana. 9ª Edición. Pág. 359-365.
31. Leal L., Ochoa M., Méndez J. 2002. Importancia Clínica de los factores de crecimiento parecidos a la insulina. **Gac Méd.(Mex)**. 139 : 6 589-599.
32. Lee J.E., Pintar J., Efstratiadis A. 1990. Pattern of the IGF-II gene expression during early mouse embriogénesis. **Development**. 110: 151-159.
- 33.. Liu X.J., Malkowski M., Erickson G.F., Shimasaki S., Ling N. 1993. Developmental of specific antibodies to rat insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBP-2 to-6): analysis of IGFBP production by rat granulosa cell. **Endocrinology**. 132: 1176-1183.
34. Lizárraga Sánchez F. 1997. Expresión del RNAm del IGF-II antes y después de la diferenciación sexual del ovario del ratón B6Y^{DOM}. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
35. Lomedico P., Rosenthal N., Efstradiatis A. Gilbert, W. Kolodner R., Tizard R.1979. The structure and evolution of two nonal allelic rat preproinsulin genes. **Cell**. 18: 545-558.
36. Luo X., Ikeda Y., Parker K.L. 1994. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. **Cell**. 77: 481-490.



37. Luo X., Ikeda Y, Hacker A. 1995. The Molecular genetics of Sry and its role on mammalian sex determination. **Phil Trans R Soc Lond B.** 300: 279-238.
38. McDonald R.G., Pfeffer S.R., Coussens L., Tepper M.A., Brockleblank C.M., Mole J.E., Anderson J.K., Chen E., Czech M.P., Ullrich A. 1998. A single receptor binds both IGF-II and Mannose-6-phosphate. **Science.** 239:1134-1137.
39. Mcelreaveryk, Fellous M. 1999. Sex determination and the Y chromosome. **Am J Med Genet.** 89: 176-185.
40. McLaren A.1991. Development of the mammalian gonad : the fate of the supporting cell lineage. **Bioessays.**13:151-156.
41. Manson H.D., Wilis D.S., Holly J.M., y Franks S. 1994. Insulin preincubation enhances insulin – like growth factor – II (IGF II) action on steroidogenesis in human granulosa cells. **J Clin Endocrinol Metab.** 78 : 1265 – 1267.
42. Moore KL, Persaud T.N.N., 1999. Embriología Clínica. México McGraw-Hill Interamericana Editores.
43. Merchant Larios H. 1993. El sexo gonadal. Memorias del congreso conmemorativo del jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Tomo I. UNAM. 451-460.
44. Mercola M., Stiles C.D. 1988. Gro wth factors superfamilies and mammalian embryogenesis. **Development.** 102:451-460.
45. Mesiano S. Y Jaffet R.B. 1993. Interaction of insulin – like growth factor – II and estradiol directs stereidogenesis in the humans fetal adrenal toward dehydroepiandroestrone sulfate production. **J Clin Endocrinol Metab.** 77: 754 – 758.



46. Morales Rivera J. 2006. Estudio Inmunocitoquímico de la expresión del Factor de Crecimiento Similar a Insulina Tipo II (IGF-II) en la etapa Intrauterina. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
47. Nahum R., Thong K.J, Hiller S.G. 1995. Metabolic regulation of androgen production by human thecal cell in vitro. **Hum Reprod.** 10: 75 – 81.
48. Nelson David, Cox Michael. **Lehninger Principles of Biochemistry**, Third Edition, Worth Publisher, 2000 pág.862.
49. O'Dell S., Day I. 1998. Molecules in focus: Insulin-like growth factor II (IGF-II). **Int J Biochem Cell Biol.** 30: 767-771.
50. O'Malley, K.L., Rotwein, P. 1988. human tyrosine hydroxylase and insulin genes contiguous on chromosome 11. **Nucleic Acids Res.** 6 : 4437-4445.
51. Pardo Ay Castillo S.2002. Nuevos Conceptos genéticos en la diferenciación sexual humana. **Rev. Hospital Clínico Universidad de Chile** Vol.13 No.2, 134-138.
52. PLM. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, 2005.
53. Pontiggia A., Rimini R., Harley V.R., Goodfellow P.N., Lovell – Badge R., Bianchi M.E. 1994. Sex – reversing mutations affect the architecture of SRY – DNA complexes. **EMBO J.** 13: 6115 – 6124.
54. Rey Rodolfo. 2001. Diferenciación sexual embrio-fetal: De las moléculas a la anatomía . **Rev Chil Anat.** Vol.19 1: 75-82.
55. Rimini R., Pontiggia A., Spada F., Ferrari S. Harley V.R. Goodfellow P.N., Bianchi M.E. 1995. Interaction of normal and mutant SRY proteins with DNA. **Phil Trans R Soc Lond B.** 350: 215-220.



56. Roberts L.1999. Sexual Development New Solution to an Anaen Ridale. Defining the differences between Adam and Eve. **Humana Genetics**. 65: 933-942.
57. Rotwein P., Hall L.J. 1990. Evolution of IGF-II: characterization of the mouse IGF-II gene and identification of two pseudo-exons. **DNA Cell Biol**. 9: 725-735.
58. Sara R., Hall K. 1990. Insulin like growth factors and their bindings proteins. **Physiol Rev**. 70:591-614.
59. Serra G., Pérez G., Joffe R. 1970. De novo testosterona biosynthesis in the human fetal testis. I. **Clin Endocrinol Metab**. 30:128.
60. Soares M., Schon A. 1985. RNA mediated gene duplication the rat preproinsulin I gene is a fuactional retroposon. **Mol Cell Biol** 5: 2090- 2103.
61. Stempien M.M., Fong N.M., Rall L.B. Y Bell G.I.1986.Sequence of a placental cDNA encoding the mouse IGF-II precursor. **DNA** 5:357-361.
62. Velasco A., San Roman L., Serrano J., Martinez-Sierra R., Cadavid I.2004. **Farmacología Fundamental**. McGraw-Hill Interamericana.
63. Villalpando I. 2001. Péptidos en la Biología de la Reproducción de los mamíferos. **Biología de la reproducción II**. Ed. Javier Velásquez Moctezuma. UAM-PUIS. Pág. 121-132.
64. Villalpando I., López V. 2003. Insulin-like growth factor I (IGF-I) regulates endocrine activity of the embryonic testi in the mouse. **J Steroid Biochem Mol Biol**. 86:151-158
65. Wentworth B.M., Schaefer I.M., Villa-Komaroff L., Chirgwin J.M.1986. Characterisation of two nonallelic genes encoding mouse preproinsulin. **J. Mol. Evolution** 23: 305-312.



66. Yuan W., Lucy M.C., Smith M.F. 1996. Messenger ribonucleic acid for insulin-like growth factors - I and -II, insulin-like growth factor-binding protein-2, gonadotropin receptors, and steroidogenic enzymes in porcine follicles. **Biol Reprod** 55: 1045-1054.



ABREVIATURAS

CGPs	Células Germinales Primordiales
dg	Días de gestación
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
5 α -DHT	5 α -Dihidrotosterona
HIM	Hormona inhibidora de los conductos de Müller
Hprt	Hipoxantina-fosforribosil-transferasa
IGF-II	Factor de Crecimiento Semejante a la Insulina tipo II
Kb	Kilobases
KDa	Kilo Dalton
mg	Miligramos
min	Minutos
μ L	Microlitros
nM	Nanomol
pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pmol	Picomol
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	Ácido Ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa reversa
seg	Segundos
UI	Unidades Internacionales
V	Volts



IX. APÉNDICE

Solución amortiguadora (Tris ácido bórico EDTA) TBE 10X

Tris base (1M)	60.5 g
Ácido bórico (1M)	30.85
EDTA-Na ₂ 2 H ₂ O (20mM)	3.72g
Agua destilada	10000 mL

Volumen final 1000mL

Almacenar a temperatura ambiente

Solución amortiguadora de carga (Azul de bromofenol) ABF al 10%

ABF	1 mg
Glicerol	2 mL
Agua desionizada	8 mL
Volumen final	10mL
Almacenara	-20°C

