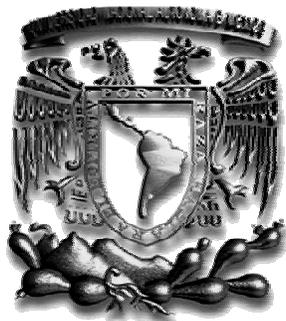


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

**“EXPRESIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
SIMILAR A LA INSULINA TIPO II (IGF-II) Y SU
PARTICIPACIÓN EN LA SECRECIÓN DE
TESTOSTERONA EN EL TESTÍCULO DE RATÓN
IN UTERO”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

JUDITH MORALES RIVERA

MÉXICO, D. F.

2007





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: PATRICIA ELVIRA BERRON RUÍZ

VOCAL: MARTHA LETICIA JÍMENEZ PARDO

SECRETARIO: MARÍA IRMA VILLALPANDO FIERRO

1er. SUPLENTE: MARÍA GUADALUPE REYES GARCÍA

2do. SUPLENTE: JOSÉ IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ

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

JUDITH MORALES RIVERA

A la Universidad Autónoma de México (UNAM), que me permitió crecer como persona, profesionista y brindarme la oportunidad de ser parte de esta gran institución.

A la Facultad de Química la cual me formo como profesionista y segunda casa en la que viví la mayor parte de la carrera con todos mis compañeros.

A la Dra, Irma Villalpando Fierro, la cual me permitió realizar esta tesis y por compartir su conocimiento. Gracias por apoyarme en todo este tiempo.

A Esmeralda Lira por ofrecerme su ayuda incondicional en todo el tiempo que estuve en laboratorio y por todos los momentos increíbles que pasamos juntas.

A la Institución de Investigaciones Biomédicas y los departamentos de Biología Celular y Fisiología de la UNAM, las cuales prestaron sus instalaciones para la realización de tesis.

A Angelica Ugalde O. por ayudarme en los trámites de esta tesis, por que siempre me alento a seguir adelante y nunca decaer. Por sus buenos consejos y por ser una gran persona en toda la extensión de la palabra.



A MIS PAPÁS

A mis Papás que siempre estuvieron conmigo en los días felices y tristes de mi vida, por su apoyo incondicional, por no escatimar nada y darlo todo. Por ser personas que siempre me enseñaron a ser honesta, trabajadora y responsable.

Por todo esto les agradezco porque hemos alcanzado un paso muy importante en mi vida. Gracias por creer y confiar en mí. MIL GRACIAS.

A MI FAMILIA

A mis hermanos: Antonio, Lupita, Sandy, Armando y Vivi, por soportarme en mis desvelos y mis malos ratos, por alentarme siempre. Y ahora les digo lo logré.

A Angela una amiga incondicional que siempre cuidó de mí. Por sus grandes consejos que han sido una buena motivación para llegar a este gran paso importante de mi vida. Te lo agradezco.

A mi abuelito que ya le había prometido que iba ser pronto mi titulación. Gracias por creer en mí y ser parte fundamental en mi vida.

A todos mis tíos y tías que aunque se que algunos no están aquí siempre me alentaron y motivaron a seguir adelante. Gracias por su apoyo.



A MIS AMIGOS

A Belem y Tere que siempre creyeron en mi, por los momentos inolvidables que hemos pasado y seguirán pasando. Gracias por su amistad incondicional amigas.

A todos mis amigos:

Nancy, Daniel, Erika, Marcelino, Adriana, Jorge A., Sonia, Angélica, Elena, Rocío, Silvia, Karina, Sol, Eder, J. De Jesús, Roberto, Isela, Kenia, Laura, Vanesa, Berenice y todos los que me falten. Por hacerme pasar momentos inolvidables en toda la carrera, por hacer crecer una amistad increíble y por ser personas con un gran corazón que dan su apoyo incondicional.

A Haydeé que fue una persona única, valiente, una super amiga que aunque ya no esta aquí me dejó una gran enseñanza. Por ser una mujer excepcional siempre la llevare en mi corazón.

MIL GRACIAS POR TODO





ÍNDICE

	Pág
I Resumen.....	1
II Introducción.....	2
1.- Desarrollo gonadal	
<i>a) Cresta genital.....</i>	3
<i>b) Gónada indiferenciada.....</i>	4
<i>c) Desarrollo testicular.....</i>	7
2.- Genes que participan en la diferenciación sexual testicular de los mamíferos	
<i>a) Factor determinante testicular.....</i>	8
<i>b) Hormona inhibidora de los conductos de Müller.....</i>	10
<i>c) Genes autosomales participantes en la diferenciación testicular.....</i>	11
3.- Factor de crecimiento similar a la insulina tipo II (IGF-II)	
<i>a) Organización del gen.....</i>	12
<i>b) Receptor del IGF-II.....</i>	15
<i>c) Organización de la proteína.....</i>	16
4.- Metabolismo de esteroides	
<i>a) Principales vías de biosíntesis.....</i>	18
<i>b) Producción de andrógenos.....</i>	20
<i>c) Tipo de andrógenos.....</i>	22
5- Función del IGF-II en hormonas sexuales	
<i>a) Papel en secreción de hormonas sexuales.....</i>	23
<i>b) Función en diferenciación testicular.....</i>	23
<i>c) Expresión del IGF-II en tejido.....</i>	23

<i>d) Ubicación del IGF-II en el testículo.....</i>	24
<i>e) Funciones del IGF-II.....</i>	25
III. Planteamiento del problema e hipótesis.....	27
IV. Objetivos.....	28
V. Material y Métodos	
1.- Reactivos.....	30
2.- Material Biológico	
<i>a) Generación de hembras gestantes.....</i>	30
<i>b) Producción de embriones de ratón.....</i>	30
<i>c) Obtención de muestras biológicas.....</i>	30
<i>d) Fijación de antígenos.....</i>	30
<i>e) Inclusión.....</i>	31
<i>f) Ultramicrotomía (Obtención de cortes en congelación).....</i>	31
<i>g) Técnica de Inmunodetección.indirecta del IGF-II.....</i>	31
<i>a) 12 d.g. etapa de crecimiento (diferenciación testicular temprana)</i>	
<i>b) 14 d.g. etapa fetal</i>	
<i>c) 16 –18 d.g. etapa perinatal</i>	
<i>h) Cultivo celular y neutralización del IGF-II.....</i>	35
<i>i) Extracción de esteroides.....</i>	36
<i>j) Cuantificación de testosterona por métodos inmunoenzimáticos</i>	37
VI. Resultados	
<i>1) Viabilidad celular.....</i>	40
<i>2) Análisis de la expresión proteica del IGF-II en el testículo fetal.....</i>	40
<i>a) 14 d.g. etapa de crecimiento</i>	
<i>b) 16 d.g. etapa fetal</i>	
<i>c) 18 d.g. etapa perinatal</i>	
<i>3) Inhibición endógena del IGF-II en células testiculares.....</i>	43
<i>4) Cuantificación de testosterona en células de Leydig en la etapa perinatal</i>	43

VII. Discusión.....	45
VIII. Conclusiones.....	48
IX. Bibliografía.....	49
X. Apéndice.....	58

I. Resumen

La diferenciación sexual testicular en el ratón ocurre a los 12 d.g. por la presencia del *Sry* y moléculas producidas localmente como los factores de crecimiento similares a la insulina tipo I y II (IGF-I e IGF-II). En este trabajo se analizó la expresión proteica del IGF-II, así como su papel en la secreción de testosterona en el testículo embrionario del ratón *Mus musculus*. Se emplearon ratones hembras gestantes de la cepa CD1 de 14-18 d.g. Se sacrificaron por dislocación cervical, se obtuvieron los embriones, se extrajeron los testículos y se fijaron en paraformaldehído al 4 %, 2 horas en amortiguador de fosfatos 0.1M, con un pH de 7.4, a 4° C. El tejido se incluyó y se obtuvieron cortes de 14 µm. Posteriormente se realizó la inmunodetección del IGF-II con la técnica de Avidina-Biotina-Peroxidasa, la cual se reveló con diaminobenzidina tetraclorhidra. Se aislaron 40 testículos de ratón en la etapa perinatal de 18 d.g. Se disgregaron con tripsina al 0.1 % y se sembraron 1×10^5 células en medio DULBECO modificado con y sin 100 ng de anti IGF-II, 24 horas con 5% de CO₂, a 37 ° C. La extracción de esteroides del medio de cultivo celular se hizo con metanol-cloroformo (9:1) y éter etílico. La cuantificación se realizó con un método inmunoenzimático (EIA). Los datos de la inmunocitoquímica mostraron que la expresión del IGF-II es muy baja a los 14 y 16 d.g. (fase de crecimiento y etapa fetal respectivamente). Sin embargo, a los 18 d.g. (etapa perinatal) hay una expresión más alta en las células reproductoras precursoras de gametos y de Sertoli dentro de los cordones testiculares, así como en las células de Leydig. En el control no se observó ninguna expresión del IGF-II. Asimismo, la inhibición del IGF-II causó una disminución de la producción de testosterona en las células testiculares. Se propone que el IGF-II promueve la secreción de testosterona en el testículo fetal e induce la diferenciación de las células de Leydig.



II. Introducción

La determinación sexual de los mamíferos se lleva a cabo en tres etapas: la primera es la determinación sexual cromosómica, en el cual el individuo será hembra (XX) o macho (XY). La segunda fase es la diferenciación gonadal, que estará representada por el ovario o testículo y por un sistema de conductos indiferenciados independientemente del sexo genético que tenga cada individuo. En la última etapa ocurre la determinación sexual fenotípica, en la cual se desarrollan los genitales sexuales internos y externos. Este proceso ocurre a partir de dos tipos de conductos: Müller en hembras y Wolf en machos. En la hembras los conductos de Müller se diferencian en trompas de Falopio, oviductos de la vagina (tercio superior) y útero, mientras que en el macho, los conductos de Wolf forman el epidídimo, los vasos deferentes y las vesículas seminales (Gilbert, 2005).

Las gónadas (ovarios y testículos) desempeñan una doble función en el organismo:

- a) Son glándulas endocrinas encargadas de elaborar y secretar diversos factores hormonales involucrados en la diferenciación sexual durante el desarrollo. Así como en el mantenimiento de las funciones reproductoras del organismo adulto.
- b) Son los sitios en los que se llevan a cabo la proliferación, diferenciación y maduración de los gametos.

Desde el punto de vista embriológico, se considera que la función secretora se lleva a cabo en las células somáticas de la gónada, mientras que la segunda función la realizan las células germinales (Merchant-Larios, 1993).

1.- Desarrollo gonadal

a) Cresta genital

El término “sexo gonadal” se refiere al proceso de diferenciación sexual que lleva a cabo la gónada indiferenciada para transformarse en testículo u ovario. Este representa la primera manifestación fenotípica de la diferenciación sexual durante el desarrollo embrionario. Dicha diferenciación fenotípica es tanto morfológica como fisiológica, y durante ella la gónada indiferenciada adquiere la capacidad para sintetizar y secretar algunos de los factores necesarios para la diferenciación sexual (Scout F. Gilbert, 2005).

El desarrollo y la diferenciación sexual del ovario y del testículo, en la mayoría de los vertebrados se inicia con la formación de la cresta genital que se localiza en la región ventral de la cavidad corporal, denominada también celoma. Éste alberga órganos del aparato digestivo y reproductor entre otros. Esta zona gonadal está inicialmente constituida por una capa de células del epitelio celómico y pocas células germinales primordiales (cgps) precursoras de los ovocitos y espermatozoides. Además de las células mesenquimáticas y endoteliales, la etapa de la cresta genital comprende de los 9.5 a los 10.5 d.g. en el ratón. Esta fase se encuentra en los machos y las hembras independientemente del sexo genético (Villalpando, 2001).

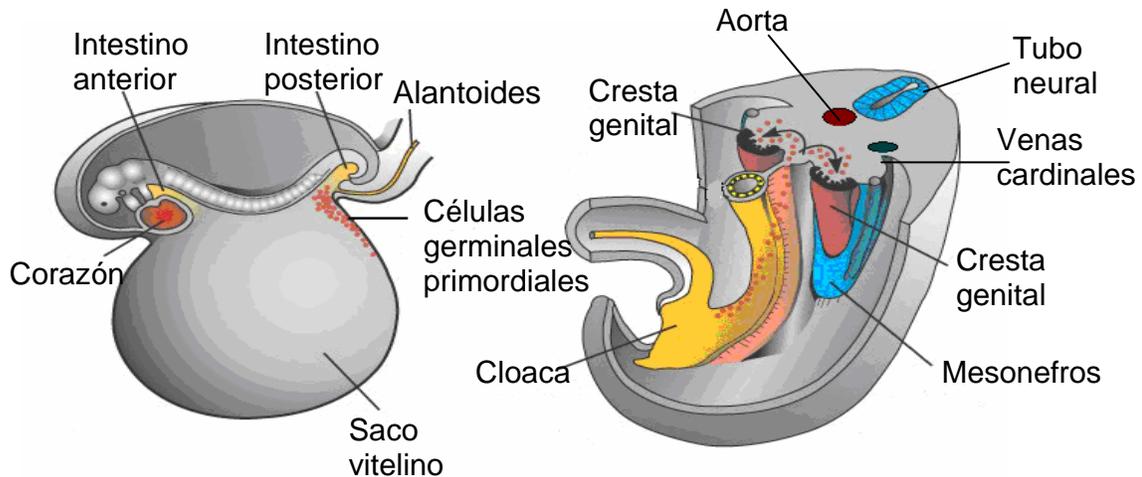


Fig. 1 Esquema de un embrión, en el cual se observa el sitio que ocupan las células germinales primordiales en la pared del saco vitelino, cerca de la inserción del futuro cordón umbilical (Gilbert, 2005).

b) Gónada indiferenciada

El sexo genético del embrión queda determinado en el momento de la unión del ovocito con el espermatozoide; en este período de aproximadamente 11 d.g. en el ratón, durante el cual es imposible distinguir un macho de una hembra por sus características anatómicas e histológicas. Esta etapa del desarrollo en la cual, aún bajo el examen con un microscopio electrónico, no hay diferencias entre individuos de uno y otro sexo a lo que se le denomina período indiferenciado del desarrollo sexual. Por lo tanto, la proliferación de cada uno de los tipos celulares mencionados da origen a los cordones sexuales que caracterizan a la gónada indiferenciada, ocupando la parte central de esta tanto en las hembras como en los machos (Rey, 2001).

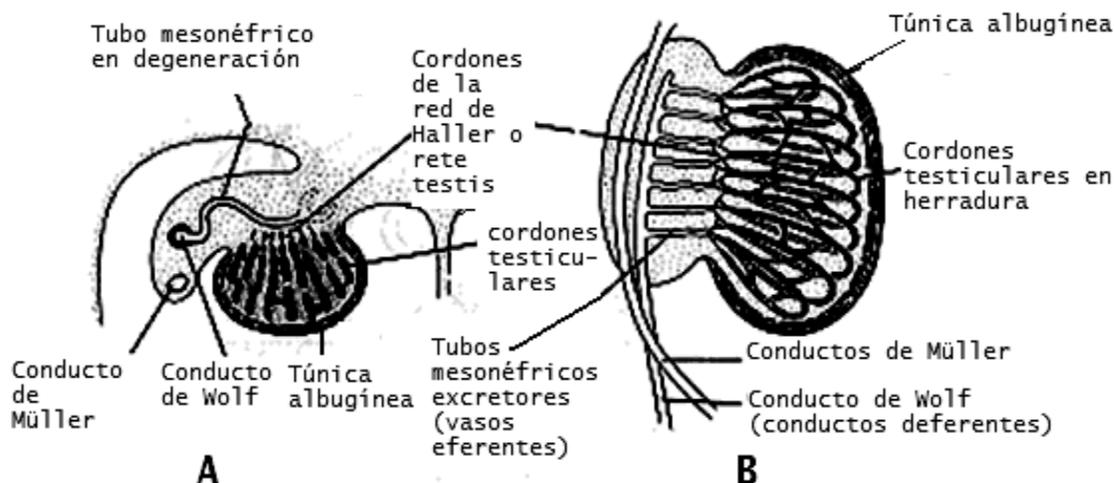


Fig. 2 **A**). Corte transversal del testículo de humano en la octava semana de desarrollo cuya organización es similar a la del ratón. Aquí se observa la túnica albugínea, conductos testiculares, red de Haller y células reproductoras. El glómerulo y la cápsula de Bowman del tubo excretor mesonéfrico en regresión. **B**) Esquema del testículo y los conductos genitales en el cuarto mes del desarrollo. Los cordones testiculares en herradura se continúan con los cordones de la red de Haller (Tomada de Lagman, 2004).

Los aparatos urinario y genital se desarrollan a partir de los gononefrotomos, estructuras pares que se forman en el mesodermo intermedio, a ambos lados de la línea media. El origen común de ambos aparatos explica la existencia de alteraciones que comprometen en algunos casos tanto al desarrollo sexual como al del sistema urinario. Del gononefrotomo, sólo el mesonefros interviene en el desarrollo de estructuras del sistema genital. El mesodermo, recubierto por el epitelio celómico, hace protrusión en la cavidad celómica del embrión formando las crestas urogenitales, que ulteriormente se dividen en crestas gonadales, medialmente, y crestas urinarias, lateralmente (Rey, 2001). Durante el período indiferenciado, las crestas gonadales de ambos sexos están constituidas por células mesenquimáticas, revestidas por epitelio celómico. Estos esbozos de las futuras gónadas son bipotenciales, es decir que podrán evolucionar hacia testículos o hacia ovarios según la

constitución genética del individuo, dando origen a los componentes somáticos de las gónadas (Rey, 2001). En el mesonefros, existe además una estructura tubular que corre en sentido longitudinal al eje mayor del gononefrotomo: el conducto mesonéfrico de Wolff. Una invaginación del epitelio celómico sobre el borde lateral de cada cresta gonadal da origen al conducto paramesonéfrico de Müller, que queda incluido en el mesodermo mesonéfrico. Estos dos pares de conductos constituyen los esbozos de los genitales internos; a diferencia de los esbozos gonadales, los conductos de Wolff y de Müller son unipotenciales (Gilbert, 2005).

La etapa de gónada indiferenciada, se observa a los 11 y 12.5 d.g, en las diferentes especies de roedores estudiados, pero es conveniente aclarar que en el ratón hembra, el ovario a los 14 d.g. tiene una organización histológica similar a la gónada indiferenciada, ya que la diferenciación fisiológica de este órgano en los roedores ocurre entre los 15 y 17 d.g. (Merchant-Larios, 2003).

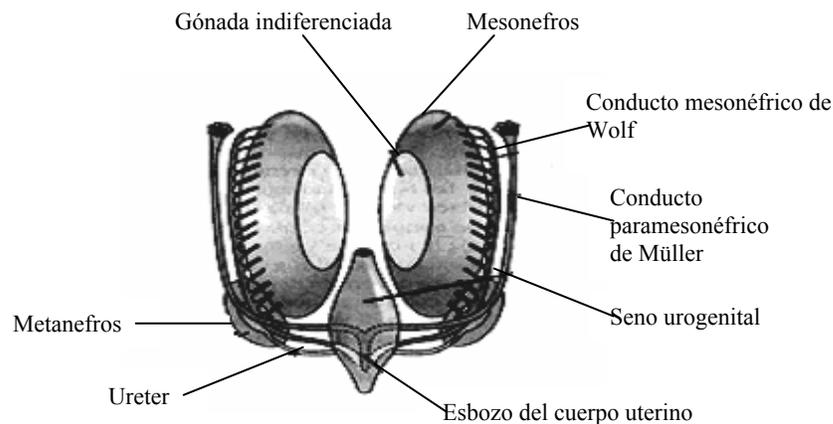


Fig. 3. Esbozos gonadales y de los genitales internos de un embrión de ratón en el período indiferenciado del desarrollo sexual. Las gónadas no muestran particularidades de uno u otro sexo. En ambos casos, se observa la coexistencia de los conductos de Müller y de Wolf (Rey, 2001).

Los órganos genitales externos se originan a partir de derivados de la cloaca y la membrana cloacal. El tabique uro-rectal divide a la cloaca en dos compartimientos: el seno urogenital ventralmente y el recto dorsalmente. La membrana cloacal queda entonces dividida en membrana urogenital por delante y membrana anal por detrás. El seno urogenital interviene en la formación de la vejiga, la uretra, la vagina y de la próstata. La membrana urogenital evoluciona formando los pliegues urogenitales, bordeados externamente por los repliegues labio-escrotales; en el extremo anterior de los mismos se forma una estructura medial impar: el tubérculo. Los esbozos de los genitales externos son bipotenciales; su evolución en sentido masculino o femenino depende respectivamente de la presencia o ausencia de hormonas testiculares (Rey, 2001).

c) Desarrollo testicular

La diferenciación testicular en el ratón ocurre entre los 12 y 13.5 d.g. existiendo una separación de los cordones sexuales del epitelio celómico orientados hacia la parte central del testículo, además de una invasión de los vasos sanguíneos y células mesenquimáticas, lo que después se les llamará cordones sexuales. Estos en su interior tienen a las células germinales primordiales (cgp), las cuales después se diferenciarán de proespermatozoona a espermatozoide y célula de Sertoli esta última sintetizadora de la hormona inhibidora de los conductos de Müller (Gilbert, 2005).

Entre las células que se encuentran fuera de los cordones se encuentran las células mesenquimáticas las cuales se diferencian en: células mioides, células de Leydig y fibroblastos (Villalpando, 2001).

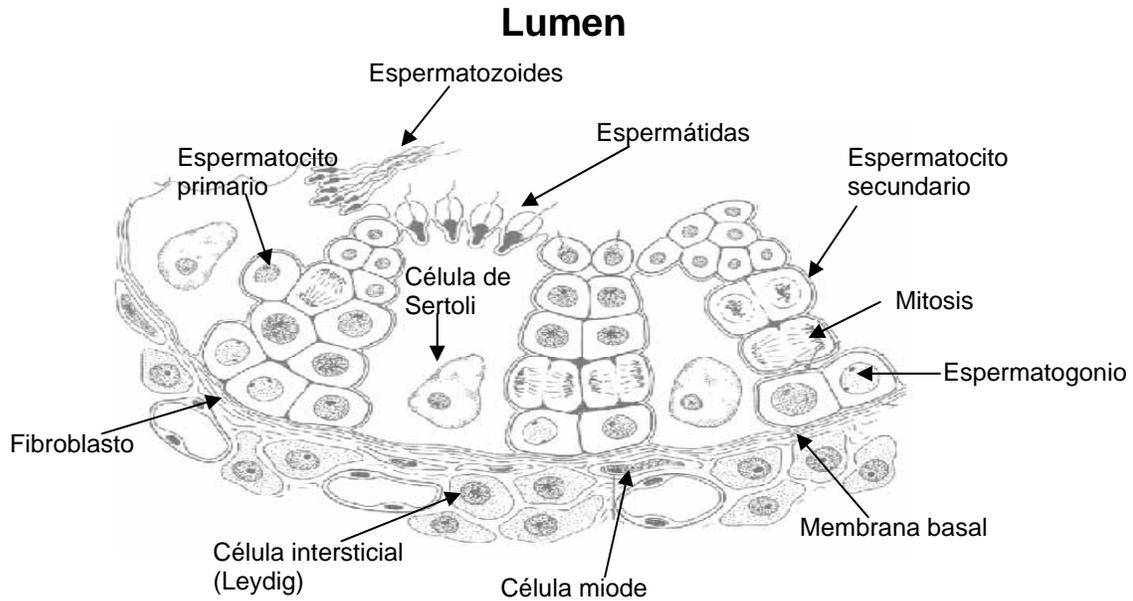


Fig 4. Diagrama de los túbulos seminíferos y el tejido intersticial del testículo adulto (Tomada de Norman y Litwack, 1997).

2.- Genes que participan en la diferenciación sexual testicular de los mamíferos

a) *Factor determinante testicular*

Dentro de la gónada indiferenciada existen genes que participan en la diferenciación testicular, uno de los cuales es el gen *SRY/Sry* (para humano y ratón respectivamente) (Koopman y col., 1990). El *Sry* se encuentra dentro del cromosoma “Y” cerca de la zona pseudosomal del brazo corto “p” que comprende aproximadamente 35 Kb (kilobases). Está formado por un exón de 2739 pb (pares de bases) que contiene un marco de lectura rodeado de una secuencia repetida e invertida de aproximadamente 17 kb (Gubia y col., 1992). Además, el transcrito cuyo tamaño es de 1.3 kb se encuentra de forma circular en la etapa adulta (Capel y col., 1993).

Estudios del *Sry*, han mostrado que no solo en las células somáticas de la cresta genital durante las fases de 10.5 a 12 d.g. está presente (Koopman y col., 1990), sino también a los 13.5 d.g. Se ha visto que durante las primeras etapas de desarrollo gonadal el sexo de

las células somáticas depende de la presencia del *Sry*, ya que sin este gen su expresión se ve retardada o se realiza en un número muy reducido de células somáticas lo que dará como resultado el desarrollo del patrón femenino. Por el contrario si se realiza de manera adecuada se diferenciarán y seguirán la formación del sexo masculino (MacLaren, 1991).

El *Sry* pertenece a una familia de proteínas caracterizadas por tener un motivo de unión al DNA conocido como HMG (High Mobility Group) que comprende aproximadamente 79 aminoácidos (Rimini y col., 1995). Este gen se agrupa 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). El gen *SRY*, induce la condensación de los cordones sexuales primarios y su penetración en la médula de la gónada indiferenciada donde se extienden y transforman para formar el *rete testis*. A continuación se forma la túnica albugínea que rompe la continuidad de la *rete testis* con el epitelio célomico. El desarrollo testicular sigue, el mesonefros degenera y los testículos quedan suspendidos por el mesénquima. Los cordones seminíferos se transforman en túbulos seminíferos, túbulos rectos y la *rete testis* propiamente dicha (Rey, 2001).

El mesénquima separa los túbulos seminíferos y da lugar al desarrollo de las células de Leydig ó células intersticiales, las cuales empiezan a segregar testosterona y androstendiona e induce la diferenciación masculina de los conductos mesonéfricos, de los genitales externos y del hipotálamo. Las células de Sertoli producen también una hormona, la AMH (hormona inhibidora de los conductos de Müller), ó factor inhibidor del sistema de Müller.

Más tarde, el epitelio de superficie se adelgaza para formar el mesotelio que cubre la superficie externa del testículo del adulto. La *Rete testis* pasa a ser un sistema continuo compuesto de 15-20 túbulos mesonefrósicos, los cuales se transformarán en conductos

eferentes y se conectarán al conducto mesonéfrico para desarrollarse en el conducto epididimario ó epidídimo (Gilbert, 2005). Pero si hay mutaciones en el gen Sry (este se relaciona con el gen SOX) existen también fallas en la determinación testicular (McElreavey, 1995, Sekido, 2004).

b) Hormona inhibidora de los conductos de Müller

Después de formarse los cordones testiculares, las células de Sertoli fetales secretan la AMH, conocida como hormona inhibidora de los conductos de Müller. Esta es una glicoproteína que se une a un receptor de membrana presente en las células mesenquimáticas que rodean al epitelio de los conductos de Müller (Josso y col., 1997), induciendo apoptosis y transformación epitelio-mesenquimatoso con la consiguiente regresión de los conductos de Müller. Por el contrario en el sexo femenino ante la falta de la AMH, los conductos de Müller dan origen a los oviductos, el útero y el tercio superior de la vagina (Gilbert, 2005). Recientes avances sugieren que mutaciones en el cromosoma X, en la región autosomal y fuera de la región determinante de la diferenciación testicular son asociados a la reversión sexual (Capel y col., 1993).

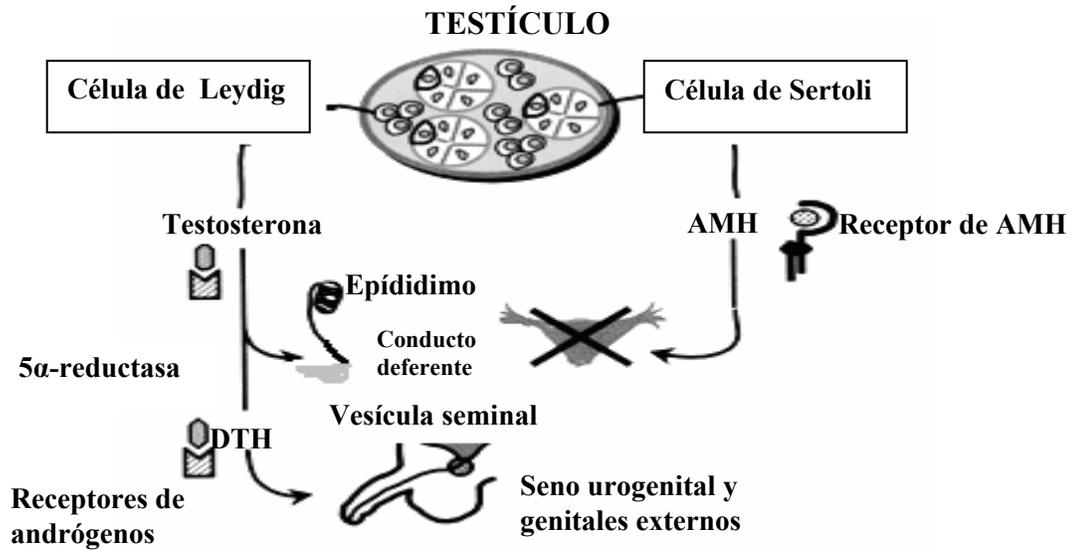


Fig.5. Regulación hormonal de la diferenciación sexual fetal (Rey, 2001).

El testículo fetal posee dos poblaciones celulares: las células de Leydig y las células de Sertoli. Las células de Leydig producen testosterona, que viriliza los conductos de Wolf al unirse a su receptor nuclear; también masculiniza el seno urogenital y los genitales externos, luego de ser transformada por la 5- α -reductasa en 5 α -dihidrotestosterona (DHT), que se une al mismo receptor, pero con más afinidad. Por su parte, las células de Sertoli secretan la AMH, la cual provoca la regresión de los esbozos del útero, oviductos uterinos y porción superior de la vagina, al unirse a su receptor de membrana (Rey, 2001).

c) *Genes autosomales participantes*

Se ha encontrado que existen otros genes autosomales que junto con el gen *Sry*, también participan en la diferenciación gonadal. Estos se mencionan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Genes autosomales asociados a la diferenciación testicular en los mamíferos

Gen	Ubicación	Composición	Función
<i>SRY</i>	Yp11	1 exón y codifica una proteína de 204 a.a	Participa en la diferenciación del testículo.
<i>SF1</i>	9q33		Facilita la expresión del gen MIS.
<i>WT1</i>	11p13	10 exones y 50 Kb	Gen tumoral e inductor indirecto de la transcripción del MIS Establecimiento de gónadas.
<i>LIM-1</i>	11p12-p13	5 exones y codifica para 1 proteína de 384 a.a	Contribuye al desarrollo embrionario.
<i>DAX-1*</i>	Xp21.2-p21.3	Codifica para 1 proteína tipo receptor huérfano	Reprime la transcripción del gen SF-1 y antagoniza la interacción funcional entre SF1 y WT1.
<i>MIS</i>	19q13	180pb	Regresión de los conductos de Müller.
<i>SOX9</i>	17q24.3-q25	Codifica 1 proteína de 509 a.a	Diferenciación de células de Sertoli y desarrollo del testículo.

Modificado de Pardo-Castillo, 2002.

* La expresión del Dax-1 se detecta en los primeros estados gonadales, en la diferenciación adrenal y en el desarrollo del hipotálamo; pero si este gen es afectado por mutaciones se ve asociado con reversión sexual (Capel y col., 1993, Swain y col., 1996).

3.- Factor de crecimiento similar a la insulina tipo II (IGF-II)

a) Organización del gen

Los factores de crecimiento similares (IGFs) a la insulina llamadas inicialmente sometamedinas, son proteínas homologas de la insulina con actividad similar a ella (Zapf y col., 1986); son polipéptidos con peso molecular aproximado de 7550 Da., que juegan



un papel importante en el crecimiento de los mamíferos, en la división celular, diferenciación y posiblemente en la regulación metabólica.

La principal fuente de IGFs es el hígado, aunque se encuentra en concentraciones mayores en la sangre, y en menor concentración en el riñón y otros tejidos (D'Ercole, 1996). La biosíntesis de los IGF's depende principalmente de la hormona de crecimiento (GH) en el hígado en la etapa adulta, de insulina y prolactina. Sin embargo, el cortisol y los estrógenos antagonizan su formación (Lamharzi y col., 1998). Los IGFs son factores de crecimiento que ejercen sus efectos biológicos en varios tipos de células, actúan por mecanismos autocrinos, paracrinos y endocrinos (Roth R, 1988, Lee y col., 1990). Estos son expresados en la preimplantación en embriones de ratón (Heyner y col., 1993). Las actividades que realizan son:

1. Agentes mitógenos (promueven la mitosis o división celular), por lo tanto favorecen la diferenciación y replicación celular (Nonoshita y col., 1994).
2. Activación de la incorporación de timidina a DNA lo cual favorece la síntesis del mismo (Rinderknecht y Humbell, 1978).
3. Incorporación de prolina en la colágena y sulfato en los proteoglicanos con lo cual se estimula el crecimiento del cartílago (Jubiz, 1996).
4. Acción de tipo insulínica sobre el metabolismo glucocídico, lipídico y proteínico de tejido conjuntivo, adiposo y fibroso. En el músculo estimulan el transporte de aminoácidos y la incorporación de glucosa en el glucógeno (Jubiz, 1996).
5. Estimulación de la síntesis proteínica y hormonal (Huang y col., 1998).

La función promotora de crecimiento del IGF-II durante la embriogénesis del ratón es mediada en parte por la señalización del receptor de la insulina, lo cual al interactuar el

IGF-II con los receptores de la insulina permiten que este incremente sus efectos (Soares y col., 1986). Además el IGF-II, parece ser inducido por el lactógeno placentario durante el desarrollo prenatal (Dull y col., 1984). La secuencia de los exones que codifican a la insulina y los factores de crecimiento similares a esta (IGF's) son altamente conservados entre especies de vertebrados (Le Roith y col., 1993, Froesch y col., 1995), y son controlados por múltiples promotores los cuales son expresados en tejidos específicos (Sunssenbach, 1989).

El gen codificador del IGF-II se localiza en el brazo corto del cromosoma 11 cerca del gen de la proinsulina y está formado por 6 exones (regiones que traducen en una secuencia de aminoácidos) y cinco intrones además de poseer dos regiones conservadas que no son funcionales. Los tres primeros exones codifican para regiones 5' que no se transcriben pero son traducidas a partir de tres promotores denominadas P1, P2 y P3, y forman RNAm con una región 3' que no se traduce (Otte y col., 1998). Los exones 4-6 codifican el precursor del IGF-II de 180 a.a. (20.1 kDa). Este último contiene una región 3' de 3035 que no se traduce y termina en un sitio único de poliadenilación (Soares y col., 1986, LeRoith y col., 1993). Se ha visto que el promotor tres (P3) es el promotor más activo en el desarrollo fetal, en tejidos con tumores y en líneas celulares (Lee y col., 1990, Rietveld y col., 1997, Sun y col., 1997). Aunque los otros promotores se han estudiado menos. La regulación transcripcional del IGF-II es un proceso multifactorial debido a un empalme del RNA y de la transcripción de factores por promotores múltiples y de la impronta genómica (Ogawa y col., 1993).

b) Receptor del IGF-II

El receptor del IGF-II o receptor tipo 2 (Igf2) es del tipo de receptor de manosa-6-fosfato y su peso molecular es de 250 kDA (Roth, 1988). Este receptor es una proteína transmembranal de una sola cadena (Rechier, 1985, MacDonald y col., 1998, Marron y col., 1998). El sitio de unión para los IGFs es diferente al que se une a la manosa-6-fosfato. No contiene dominios tirosina cinasa como el receptor tipo 1 probablemente se encuentra unido a una proteína G (Nishimoto, 1993, Jones, 1995). El receptor tipo 2 se une mejor al IGF-II y no une a la insulina, además de transportar enzimas lisosomales. Sin embargo, también se ha visto que al exponer los receptores de la insulina estos interactúan con el IGF-II (Louvi y col., 1997).

Las diferencia en cuanto a la unión de sustratos radica en las subunidades alfa (Werner, 1994). Al receptor tipo II se le ha implicado en la degradación del IGF-II y además de iniciar respuestas como la síntesis de glicógeno y glucosa (Nissley y col., 1993, O'Dell y col., 1998, Zaina y col.1998). Sin embargo, también se ha visto que el IGF- II, además de interactuar con el receptor del IGF-I reconoce un receptor adicional desconocido (Baker, 1993). En contraste, con el propio embrión, el crecimiento placentario es servido exclusivamente por una interacción IGF-II-XR, por lo que solo el receptor del IGF-II es un candidato para XR, debido a que este receptor media en parte la promoción de crecimiento durante el desarrollo embrionario (Baker y col., 1993). Una concentración excesiva de IGF-II tiene un efecto mitógeno debido a que actúa sobre el gen de este mismo lo cual da como resultado una serie de desordenes como el síndrome de Beckwith- Wiedemann, el tumor de Wilms y otros tipos de cáncer (Ohlsson y col., 1993, Steenman y col., 1994, Reik, 1997, O'Dell y col., 1998).

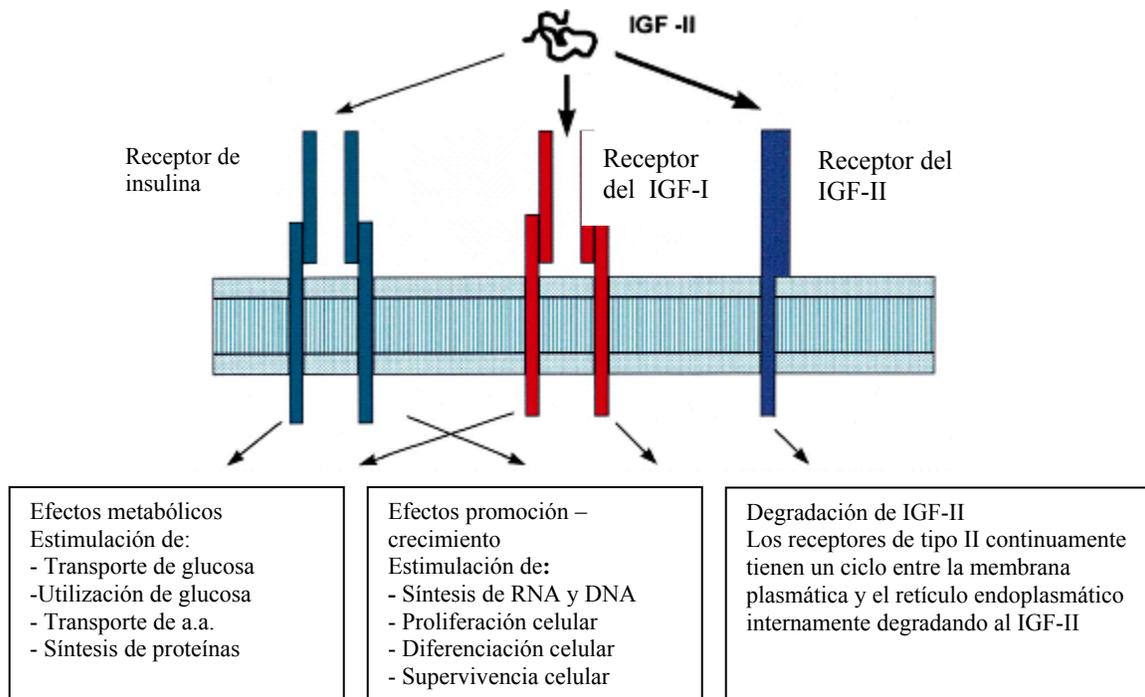


Fig.6. Interacción del IGF-II con los receptores y proteínas de la familia de la insulina. El receptor tipo 2 manosa-6-fosfato consiste de una sola cadena y solo une al IGF-II, para su degradación (O'Dell, 1998).

c) Organización de la proteína

La prehormona del IGF-II contiene un péptido carboxilo terminal de 89 a.a. y un péptido señal de 24 a.a., los cuales son rotos para formar la proteína monomérica de 67 a.a., con un peso de 7471 Daltons (Stempien y col., 1986, Sussenbach, 1989). El receptor tipo 2 está involucrado con la degradación del IGF-II (Rappolee, 1992, O'Dell y col., 1998). El dominio C para el IGF-II es de 8 aminoácidos, con un dominio D adicional que se extiende a partir del carboxilo del dominio A. La región del receptor dos produce múltiples transcripciones de promotores alterno y además es regulado por impronta parental (Moore y col., 1997, O'Dell y col., 1998).

El IGF-II es dividido entre los dominios A y B unidos por dos puentes disulfuros, con una unión interna de disulfuro en el dominio A; y a su vez son conectados por el dominio C. El dominio D no se presenta en la insulina. El carboxilo terminal de la secuencia (dominio E) de la prehormona es removido durante el proceso de la maduración. El receptor 1 reconoce a los receptores de la insulina y a los residuos de fenilalanina y tirosina. El tipo 2 reconoce residuos de los IGFBPs dependientes sobre los residuos en la primera parte del dominio B. El ARNm del IGF-II se ha estudiado en el ovario y testículo de las cepas CD1, B6 y BGy^{TIR} (Castillo-Cobián, 2000).

4.- Metabolismo de Esteroides

a) Principales Vías de biosíntesis

El papel que desempeñan las hormonas esteroideas en el desarrollo gonadal es importante debido a que están involucradas en las características secundarias del mamífero además de tener diferentes funciones. Estas son derivadas de un anillo de estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno. En los mamíferos, existen seis familias de hormonas esteroideas que se clasifican sobre una estructura y una base biológica. Entre ellos se encuentran los estrógenos (esteroideas femeninas), andrógenos (esteroideas masculinas), progestinas, mineralocorticoides, glucocorticoides, y la vitamina D con sus metabolitos; además de los ácidos biliares que estructuralmente están relacionados con el colesterol, este último es muy importante para la formación de esteroideas (Norman y Litwack, 1997).

Para la biosíntesis del colesterol se requieren de cuatro pasos esenciales:

1) Conversión de Acetato a Mevalonato.- La formación de Ácido Mevalónico (carbono de seis) de tres moléculas de acetato.

2) Conversión de Ácido Mevalónico hasta Escualeno.- La conversión de seis moléculas de ácido mevalónico a través de una serie de fosforilación (intermediarios) entre el hidrocarbano del escualeno (30 carbonos).

3) Conversión de Escualeno a Lanosterol.- La oxidación y ciclización de escualeno a lanosterol, el primer precursor cíclico de esterol.

4) Metabolismo de Lanosterol a Colesterol.- El proceso de lanosterol (para remover los tres grupos metilo y reorganizar las dobles ligaduras) para producir el colesterol (Norman y col., 1997). También el colesterol puede ser tomado de la sangre de las HDLP. Mismo que se puede obtener del que se sintetiza en la mitocondria. La conversión del colesterol a 17α -OH pregnolona y esta a 17α -OH progesterona ocurre en las crestas mitocondriales, mientras que en las reacciones posteriores se realizan en el citoplasma de la célula. Estas hormonas llevan a cabo una gran variedad de funciones fisiológicas. La estructura de todas ellas contiene cuatro anillos del núcleo esterol y son muy similares en estructura, esto es muy importante considerando las enormes diferencias en sus efectos fisiológicos (Norman y Litwack, 1997).

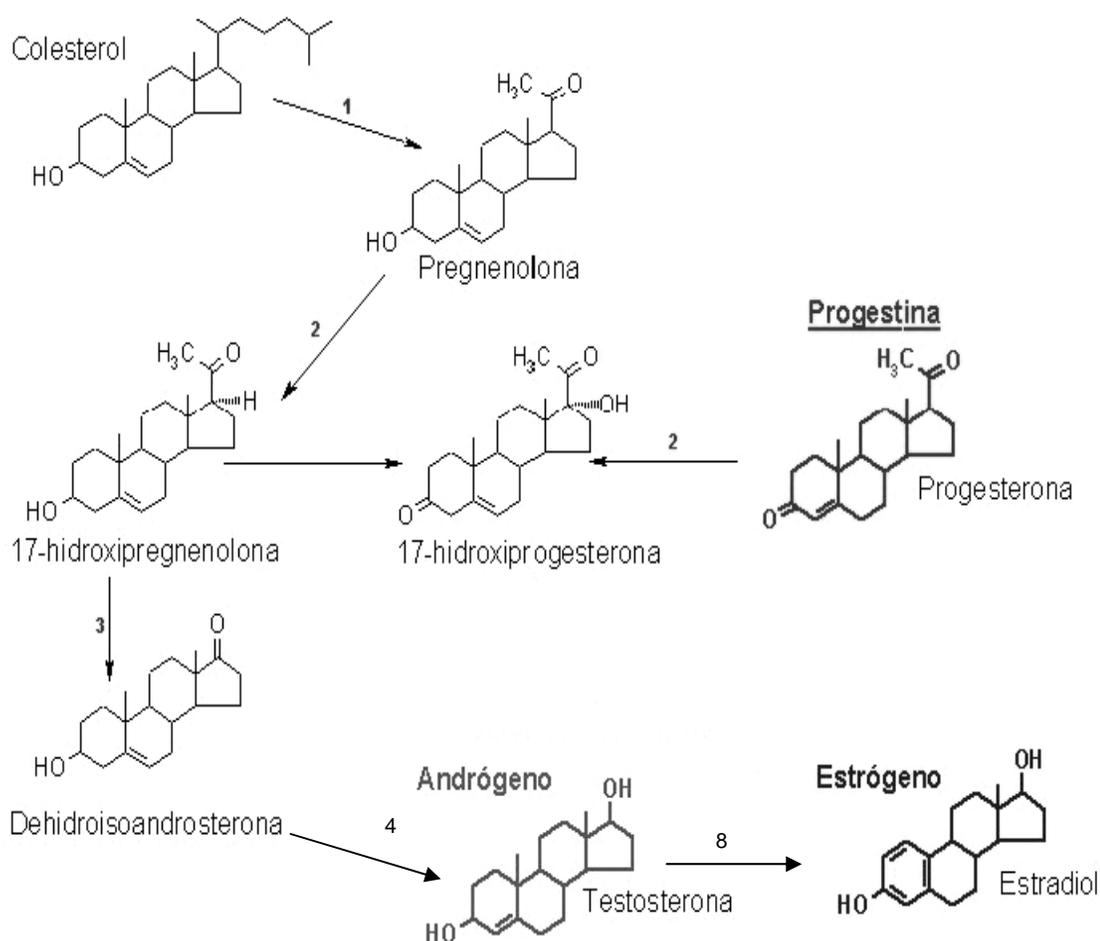


Fig.8. Principales pasos para la producción de esteroides. Los números de las enzimas que actúan en la vía: (1) enzima que corta la cadena lateral del colesterol; (2) esteroide C17 hidroxilasa; (3) esteroide C17, C20 liasa; (4) esteroide C21 hidroxilasa; (8) aromasa (Tomada de Norman y Litwack, 1997).

b) Producción de Andrógenos

Los andrógenos son hormonas esteroides que inducen la diferenciación y maduración de los órganos reproductivos masculinos. Los dos esteroides más importantes del sexo masculino son la testosterona y la 5α -dihidrottestosterona. La testosterona es el principal andrógeno masculino secretado por los testículos. Además otros andrógenos

intermediarios son liberados en bajas concentraciones, particularmente androstediona y androsteno-3 β -17-diol.

La producción de andrógenos es necesario a partir del colesterol que es confinada de la mitocondria de las células de Leydig, para después pasar a pregnolona y sintetizarse en testosterona para lo cual se requieren de cuatro reacciones enzimáticas las cuales son divididas en dos vías: la primera es la 17-hidroxipregmolona, conocida también como senda Δ^5 y la otra vía es la 17-hidroxiprogesterona conocida como senda Δ^4 . Entre los roedores la senda Δ^4 es muy predominante, mientras que en testículo humano el Δ^5 es aparentemente dominante. Todas estas reacciones ocurren en una fracción microsomal de la célula (Norman y Litwack, 1997).



c) Tipos de Andrógenos

Tabla 2. Hormonas relacionadas al desarrollo testicular

Hormona	Sitio de producción	Tejido blanco	Función biológica
Testosterona	Células Leydig en testículos	Muchos	Mantenimiento del sistema reproductivo masculino y sus características secundarias
5 α -Dihidrotestosterona (DTH)	Próstata	Próstata	Diferenciación y crecimiento del tracto reproductivo masculino: epidídimo, próstata, vesículas seminales, vasos deferentes, glándulas conductos uretrales
Androstenediol	Testículos	Muchos	No se conoce con certeza
Dehidroepiandrosterona	Testículos	-----	No se conoce con certeza
Estradiol	Testículos	-----	No se conoce con certeza

Tomada de Norman-Litwack, 1997.

5.- Función del IGF-II en la producción de hormonas sexuales

a) Papel en la secreción de hormonas sexuales

La formación de hormonas esteroides en el desarrollo gonadal el IGF-II se ve involucrado en las características sexuales secundarias y en otras funciones. Estudios realizados *in vivo* y en cultivo celular han demostrado que ciertas hormonas adrenocorticotrópicas (ACTH) en células fetales aumentan la 17 α -hidroxilasa, la romatasa P450 y la 3- β hidroxisteroide deshidrogenada (Mesiano y Jaffe, 1993). Se ha observado que existe un efecto de los glucocorticoides sobre la activación del promotor β del IGF-II embrionario, dando como resultado una activación transcripcional del gen del IGF-II (Dell y col., 1997).



b) Función en la diferenciación testicular

El crecimiento y diferenciación de los tejidos fetales ocurre a través de una serie de vías muy complejas en las cuales los factores de crecimiento como el IGF-II juegan un papel muy importante. Algunos estudios in vivo han demostrado que el IGF-II induce diferenciación de las células precursoras del hueso (de osteoblastos a osteoclastos) (Gangji y col., 1998). Pero hasta el momento no se conoce el papel del IGF-II como promotor en la diferenciación testicular.

c) Expresión del IGF-II en tejido

El IGF-II tiene funciones de crecimiento y se pueden restringir sus acciones esenciales en la vida del útero; debido a que son expresados en el desarrollo embrionario del ratón (Heyner y col., 1993, Gordon y col., 2001). La expresión del IGF-II en etapa embrionaria esta presente en tejidos derivados del trofoectodermo y después en el endodermo primitivo parietal y el visceral. Después se observa en el mesodermo extraembrionario y posteriormente en el mesodermo embrionario. En todos los componentes que formaran la placenta el gen del IGF-II se ve expresado intensamente (Lee y col, 1990). También se observa en los tejidos derivados de las somitas, mesodermo cardiaco, cartílago, tejido vascular, hipófisis e hígado (Bondy y col., 1990). Sin embargo, se ha visto que los factores de crecimiento (IGFs); así como la hormona de crecimiento (GH), están involucrados en la regulación del sistema inmune y pueden estar mediados por la vía endocrina o autocrina/paracrina, además de estar reguladas por la citocinas, como la interleucina-1 y el interferon $-\gamma$ (Vann y col., 1998). Además de ser un péptido muy importante en el sistema nervioso central (Morgan y col., 1987).

El IGF-II demuestra tener acciones muy restringidas en el útero tal vez por su interacción con el receptor de la insulina (D'Ercole y col., 1996). Existen evidencias que demuestran que el IGF-II, media el crecimiento en embriones de ratón. Además de regular genes que influyen en el desarrollo durante los estados de preimplantación, debido a que se ha encontrado que el RNAm y la proteína para el IGF-II se expresan en este estado, pero no el IGF-I y la insulina (Heyner y col., 1993).

d) Ubicación del IGF-II en el testículo

Se ha observado que después de los 13.5 días de gestación en el ratón el receptor del IGF-1 interactúa con el IGF-I y el IGF-II, este segundo reconoce un receptor adicional que aún se desconoce, pero sin embargo este último participa con el crecimiento.

e) Funciones del IGF-II

La insulina es una hormona trópica que se encuentra en útero y en células beta pancreáticas, es determinada por producir localmente el IGF-II y miembros de fibroblastos del factor de crecimiento (FGF). Los efectos mitogénicos de este último sobre las células beta son determinadas por los IGFbps, los cuales son expresados en los islotes de Langerhans. La sobreexpresión del IGF-II o del IGFbp-I puede dar como resultado nesidioblastosis luego del nacimiento en roedores, debido a que muchas células pancreáticas son destruidas por apoptosis pero reemplazadas por la neogénesis de las células beta (Hill y col., 1998). Este proceso puede enriquecer al páncreas en células beta adaptadas a las demandas metabólicas de la vida postnatal. La apoptosis de las células beta coincide con un decremento en la expresión local del IGF-II. En este evento pueden ser vinculados al IGF-II exógeno debido a que podría proteger los islotes aislados de la



citocina inducida por la apoptosis. El FGF-2 (un miembro de los fibroblastos del factor de crecimiento 2) se expresa extensamente en tejido fetal además de ser un regulador de la placenta en la angiogénesis, por lo que este puede ser un indicador del desarrollo fetal así como el riesgo de patologías como la retinopatía; ya que se ha visto que al existir diabetes en la preñez el FGF-2 está muy elevado (Hill y col., 1998).

El IGF-II es un mitógeno potente de varios tipos de cáncer como el carcinoma de la próstata, el tratamiento sugerido son antagonistas de la hormona de crecimiento, debido a que provoca la disminución del IGF-I e IGF-II (Dechiara y col., 1990) en la expresión del RNAm del IGF-II (D'Ercole, 1996, Lamharzi y col., 1998). Al IGF-II se le han atribuido una serie de síndromes ya que se ha observado que este factor de crecimiento envuelve un fenómeno conocido como *impronta parental* (Ekstrom, 1994), el cual es un proceso por el cual un gen está inactivado o silenciado, con el resultado de que solo uno de los dos genes normales está activo, esto ocurre en el desarrollo del ovocito y el espermatozoide, ya que este período es crítico debido a que el DNA presenta modificaciones que alteran la expresión de los genes de acuerdo al progenitor de origen.

Una de las modificaciones que puede sufrir es la metilación del DNA, cerca del promotor P3 y P4 incrementan la producción del IGF-II (Minniti y col., 1995, Hu y col., 1996). Este fenómeno ha sido observado tanto en el humano como en el ratón debido a que el alelo paterno heredado es activo en células embrionarias y extrambrionarias, además de ser expresadas en tejidos de pacientes con el síndrome de Beckwith-Wiedemann (desorden caracterizado por macrosomía y defectos abdominales), Prader-Willi y de Angelman y el síndrome de Simpson-Golabi-Behmel otro sobrecrecimiento desordenado y predisposición a tumores fenotípicamente pero no genéticamente (Ohlsson y col., 1993, Eggenschwiler y col., 1997).



III. Planteamiento del problema

Durante el desarrollo embrionario de los mamíferos ocurre una serie de eventos genéticos moleculares y fisiológicos que inducen la diferenciación testicular. En los últimos cinco años se han publicado datos en donde se describe que la insulina, y las moléculas relacionadas a ella estructuralmente como los factores de crecimiento similares a la insulina tipo I y II (IGF-I y II), son importantes para la reproducción y fertilidad de los mamíferos. Sin embargo, en la etapa embrionaria y adulta, hasta el presente no se ha establecido cual es el papel del IGF-II en la función testicular (revisado por Villalpando, 2003). Asimismo, no se ha identificado cual es el tipo celular que expresa el IGF-II en esta etapa. Por otra parte, se ha propuesto que el IGF-II participa en la diferenciación de las células testiculares, aunque este aspecto poco se ha estudiado en la gónada masculina.

En el desarrollo testicular se expresan diferentes genes que son importantes para la diferenciación, así como para el crecimiento particularmente de los testículos.

Se ha observado que el IGF-I se expresa en la etapa adulta en las células de Leydig principalmente. Sin embargo, no se ha estudiado hasta la fecha que células expresan el IGF-II durante el desarrollo del testículo del ratón. Tampoco se han determinado las posibles funciones de este factor prenatalmente. Con base en estos antecedentes se plantea la siguiente hipótesis de trabajo.



Hipótesis

El IGF-II se expresaría en células somáticas testiculares como: la túnica albugínea, el mesénquima, y las células de Leydig. En estas últimas el IGF-II participaría en la regulación de andrógenos de tal forma que la inhibición de la producción endógena del IGF-II, disminuiría la producción de testosterona en el testículo fetal a los 18 d.g.





IV. Objetivos

1.- Determinar el tipo celular que expresa el IGF-II durante el desarrollo del testículo del ratón *in utero*.

a) 14 d.g. fase de crecimiento

b) 16 d.g. etapa fetal

c) 18 d.g. etapa perinatal

2.-Determinar si el IGF-II regula la secreción de testosterona en las células de Leydig en la etapa perinatal a los 18 d.g.





V. Material y métodos

1.- Reactivos

Los reactivos utilizados en esta tesis fueron de grado analítico.

2.- Material biológico

a) Generación de hembras gestantes

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 oscuridad de 12/12. Los animales fueron alimentados con alimento esterilizable Harlan Tekland México LM-485 y con agua estéril acidificada a pH de 2.5.

b) Producción de embriones de ratón

Se colocaron 4 hembras de la cepa CD1, de 7 semanas con un macho. El día que se detectó el tapón de copulación se denominó día cero. Se emplearon ratones hembras gestantes de 14-18 d.g

c) Muestras biológicas

Las ratonas preñadas de 14-18 d.g. se sacrificaron por dislocación cervical, después se les practicó una incisión en forma de “V” en la región abdominal. Se obtuvo el útero y los embriones se sacaron con pinzas estériles, y se transfirieron a una caja Petri e inmediatamente se decapitaron. Se quitaron las visceras y se expusieron los testículos.

d) Fijación de antígenos

Las testículos se pusieron en solución fijadora de p-formaldehído al 4% en PBS 0.1 M, durante 24 hrs. a 4°C. Inmediatamente el tejido se lavó con solución de PBS 0.1 M, 3

veces cada 10 minutos; y pasado este tiempo se colocaron en solución de sacarosa al 30%, 24 hrs, a 4 ° C.

e) Inclusión

Se hicieron cápsulas de aluminio con Tissue freezing medium (TFM) y se pusieron en hielo. Se transfirió la muestra del frasco con sacarosa al 30% en PBS 0.1 M, a la caja de Petri en hielo. En otra caja de Petri se puso TFM y se transfirió el tejido con una pipeta Pasteur, y se incluyó en otra gota de TFM. Se puso una gota de TFM y se pasó a la que esta en hielo. Después se orientaron en el microscopio esteroscopico Leica, Estereo Zoom 6 photo. El tejido se congeló en Nitrógeno líquido ó hielo seco a -70 ° C y se almacenaron en un tubo a -20° C, como máximo una semana.

f) Ultramicrotomía (Obtención de cortes en congelación)

Se puso TFM en el porta muestras y después se montó la muestra de los testículos, en el criostato (Leica CM 18509). Se obtuvieron cortes de 14 µm en un criostato a -20 ° C y se montaron en laminillas con Tezpa (mezcla que cambia las propiedades del vidrio y permite la adhesión de cortes biológicos) que se dejaron en vacío a 4° C hasta realizar la inmunodetección de forma indirecta.

g) Inmunodetección indirecta

El fundamento teórico se basa en la detección de un antígeno y se realiza sobre secciones o muestras de cortes unidas a un a portaobjetos o sobre cortes en flotación. Una vez obtenidos los cortes y antes de iniciar las incubaciones con los anticuerpos se hacen diversas preincubaciones y lavados a fin de facilitar la penetración de los anticuerpos y disminuir el marcaje inespecífico. Para este método existen varios pasos a seguir:

1.- **Permeabilización del tejido;** esto es para facilitar el acceso de los anticuerpos al interior del tejido, los agentes más usados son los detergentes como el Tween 20, Tritón X-100 al 0.1-1%.

2.- **Bloqueo de uniones específicas;** este paso tiene la doble función de bloquear los radicales libres reactivos en el tejido de manera natural o introducidos como consecuencia de la fijación y saturar las uniones de los anticuerpos como proteínas. Para el bloqueo de estas uniones se utilizan soluciones de BSA (0.1-0.3%), gelatina (0.1-0.2%) ó suero preinmune (1-10%), que además de competir con el anticuerpo primario por los lugares inespecíficos de unión al tejido disminuye la adherencia del anticuerpo al vidrio o plástico empleado en las incubaciones sobre el porta o flotación. Además, de la adición a esta mezcla del detergente para reducir la uniones inespecíficas y permeabilizar el tejido.

3.-**Saturación de peroxidasas endógenas,** Esta se realiza bloqueando la peroxidasa endógena presente en la muestra con una solución de peróxido de hidrógeno al (0.3-3.0%) en amortiguador de fosfatos (0.1 M, pH =7.3-7.4) o de MeOH al (0.3-3.0%), de 2-10 minutos.

4.-**Incubación del anticuerpo primario,** los anticuerpos pueden ser:

- * monoclonales en cultivo.
- * anticuerpos monoclonales o policlonales purificados.
- * antisueros policlonales.

5.- **Composición del medio de incubación,** el medio de incubación del anticuerpo primario puede ser un amortiguador de fosfatos o Tris-HCl (0.1-0.15 M, a un pH de 7.0-7.6). Además de agregarle una concentración 0.9 % de NaCl ya que este último reduce

los enlaces inespecíficos producidos por fuerzas iónicas e hidrófilicas presentes en el tejido.

La inmunodetección se realizó con los cortes del testículo, que se almacenaron en el cuarto frío a -4° C. Se atemperaron y después se lavaron tres veces 10 minutos cada uno con agua destilada. Transcurrido ese tiempo se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido al 0.3% en PBS 0.1 M, 30 minutos. Al cabo de este tiempo se lavaron los cortes con PBS 0.1 M cuatro veces cada 10 minutos; después se incubó con Tween 20 al 0.1 %, 15 minutos, para volver a lavar cuatro veces con PBS 0.1 M cada 10 minutos. Al final de estos lavados se incubaron los cortes con la solución de bloqueo: BSA al 3% + gelatina al 1% + Tween al 0.05 %, 2 horas. Posteriormente a este tiempo se lavó una sola vez con PBS 0.1 M; incubándose 24 horas con el anticuerpo primario. Con una concentración 1:250 a temperatura ambiente. A las 24 horas se lavaron los cortes con PBS 0.1 M cuatro veces 10 minutos cada uno, se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado una hora a una concentración 1:600. Después se lavaron con PBS 0.1 M cuatro veces cada 10 minutos; para después agregarle el complejo ABC (Fig.8), 1 hora (este se preparó 1 hora antes, a 4° C), y después se lavó 4 veces cada 10 minutos. La presencia del anticuerpo se hizo evidente con la incubación del DAMB (diaminobenzidina tetraclorhidra preparada con PBS 0.1 M, pH 7.3-7.4) de 10-15 minutos, transcurrido este tiempo se paró la reacción con agua destilada 10 minutos. Los cortes se dejaron atemperar a temperatura ambiente y se montaron con la resina Vectashield, se observaron y se les tomó fotografías con el microscopio (Vilaró y col., 1993).

Sistema Avidina-Biotina- Peroxidasa

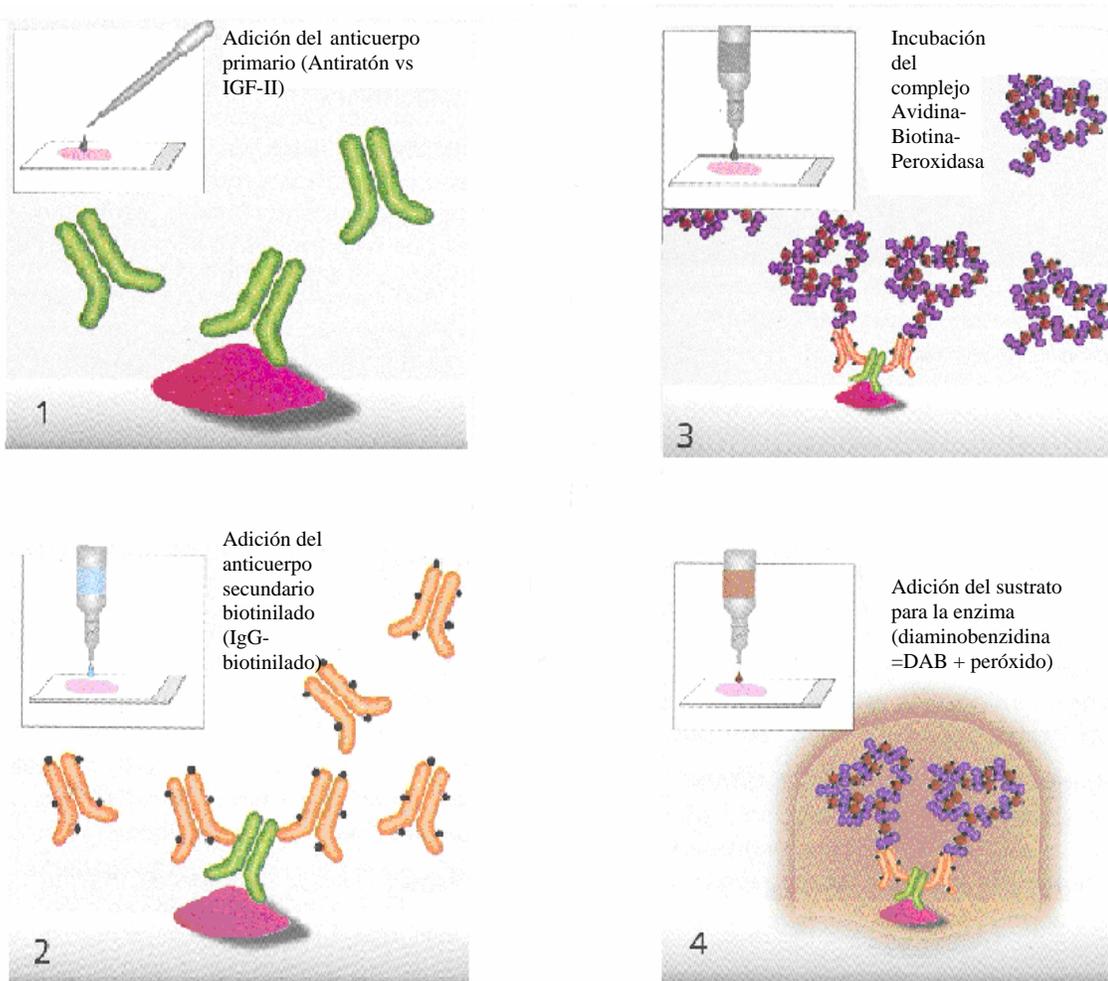
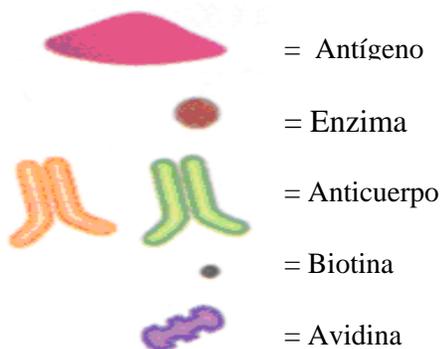


Fig 9. Se muestran los pasos más importantes de la inmunodetección indirecta del antígeno (IGF-II) en el tejido de testículo de ratón.

Esta técnica está basada en la localización de antígenos y otros marcadores presentes en tejidos histológicos. En este método se emplea un anticuerpo biotilado y una avidina: un complejo de enzima biotilada; esta técnica es llamada “ABC”. Debido a que la avidina es altamente afín a la biotina, por lo que al formar un ligando entre estas dos proteínas es irreversible; debido a que la avidina tiene cuatro sitios para la biotina y más proteínas incluyendo enzimas que pueden conjugarse con moléculas de biotina. Este complejo es estable por más de cuatro horas, y para ser localizado el antígeno se adiciona una solución peróxido de hidrógeno al 0.3 % siendo este el sustrato para la enzima, donde también interviene un cromógeno como la diaminobenzidina tetraclorhidrica (DAB). En esta reacción el agua oxigenada actúa como un sustrato enzimático y el DAB es el donante de electrones. Como resultado el DAB se oxida y forma un precipitado coloreado marrón e insoluble (Durfort y col., 1991).

i) Para la etapa de crecimiento (14 d.g), se utilizaron testículos de ratón de esta edad y se le realizó la inmunodetección directa.

ii) En la etapa fetal (16 d.g), la detección del IGF-II en testículos de 16 d.g. se realizó de manera directa.

iii) En la última etapa de 18 d.g (etapa perinatal), la inmunodetección se realizó también de forma directa para observar mejor la reacción del IGF-II.

h) Cultivo Celular y Neutralización del IGF-II

Se aislaron 40 testículos de 18 d.g. en medio de cultivo DULBECO suplementado con 2 % de glucosa. Posteriormente los testículos se transfirieron en un tubo Eppendorff y se lavaron con 500 mL de PBS 0.1 M, pH 7.3-7.4, sin calcio y magnesio. Se lavó tres veces con EDTA 0.1 mM, y se agregó una solución de tripsina al 0.1 %, se agitó 10



minutos, 90 rpm a 37 ° C. El tejido se disgregó con una pipeta Pasteur siliconizada y se le agregó un inhibidor de tripsina al 0.2 % y las muestras se centrifugaron a 2000 rpm; se decantó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió con 500 µL de medio de cultivo suplementado con bicarbonato de sodio al 7.5%, L-glutamina 2mM penicilina, Sodio con sulfato de estreptomicina 1000 U/µg mL, piruvato de sodio 11 µ/mL y amortiguador de HEPES 250 mM (Villalpando y col., 2003).

Posteriormente se determinó la viabilidad celular y el conteo de células del cultivo. Se tomaron 10 µL de la muestra y se colocaron en un tubo Eppendorf, se le adicionó 10µL de azul de tripano al 0.9 %. Se contaron el número de células vivas en los cuatro cuadrantes de la cámara de New Bauer; y el número de células se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Número de células / mL} = \sum \text{ de No. de células } / (4 \times 2500 \times FD)$$

Donde:

4 = Al numero de cuadrantes

2500 = a una constante

FD = al factor de dilución utilizado

Se sembraron 150 mL de células por caja de cultivo y se le adicionaron un medio de cultivo DULBECO. Las células se dejaron incubando toda la noche con 5 % de CO₂, con 100 ng de anti IGF-II a 37 ° C. El medio de cultivo se transfirió a otro tubo y se congeló a -20 ° C para analizar el contenido de testosterona.

i) Extracción de esteroides

Se tomaron 100 µl del cultivo celular y se le adicionó ese volumen a tres tubos los cuales se marcaron uno como control y los otros dos como experimentales (IGF-II). Se



les adicionó una primera mezcla de metanol-cloroformo (9:1), y después se preparó otra mezcla para extraer mejor a los esteroides con una mezcla metanol-cloroformo-éter (7:3:1), con esta última mezcla se obtuvo una mejor recuperación, ya que con el éter se extraen mejor los esteroides. Se agitó vigorosamente en un vortex para observar mejor la separación de la fase acuosa de la fase orgánica; de la cual se separó mejor la fase orgánica, para después volver a extraer de la fase acuosa los esteroides. Posteriormente se evaporó la mezcla de disolventes en un baño María a una temperatura de 50°C. Esto se realizó 3 veces con cada mezcla de disolventes (Villalpando, 2001).

a) Se agregó éter etílico a la muestra en una proporción 1:10 (1mL de la muestra y 9mL de éter) y se agitó durante 3 minutos. En una cuba de hielo (hielo seco + etanol absoluto) se colocó la muestra dentro de este baño a una temperatura de 60° C. Posteriormente se decantó la fase orgánica en otro tubo y se evaporó el disolvente, para después concentrar los esteroides con lavados de 200 µL cinco veces.

Los esteroides concentrados se resuspendieron en 100 µL de PBS 0.1 M. Posteriormente se realizó la cuantificación de esteroides por métodos enzimáticos.

j) Cuantificación de esteroides por métodos enzimáticos

Cuantificación de testosterona por métodos inmunoenzimáticos (EIA)

Las técnicas inmunoenzimáticas forman parte de aquellas reacciones serológicas que utilizan conjugados para poder visualizar la reacción antígeno-anticuerpo. Estas se basan en el uso de anticuerpos marcados con una enzima (generalmente la peroxidasa), de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno ó

anticuerpo) insolubilizados sobre la placa, la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmobilizada y por tanto, podrán fácilmente ser revelada mediante la adición del sustrato, que al actuar sobre la enzima, producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante un colorímetro.

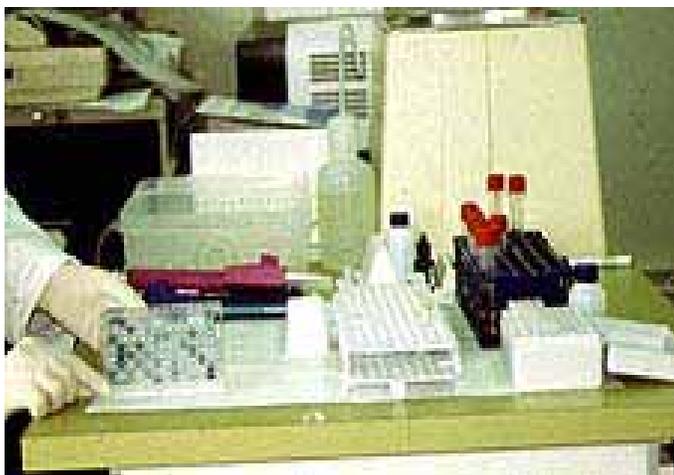


Fig. 10. Los métodos inmunoenzimáticos son técnicas altamente sensibles y de gran especificidad, que permite realizar en un corto espacio de tiempo estudios sobre grandes poblaciones, de manera sencilla y económica. Esta técnica presenta además una buena reproducibilidad y facilidad en la interpretación de los resultados.

Se marcaron las celdas del estuche del método enzimático, y se atemperaron a 25°C aproximadamente y se mezclaron los reactivos, se tomaron $50\ \mu\text{L}$ de los estándares, controles y las muestras; Se preparó una solución de un conjugado enzimático, de esta se tomaron $100\ \mu\text{L}$ y se agregó a cada pozo. Posteriormente se adicionó $100\ \mu\text{L}$ el anticuerpo antitestosterona y se cubrieron de la luz con papel aluminio y se agitó a una velocidad de $500\text{-}700\ \text{rpm}$ a temperatura ambiente, una hora. Transcurrido este tiempo se vertió el contenido de las soluciones en la tarja, y se quitó el exceso en papel adsorbente y se lavó con solución de lavado; este paso se realizó cinco veces. Después se agregaron $100\ \mu\text{L}$ de la solución reveladora (TMB solución cromógena a cada pozo),

se pusieron a agitar de 500-700 rpm, a temperatura ambiente (25° C aprox.), 30 minutos en oscuridad.

Pasado este tiempo se agregó 100 μL de la solución de paro (stopping solution 0.2 M H_2SO_4) a cada pozo y se leyó la absorbancia en un intervalo de 450nm - 650 nm durante un minuto (Villalpando, 2001).



Fig. 11. Se tomaron 50 μL de los estándares, controles y las muestras; Se preparó una solución de un conjugado enzimático, de esta se tomaron 100 μL y se agregó a cada pozo.



VI. Resultados

1) Viabilidad celular

Las células aisladas del testículo crecieron normalmente como se puede apreciar en la siguiente figura:

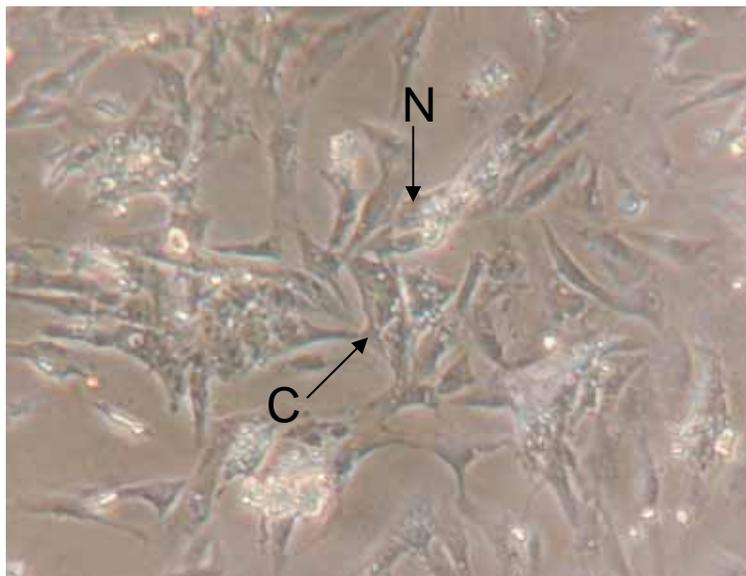


Fig. 5. Cultivo celular de testículos disgregados de embrión de ratón de 16 d.g. Se muestran las células de Leydig con su respectivo núcleo (N) y su citoplasma (C), 40X.

2) Análisis de la expresión del IGF-II durante el desarrollo fetal

a) 14 d.g. Etapa de crecimiento

Los resultados obtenidos hasta ahora mostraron que a los 14 d.g. la expresión del IGF-II es muy débil (datos no mostrados). Sin embargo, la expresión de la proteína de este factor se incrementa a los 16 d.g. en la zona periférica del testículo en el área que corresponde a la túnica albugínea. Así como, en la membrana de las células reproductoras conocidas como espermatogonias dentro de los cordones testiculares.

También se encontraron células positivas al IGF-II en el intersticio correspondiente a las células de Leydig, (Fig. 2).

b) 16 d.g. Etapa fetal

En el control a los 16 d.g. (Fig. 1), en el cual se omitió el anticuerpo primario no se encontró ninguna inmunoreactividad al IGF-II en las células. A esta edad se observó una mayor inmunoreactividad al IGF-II en el corte tratado, en la cual podemos observar la túnica albugínea, el mesénquima, los cordones testiculares, así como las células de Leydig, (Fig. 2)

c) 18 d.g. Etapa perinatal

En el grupo control no se observó la presencia del IGF-II (Fig. 3). En esta última etapa el grupo experimental mostró una mayor inmunoreactividad de la proteína del IGF-II. Las regiones testiculares en las que se detectó fueron: células de Sertoli, espermatogonias y los cordones testiculares, (Fig. 4).

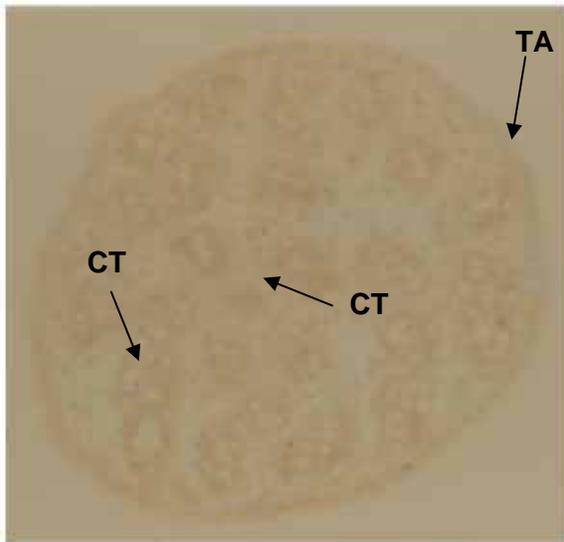


Fig.1. Expresión del IGF-II en el testículo a los 16 d.g. Se observa un corte de testículo transversal del grupo control en el que se aprecian los cordones testiculares (CT) y la túnica albugínea (TA). No se observó inmunoreactividad del IGF-II. 10X.

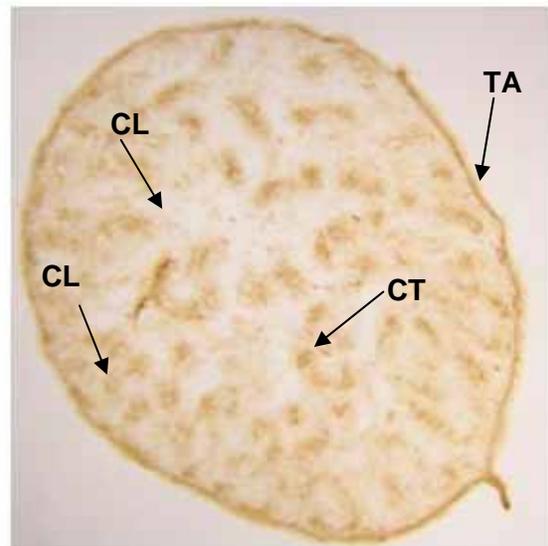


Fig.2 Expresión del IGF-II en el testículo a los 16 d.g., Se aprecia la inmunoreactividad en la túnica albugínea (TA), los cordones testiculares (CT), y las células de Leydig (CL) 10X

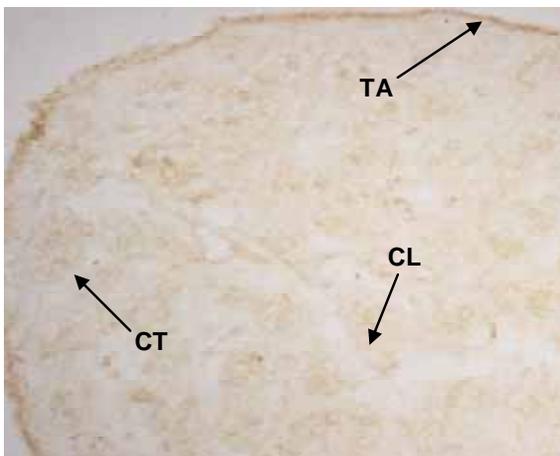


Fig 3. Corte de testículo del grupo control. Se muestra los cordones testiculares (CT), la túnica albugínea (TA) y la célula de Leydig. Se muestra la ausencia de la inmunoreactividad del IGF-II. 20X

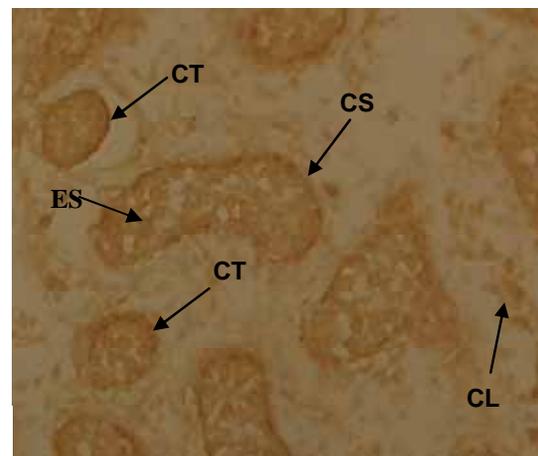


Fig 4. Expresión del IGF-II a los 18 d.g. Se aprecia la inmunoreactividad del IGF-II en las células de Sertoli (CS), las espermatogonias (ES), las Células de Leydig (CL) y los cordones testiculares (CT), 40X

3) Inhibición endógena del IGF-II en células testiculares

Del cultivo celular de las células de Leydig que se obtuvieron se le realizaron extracciones para determinar la cantidad existente de testosterona, la cuantificación se realizó por medio de una prueba inmunoenzimática y con los resultados obtenidos se interpolaron en una curva estándar con concentraciones de testosterona conocida (Fig 6).

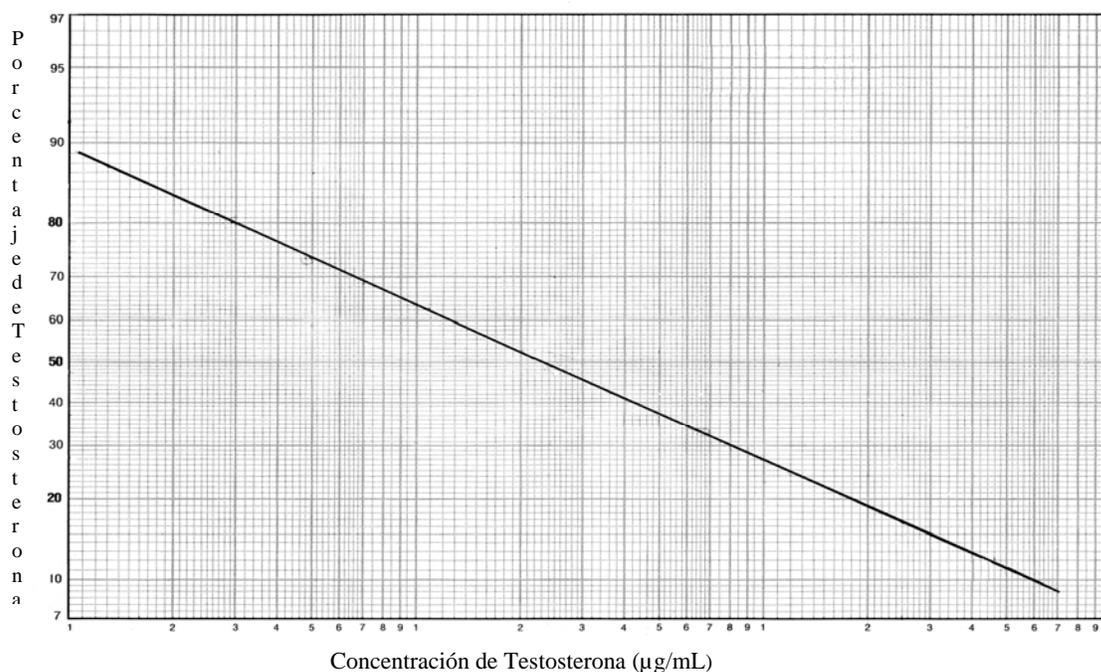


Fig. 6. Curva estándar en la cual se extrapolaron los datos que se obtuvieron de la cuantificación de esteroides del tejido.

4) Cuantificación de testosterona en células de Leydig en la etapa perinatal

La determinación de testosterona obtenida en el grupo control fue menor a 0.1 ng/mL. Mientras que en el grupo experimental en las primeras extracciones se observó una inhibición del crecimiento de las celulares testiculares debido a que se vió afectada por la inhibición del IGF-II endógeno.



Estos experimentos se resumen por los resultados que se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Valores de Testosterona

Número de experimento	Concentración del control (ng/mL)	Concentración del experimental (ngmL)
1	8.0	1.6
2	3.5	1.65
3	0.1	0.22

Como se observa en la tabla 1, los experimentos 2 y 3 demuestran una inhibición de la producción de testosterona comparadas con su control respectivo; pero en el último experimento la disminución se muestra en el control con respecto a la muestra experimental, lo cuál se pudo deber al método de extracción.

Con estos resultados no se puede realizar una prueba estadística contemplada como la “ t “ de Student, debido a que hay una variación muy grande en los valores obtenidos de los tres experimentos y no es suficiente para determinar que realmente el IGF-II afecta la producción de testosterona.

No se realizaron otros experimentos por el tiempo y la falta de recursos para comprar otro estuche de testosterona; por lo que se tendría que realizar otros experimentos más para comprobar que realmente la testosterona se ve inhibida por el IGF-II.

VII. Discusión

En la presente tesis se describe la expresión proteica del IGF-II así como la regulación de la producción de testosterona por este factor durante el desarrollo testicular.

Observamos que la proteína del IGF-II se expresa poco en las etapas iniciales de crecimiento y diferenciación de las células de Leydig a los 14 d.g. y en la etapa fetal a los 16 d.g. Sin embargo, el RNAm se expresa desde los 12 d.g. en cantidades moderadas en el testículo de ratón (Castillo-Cobian, 2000, Franco-Ramírez, 2006). De tal manera que el desfazamiento entre la expresión proteica y la del RNAm, se podría deber a que la mayor parte del IGF-II producido se vierte al torrente sanguíneo aunque nosotros no logramos detectar la proteína a los 12 d.g. Existen datos que plantean que el IGF-II producido en algunos tejidos es poco porque la mayoría es vertido a la circulación sanguínea. Las concentraciones más altas de este factor se encontraron en el fluido amniótico a una concentración de 100 ng/ L (Rotwein y Hall, 1990). Esto explicaría parcialmente la baja expresión de la proteína en el testículo. La única posibilidad de ver una diferencia cuantitativa en la expresión del IGF-II en el testículo sería a través de una inmunoprecipitación pero no se sabría el tipo celular que expresa este factor. Otra posible razón de la baja detección proteica del IGF-II podría ocurrir por un proceso de regulación postraduccional y/o regulada por otros factores (Hill y col, 1995).

La presencia del IGF-II en las células de Sertoli plantea que este factor de crecimiento podría regular la función de este tipo de célula debido a que produce diferentes tipos de proteínas transportadoras como la AMH, proteína transportadora de andrógenos entre muchas otras (Revisado por Villalpando, 2001).

La máxima expresión del IGF-II se observó a los 18 d.g. esto se debe probablemente a que en esta etapa, el IGF- II predomina sobre el IGF-I. Estudios realizados durante el desarrollo testicular del ratón demuestran que el RNAm y la proteína del IGF-I se expresan mucho comparado con el RNAm del IGF-II y su proteína, detectado a lo largo del testículo embrionario en el presente estudio (Villalpando-López-Olmos, 2003)

Los hallazgos de la presente investigación están en desacuerdo con los datos publicados por (Rotwein y col. 1987), en los cuales se describe que la expresión proteica del IGF-II es muy alta en los tejidos embrionarios. Aunque en esa descripción no se había incluido en el testículo embrionario (Lee y col., 1990). Es probable también que una de las limitaciones al abordar el estudio de una proteína sea debida a la metodología empleada con la técnica inmunocitoquímica, la cual se analiza la expresión del IGF-II en un corte de tejido con un grosor de 14 μm ; mientras que en el análisis del gen del IGF-II se emplearon 4 testículos completos (Castillo-Cobian, 1999, Franco-Ramírez, 2006). La expresión de la proteína del IGF-II en el testículo de ratón es consistente con la observación de que el gen del IGF-II se expresa en la etapa embrionaria en las gónadas masculinas y en ovarios XY (Lizárraga-Sánchez, 1997) y en la cepa C 57BL6J (Castillo-Cobian, 2000).

Los experimentos de regulación de la producción de testosterona en las células testiculares disgregadas demostraron que el IGF-II a los 18 d.g. interviene en la secreción de esta hormona, pero no se tiene un resultado final que demuestre en realidad la cantidad de testosterona que se inhibe por el IGF-II, debido a que probablemente se necesite una cantidad mayor de células disgregadas (1×10^6) para tener una mayor cuantificación de esta hormona. Previos estudios realizados en el testículo y ovario

adulto apoyan esta observación. Estos hallazgos son congruentes con el estudio inmunocitoquímico en el cual detectamos que las células de Leydig fetales expresan el IGF-II, lo cual plantea que también en la etapa embrionaria este factor regula la secreción de andrógenos, aunque el mecanismo debe ser aún establecido. Los resultados del presente estudio refutan observaciones previas donde se propone que el IGF-II al interactuar con el receptor tipo II induce la degradación de proteínas y de este factor. La homología que tienen el IGF-II con el IGF-I, posiblemente le permitiría activar la expresión del RNAm y enzimas que están relacionadas con la producción de testosterona y androstendiona (Dell y col., 1997). Aunque es posible que haya una vía alternativa para inducir la expresión de enzimas relacionadas con la biosíntesis de esteroides gonadales.

Se sabe que el IGF-II actúa a través de un receptor manosa-6-fosfato; que es diferente al receptor del IGF-I el cual se sabe que es un receptor tetramérico con un dominio extracelular y otro intracelular que posee actividad de tirosina cinasa (Bondy y col., 1990). Se ha visto que el receptor tipo II tiene cierta afinidad por el tipo I lo cual conduciría a la activación y/o expresión de genes involucrados en la regulación de hormonas esteroides sexuales. Investigaciones recientes demostraron que los transcritos del IGF-II son regulados negativamente en la gónada masculina por la insulina (Franco-Ramírez, 2006, datos sin publicar). Esto indica que aunque haya especificidad por un tipo de receptor es suficiente una interacción débil para desencadenar una respuesta.

En conclusión, la presencia del IGF-II en la célula de Sertoli y de Leydig plantea que este factor podría regular de forma autocrina y paracrina la función testicular. Sin embargo, habría que determinar que tipo celular expresa el receptor manosa-6-fosfato en el testículo de ratón.



VIII. Conclusiones

- La proteína del IGF-II a los 14 d.g. (etapa de crecimiento) y en la etapa fetal a los 16 d.g. se expresa poco.

- La máxima expresión del IGF-II se observó a los 18 d.g., esto se debe probablemente a que en esta etapa, el IGF- II predomina sobre el IGF-I.

- El IGF-II a los 18 d.g. sería un promotor de la secreción de testosterona en la función testicular.



IX. Bibliografía

- 1.- Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A, 1993, Role insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth, *Cell Biol*, 75(1):73-82.
- 2.- Brice A, Cheetheam, Bolton V.N, Hill N.C, 1989, Temporal changes in the expression of the insulin-like growth factor II gene associated with tissue maturation in the human fetus, *Development*, 543-554.
- 3.- Bondy CA, Wener G, Roberts C.T, LeRoith D, 1990, Cellular pattern of insulin like growth factor-I (IGF-I) and type IGF-I receptor gene expression in early organogenesis: comparasion with IGF-I gene expression, *Mol Endocrinol*, 4:1386-1398.
- 4.- Capel B, Rasberry C, Bishop CE, Simpson E, Vivian N, Lovell-Badge R, Rastan s, Cattanach BM, 1993, Deletion of Y chromosome sequences located outside the testis determining region can cause XY female sex reversal, *Nat Genet*, 5(3), 310-301.
- 5.- 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.
- 6.- Dechiara T, Efstratiadis A, and Robertson E, 1990, A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting, *Nature*, Vol. 345, 78-80.
- 7.- Dell G, Ward A, Ångstrom W, 1997, Regulation of a promoter from the Mouse insulin like growth factor II gene by glucocorticoids, *FEBS Lett*, 419(2-3):161-165.
- 8- D'Ercole AJ, Ye P, Calikoglu AS, Gutierrez Ospina G, 1996, The role of the insulin-like growth factors en the central nervous system, *Mol Neurobiol*, 13 (3): 227-255.



- 9.- D'Ercole AJ, Insulin-like growth factors and their receptors in growth, 1996, *Endocrinol Metab Clin North Am*, 25(3): 573-590.
- 10.- Dull Thomas J, Gray Alane, Hayflick Joel S, Ullrich Axel, 1984, Insulin-like growth factor II precursor gene organization in relation to insulin gene family, *Nature*, 777-7781.
- 11.- Durfort M, Vilaró,S. Renau,J y Serratosa,J., 1991, Técnicas de Inmunocitoquímica en Microscopía, Electrónica. Ed. Publicaciones de la Universidad de Barcelona.
- 12.- Eggenschwiler J, Ludwig T, Fisher O, Philip A, Leigton, Shirley M, Tilghman, Efstratiadis Argiris, 1997, Mouse mutant embryois overexpressing IGF-II exhibit phenotypic features of the Beckwith-Wiedemann and Simpson- Golabi- Behmel syndromes, *Genes and Dev*, 3128-3142.
- 13.- Ekstrom TJ, 1994, Parental imprinting and the IGF2 gene, *Horm Res*, 42 (4-5):17-81.
- 14.- Franco C. E, Ramírez M., 2006, Estudio ontogénético de la expression del RNAmensajero del factor de crecimiento similar a insulina tipo II (IGF-II) y el efecto de la insulina en su expresión, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- 15.- Froesch ER, Schmid CH, Schwander J, Zapf J. 1995, Actions of insulin-like growth Factors, *Ann Rev Physiol*, 47:443-67.
- 16.- Gangj V., Rydzziel S., Gabbitas B., Canalis E., 1998, Insuli-like growth factor II promoter expression in cultured rodent osteoblasts and adult rat bone, *Endocrinology*, 139: 2287-2292.
- 17.- Gilbert Scott F, Biología del Desarrollo, 7ª ed. Editorial Médica Panamericana 2005.



- 18.- Gordon J, Allan, Flint David J, Ketan Patel, 2001, Insulin-like growth factor axis during embryonic development, *Reproduction*, 31-39.
- 19.- 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.
- 20.- Hammond JM, Mondschein JS, Samaras SE, Canning SF, 1991, The ovarian insulin-like growth factors, a local amplification mechanism for steroidogenesis and hormone action, *Steroid Biochem Mol Biol*, 40: 411-6.
- 21.- Harvey MB, Kave PL, 1992, IGF-2 stimulates growth and metabolism of early mouse embryos, *Mech Dev*, 38 (3): 169-73.
- 22.- He L, Cui H, Walsh C, Matsson R, Lin W, Anneren G, Pfeifer-Ohlsson, Ohlsson R, 1998, Hypervariable allelic expression patterns of the imprinted IGF2 gene in tumor cells, *Oncogene*, 16(1): 113-9.
- 23.- Heyner S, Shi CZ, Garside WT, Smith RM, 1993, Functions of the IGFs in early mammalian development, *Mol Reprod Dev*, 35(4): 421-5.
- 24.- Hill DJ, Petrik J, Arany E, 1998, Growth factors and regulation of fetal growth, *Diabetes Care*, Suppl 2: B60-9.
- 25.- Hu JF, Vu TH, Hoffman AR, 1996, Promoter-specific modulation of insulin-like growth factor II genomic imprinting by inhibitors of DNA methylation, *J Biol Chem*, 271: 18253-62.
- 26.- Jones JI, Clemmons DR, 1995, Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions, *Endocr Rev*, 16(1):3-25.

- 27.- Jubiz W, Endocrinología Clínica, 3a, ed., Manual Moderno, México, 1996, pp.,13.
- 28.- Koike S, Noumura I, 1995, Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-II in the perinatla rat gonad, *Growth Regulation*, 185-189.
- 29.- Koopman P., Münstenberg A., Capel B., Vivian N., Lovell- Badge, 1990, Expresión of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation, *Nature*, 348: 450-452
- 30.- Lamharzi N, Schally AV, Koppan M, Groot K, 1998, Growth hormone-releasing hormone antagonist MZ-5-156 inhibits growth of DU-145 human androgen-independent prostate carcinoma in nude mice suppresses the levels and mRNA expression of insulin-like growth factor II in tumors, *Proc Natl Acad*, 95 (15): 8864-8.
- 31.- Langman, Embriología Médica con orientación clínica, 9ª Ed, Editorial Médica Panamericana, Madrid, 2004.
- 32.- Lee J, Pintar J, Efstratiadis Argiris, 1990, Patter of the insulin-like growth factor II gene expression during early mouse embryogenesis, *Development*, 151-159.
- 33.- LeRoith D, Kavsan VM, Koval AP, Roberts CT Jr, 1993, Phylogeny of the insulin-like growth factors (IGFs) and receptors: a molecular approach, *Mol Reprod Dev*, 337-338.
- 34.- Lizárraga Sánchez F., 1997, Expression 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.-Louvi A, Accili D, Efstratiadis A, 1997, Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development, *Dev Biol*, 189 (19):33-48.

- 36.- McDonald R.G., Pfeffer S.R., Cossens 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.
- 37.- McElreavey K, Barbaux S, Ion A, Fellous M, 1995, The genetic basis of murine and human sex determination: a review, *Heredity*, 599-611.
- 38.- McLaren A., 1991, Development of the mammalian gonad: the fate of the supporting cell lineage, *Bioessays*, 13:151-156.
- 39.- Mc Laughlin KJ, Kochanowski H, Solter D, Schwarzkopf G, Szabo PE, Mann JR, 1997, Roles of the imprinted gene *Igf2* and paternal duplication of distal chromosome 7 in the perinatal abnormalities of androgenetic mouse chimeras, *Development*, 124: 4897-904.
- 40.- Marron-Terada PG, Brzycki-Wessell MA, Dahms NM, 1998, the two mannose 6-phosphato binding sites of the insulin-like growth factor-II/ manosa 6-phosphato receptor display different ligand binding properties, *J Biol Chem*, 273(35):22358-66.
- 41.- Merchant-Larios H, Embriología Médica El sexo gonadal, Memorias del congreso conmemorativo del jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Tomo I, UNAM, 451-460.
- 42.- Messiano S.Y, Jaffet R.B., 1993, Interaction of insulin-Like growth factor-II and estradiol directs stereidogenesis in the humans fetal adrenal toward dehydroepiandroestrone sulfato production, *J Clin Endrocrinol Metab*, 77:754-758.
- 43.- Minniti CP, Lua D, O' Grady C, Rosenfeld RG, Oh Y, Herman LJ, 1995, Insulin-like growth factor II overexpression in myoblasts induces phenotypic changes typical of the mailgnant phenotype, *Cell Growth Differ*, 6: 263-9.



- 44.- Moore T, Constancia M, Zubair M, BAilleul B, Fiel R, Ssaki H, Reik W, 1997, Multiple imprinted sense and antisense transcripts, differential methylation and tandem repeats in a putative imprinting control region upstream of mouse *Igf2*, *Proc Natl Acad Sci*, 94: 12509-14.
- 45.- Morgan D, Edman J, Standring A, Fried V, Smith M, Roth R, Rutter, 1987, Insulin-Like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein, *Nature*, Vol, 329, 301-307.
- 46.- Nishimoto I, 1993, The IGF-II Receptor system: A G Protein-Linked Mechanism, *Mol Reprod Dev*, 35:398-406.
- 47.- Nissley P, Wieland K, Sklar M, 1993, Developmental Expression of the IGF-II/Mannose 6-Phosphate Receptor, *Mol Reprod Dev* 35:408-413.
- 48.- Nykjaer a, Cristensen EL, Forum H, Hager H, 1998, Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor targets the urokinase receptor to lysosomes via a novel binding interaction, *J Cell Biol*, 141(3):815-28.
- 49.- Norman Anthony W, Litwack, Hormones, Segunda edición, Academia Press, 1997, San Diego, California, USA, pag. 57-60,345-347.
- 50.- Noshita LD, Wathen NC, Dsupin BA, Chard T, Giudice, 1994, Insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins (IGFBPs), and proteolyzed IGFBP-3 in embryonic cavities in early human pregnancy; their potential relevance to maternal-embryonic and fetal interactions, *J Clin Endocrinolol Metab*, 79(5), 1249-1255.
- 51.- O'Dell SD, Day IN, 1998, Insulin-like growth factor II (IGF-II), *Int J Biochem & Cell Biol* 30():776-71.

- 52.- O'Dell Sandra, 1998, Molecules in focus Insulin- like growth factor II (IGF-II), *Biochem Cell Biol*, 767-771.
- 53.- Ogawa O, Eccles MR, Szeto J, McNoe LA, Yun K, Maw MA, Smith PJ, Reeve AE, 1993, Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour, *Nature*, 362: 749-51.
- 54.- Ohlsson R, Nystrom A, Pfeifer-Ohlsson S, Tohone V, Hedborg F, Schofield P, Flam F, Ekstrom Tj, 1993, IGF2 is parentally imprinted during human embryogenesis and in the Beckwith-Wiedemann syndrome, *Nat Gene*, 4(1): 94-7.
- 55.- Otte K, Chodhury D, Charalabous M, Engstrom W, Rozell B, 1998, A conserved structural element in horse and mouse IGF2 genes binds a methylation sensitive factor, *Nucleics Acid Res*, 26 (7):1605-12.
- 56.- Pardo A. y Castillo S., 2002, nuevos conceptos genéticos en la diferenciación sexual humana, *Rev, Hospital Clínico Universidad de Chile*, Vol.13, No.2, 134-138.
- 57.- Rao LV, Wikarczuk ML, Heyner S, 1990, Functional roles of insulin and insulin like growth factors in preimplantation mouse embryo development, *In vitro Cell Dev Biol.*, 26(11):1043-8.
- 58.- Rappolee DA, Sturm KS, Behrendtsen O, Schultz GA, Pedersen RA, Werb Z, 1992, Insulin-like growth factor II acts through an endogenous growth pathway regulated by imprinting in early mouse embryos, *Genes Dev*, 6(6): 939-52.
- 59- Rechier MM, Nissley SP, The nature and regulation of de receptors for insulin-like growth factors, *Ann Rev Physiol*, 1985; 47; 425-42.
- 60.- Regueiro, J., López, C, 1997, *Inmunología. Biología y Patología del sistema inmune*. 2ª ed. Editorial Médica Panamericana, Cap. 14.



- 61.- Reik W, Maher ER, 1997, Imprinting in cluster: lessons from Beckwith-Wiedeman syndrome, *Trends Gene*, 13:330-4.
- 62.- Rey R, 2001, Diferenciación sexual-fetal: de las moléculas a la anatomía, *Rev. Chil. Ana.* V.19, No.1, Temuco.
- 63.- Rietveld LE, Holthhuizen PE, Sussenbach JS, 1997, Identification of a key regulatory element for the basal activity of the human insulin-like growth factor II gene promoter P3, *Bichem J*, 327:689-97.
- 64.- Rinderknecht E, Humbel RE, 1978, Primary structure of human insulin-like growth actor II, *FEBS Let*, 89(2):283-286.
- 65.- Roth R, 1988, Structure of the receptor for Insuli-Like Growth Factor II: The Puzzle Amplified, *Biochem Biophysics* 1249-1271.
- 66.- 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.
- 67.- 67.- Sekido R, 2004, SOX9 is up-regulated by the transient expresión of SRY specifically in sertoli cell precursor, *Dev Biol*, 15; 274(2): 271-9.
- 68.- Soares MB, Turken A, Ishii D, Mills L, Episkopou V, Cotter S, Zeitlin S, Efstratiadis A, 1986, Rat insulin like growth factor II gene, A single gene with two promoters expressing a multitranscrpit family, *J Mol Biol*, 192 (4):737-52.
- 69.- Sun FL, Dean WL, Kelsey G, Allen ND, Reik W, 1997, Transactivation of Igf2 in a mouse model of Beckwith-Wiedemann syndrome, *Nature*, 389:809-15.



70.- Steenman MJ, Rainier S, Dobry CJ, Grundy P, Horon II, Feinberg AP, 1994, Loss of imprinting of IGF2 is linked to reduced expression and abnormal methylation of H19 in Wilms' tumour, *Nat Gene*, 7:433-9.

71.- Sussenbach JS, 1989, The gene structure of the insulin-like growth factor family, *Prog Growth Factor Res*, 1(1): 33-48.

72.- Stempien Michell M, Fong Noel M, Rall Lesli B, Bell Graeme I, Sequence of a placental cDNA encoding the mouse insulin-like growth factor II precursor, *DNA*, 3537-361.

73.- Swain A, Zanaria E, Hacker A, Lovell-Badge R, Camerino G, 1996, Mouse Dax1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function, *Nat Genet*, 12(4):404-9.

74.- Van Buul-Offers Sc, Kooijman R, 1998, The role of growth hormone and insulin-like factors in the system immune, *Cell Mol Life S*, 54 (10):1083-94.

75.- Vilaró, S. Soriano, E. Técnicas de Inmunocitoquímica. Unidad de Biología Celular, 1993, Departamento de Bioquímica y Fisiología, Universidad de Barcelona.

76.- 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. 121-123.

77.- Villalpando I, López V, 2003, Insulin-Like growth factor I (IGF-I) regulates endocrine activity of the embryonic testis in the mouse, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 86:151-159.

78.- Villar AJ, Eddy EM, Pedersen R, 1995, Developmental regulation of genomic imprinting during gametogenesis, *Dev Biol*, 172: 264-71.



79.- Werner H, Adamo M, Roberts CT, Leroith D, 199, Molecular and cellular aspects of insulin-like growth factor action, *Vitam Horm*, .4(8):1-39.

80.- Zaina S, Newton RV, Paul MR, Graham CF, 1998, Local reduction of organ size in transgenic mice expressing a soluble insulin-like growth factor II/mannose-6-phosphate receptor, *Endocrinology*, 139:3886-95.

81.- Zapf J, Froesch ER, 1986, Insulin-like growth factors/somatomedins: structure, secretion, biological actions and physiological role, *Horm Res*, 24:121-30.





X. Apéndice**Solución PBS 0.1 M**

Se utilizaron las sales de fosfato de sodio monobásica y dibásica para tener una concentración 0.1 M, en las siguientes proporciones:

Solución A (Fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$))

Sol. A(g) = (137.99g/mol) (0.1L) (0.2 mol/L) = 2.2598g

Sol. B (g) = 141.968g/mol) (0.1L) (0.2 mol/L) = 2.8392g

Se pesaron de cada una de las sales y se llevaron a un volumen de 0.1 L, después se tomaron:

19 mL de la sol. A + 81 mL de la sol. B, con una concentración 0.2 M y pH de 7.3.

Después se tomaron 50 mL de esta solución y se llevó a un volumen de 100 ml con agua destilada para obtener una concentración 0.1 M, después se le agregó 0.9 % de NaCl para obtener una solución fisiológica para el tejido que se utilizó.

Fijador (p- formaldehído 4 %)

Para esta solución, se pesaron 4 g de p- formaldehído de LAB. SIGMA. , y se disolvió en PBS 0.1M a 60 °C. Se agregó de 4 - 6 gotas de NaOH (1 M) para alcanzar un pH de 7.2-7.4, esto debido a que el p-formaldeído (CH_2O)_n se descompone produciendo formaldehído (HCHO) que reacciona con oxidantes, ácidos y bases fuertes. Produciéndose una solución blanquecina que después desapareció con agitación produciéndose una solución transparente. Se filtró con papel filtro y se llevó a un volumen de 100 mL y se enfrió en hielo en escarcha, Se empleó la solución fría a 4°C. Esta solución se puede almacenar durante 24 hrs a 4°C.



Solución de sacarosa

Se pesaron 30 g de sacarosa, se disolvió en agua destilada y se llevó a un volumen de 100 ml con agua.

Preparación de laminillas con TEZPA

Se colocaron las laminillas en alcohol ácido y se lavaron con las siguientes soluciones: HCl 2 N (5 min.), Mili Q (5 min.), acetona (5 min.) , Tezpa 2% / acetona (10 min.). EtOH al 95% (1 min.), 50% (1 min.) y 30% (1 min.). Y por último se lavaron tres veces cada una con agua mili Q.

Tezpa SIGMA

(3-aminopropil)tritoxi-silano, min. 98%), corrosivo, 3-tritoxisililpropilamina, [919-30-2]

$C_9H_{23}NO_3Si$, Fw 221.4, Densidad = 0.95 g/mL.

Formas derivadas de vidrio aminopropil, adsorbente por afinidad a cromatografía.



a.a.= Aminoácidos
ABC = Complejo Avidina- Biotina-Peroxidasa
ACTH = Hormona adrenocorticoide
AMH = Hormona inhibidora de los conductos de Müller
BSA = Albumina sérica de bovino
cgps = Células germinales primordiales
CHCl₃ = Cloroformo
DAB = Diaminobenzidina tetraclorhidra
DAX-1 / Dax-1 = Gen antagónico al Sry
d.g. = Días de gestación
DHT = 5-alfa- dihidrotestosterona
EDTA = Ácido etilendiamino tetraacético
FGF = Factores de crecimiento fibroblásticos
FGF-2 = Factor de crecimiento fibroblástico tipo 2
GH = Hormona de crecimiento
HCl = Ácido clorhídrico
Hrs = Horas
H₂SO₄ = Ácido sulfúrico
IGF-I = Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I
IGF-II = Factor de crecimiento similar a la insulina tipo II
IGFBPs = Proteína secretadas que modulan las acciones de los IGF's
HMG = High Mobility Group
Kb = kilobases
KDa = Kilodaltons
L = Litros
M = Número de moles de soluto en un litro de solución
μ = micras
μL = Microlitros
mL = Mililitros
mM = milimolar



μm = Micrometros

MIS = Hormona inhibidora de los conductos de Müller

MeoH = Metanol

NaCl = Cloruro de sódio

nm = Nanometros

pb = Pares de bases

PBS = Solución amortiguadora de fosfatos

pH = Logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno

rpm = Revoluciones por minuto

SF-1 = Factor esteroideogénico-1

Sry = Gen que participa en la diferenciación testicular en el ratón

SRY = Gen que participa en la diferenciación testicular en el humano

TFM = Tissue freezing medium

WT1/ Wt1 = Tumor Infantil de Wills

XR = Receptor adicional que participa en el crecimiento



