



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

Regulación de la proliferación de las células de Leydig del testículo embrionario del ratón *Mus musculus* por el Factor de Crecimiento similar a la Insulina tipo 1 (IGF-1), por el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) y por ambos.

TESIS

Que para obtener el título de

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

Presenta

Belén Abigail González Miranda



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	Homero Hernández Montes
Vocal	Arturo Victor Rosales Olivares
Secretario	María Irma Villalpando Fierro
1er Suplente	Eleazar Martínez Barajas
2º Suplente	José Pedraza Chaverri

Sitio donde se desarrollo el tema:

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Depto. de Fisiología y Biología Celular, UNAM.

Asesor: Dra. María Irma Villalpando Fierro \_\_\_\_\_

Sustentante: Belén Abigail González Miranda \_\_\_\_\_

**“Levanten los ojos a la alto y vean.**

**¿Quién ha creado éstas cosas?**

**Es aquel que saca el ejército de ellas aún por número,**

**todas las cuáles él llama aún por nombre.**

**Debido a la abundancia de energía dinámica,**

**porque él también es vigoroso en poder ninguna de ellas falta.”**

**(Isaías 40:26)**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Irma Villalpando por haberme permitido trabajar en su laboratorio y por toda su ayuda en la realización de este proyecto.

A la M. en C. Esmeralda Lira por su gran colaboración y apoyo en cada uno de los experimentos realizados, sin los cuáles hubiera sido muy difícil la culminación de mi tesis.

A mis compañeros del laboratorio de Embriología Molecular por su compañía y solidaridad en mi estancia por el Instituto.

A la Facultad de Química y a la Universidad por el gran privilegio de pertenecer a ellas y ser orgullosamente “hecha en CU”. Gracias por toda su contribución en mi desarrollo personal y profesional.

## DEDICATORIAS

No hay manera de poner a personas más merecedoras de encabezar ésta lista que a mis padres... Josafat y Jorge. Gracias por todo lo que han hecho por mí durante cada día de mi vida. Los amo y admiro en gran manera por la espiritualidad, honradez, bondad y esfuerzo que han inculcado en mí. No me cabe en el corazón el agradecimiento y no me hacen justicia las palabras para expresar el gran cariño y orgullo que siento por ustedes.

A mi hermana consentida, Vane, por su amor y cariño. Nunca olvides que te amo y quiero que a lo largo de nuestras vidas siempre estemos juntas. Por los grandes momentos que hemos pasado y que espero sigamos compartiendo.

A mis amigos y hermanos en la fe: Marisol, Berenice, Emmanuel, Lalo y Joaquín. Porque la distancia no daña al amor.

A Salomón, por hacer mi vida aún más alegre con tu presencia. Por el apoyo, amistad y amor que me brindas tienes un capítulo especial en mi historia.

Y finalmente a todos mis amigos y compañeros de la Facultad, con los cuáles compartí grandes momentos que me llevaré en la mente como un grato recuerdo de mi Universidad.

---

---

# ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>Resumen</b>	<b>9</b>
<b>II.</b>	<b>Introducción</b>	
1.	Organización histológica del ovario y del testículo	11
a)	Cresta genital	11
b)	Gónada indiferenciada	14
c)	Diferenciación sexual	14
(i)	Organización de los cordones sexuales	14
(ii)	Componente intersticial (Célula de Leydig)	15
2.	Genes que regulan la diferenciación sexual masculina	16
a)	Gen determinante de la masculinidad <i>Sry</i>	16
b)	Genes autosomales	17
3.	Características del Factor de Crecimiento similar a la Insulina	21
a)	Organización del gen del factor de crecimiento similar a la insulina	21
b)	Aspectos estructurales de la proteína	22
c)	Expresión en tejido testicular	22
d)	Receptor del IGF-1	22
e)	Proteínas de unión del Factor de Crecimiento similar a la Insulina IGFBPs	23
f)	Cascada de señales del IGF-1	24
4.	Características del Factor de Crecimiento Epidermal EGF	25
a)	Aspectos estructurales de la proteína	

---

---

---

---

b)	Organización del gen del EGF	27
c)	Expresión en tejidos y acciones del EGF	27
d)	Receptor del EGF	28
e)	Cascada de señales del EGF	30
5.	Biosíntesis de esteroides gonadales	30
a)	Andrógenos	31
b)	Testosterona	32
<b>III.</b>	<b>Planteamiento del problema</b>	34
<b>IV.</b>	<b>Hipótesis</b>	34
<b>V.</b>	<b>Objetivos</b>	35
<b>VI.</b>	<b>Material y Métodos</b>	36
<b>VII.</b>	<b>Resultados</b>	40
<b>VIII.</b>	<b>Discusión</b>	51
<b>IX.</b>	<b>Conclusiones</b>	55
<b>X.</b>	<b>Bibliografía</b>	56
<b>XI.</b>	<b>Apéndice</b>	60

---

---



## I. RESUMEN

La diferenciación sexual testicular es determinada por el gen determinante de la diferenciación conocido como *Sry*. Este gen induce la expresión de factores de crecimiento localmente producidos en el testículo embrionario que se expresa en etapas muy tempranas como el Factor de Crecimiento similar a la Insulina tipo 1 (IGF-1) el cuál regula la síntesis de esteroides gonadales en el testículo embrionario y postnatal. Sin embargo, uno de los aspectos menos estudiados del IGF-1 es su papel en la proliferación de las células somáticas testiculares (Leydig y Sertoli) en la etapa embrionaria. El objetivo de la presente tesis fue determinar el efecto del Factor de Crecimiento similar a la Insulina tipo 1 (IGF-1), del Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) y de la combinación ambos en la proliferación de la célula de Leydig embrionaria de ratón. Se aislaron los testículos de 14, 16 y 18 días de gestación, se disgregaron, se sembraron  $3 \times 10^4$  células, se incubaron por separado con Bromodeoxiuridina (BrdU) y se les adicionó a un grupo 100 ng/mL del Factor de Crecimiento similar a la Insulina tipo 1 (IGF-I), al segundo 100 ng/mL del Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) y al tercero la combinación de ambos factores a 37°C, 24 horas y 5% de CO<sub>2</sub>, utilizando para cada experimento un grupo control. Se fijaron las células, se realizó una inmunodetección con un anticuerpo anti-BrdU y otro anticuerpo anti-mouse acoplado a Fluoresceína. Posteriormente se realizó la toma de fotografías con un microscopio de fluorescencia. Se identificaron las células marcadas con Bromodeoxiuridina (BrdU) y se realizó el conteo total en cada campo. Se graficaron los resultados del grupo control contra el grupo

experimental, así como todos los grupos de cada edad. Los resultados obtenidos demostraron que el Factor de Crecimiento similar a la Insulina tipo 1 (IGF-1) es un inductor de la proliferación de la célula de Leydig. De igual forma el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) es un inductor pero ejerce efectos menores al IGF-1. La combinación de los factores IGF-1/EGF ejerce efectos intermedios en todas las edades estudiadas. Los hallazgos del presente trabajo, plantean que el IGF-I y el EGF son promotores de la proliferación de las células somáticas de Leydig del testículo embrionario.

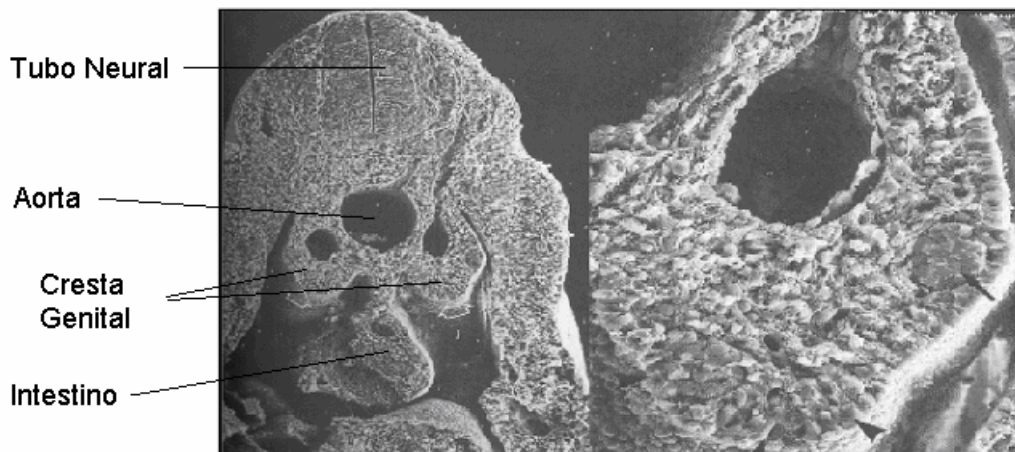
## II. INTRODUCCIÓN

El sexo de los embriones de los mamíferos es determinado en el momento de la fecundación, dependiendo si el espermatozoide contenga un cromosoma X o un cromosoma Y. Sin embargo, transcurren varias semanas durante la embriogénesis sin que existan diferencias evidentes entre un feto de sexo femenino y uno de sexo masculino (Rey, 2001). El desarrollo testicular embrionario ocurre en tres etapas o fases importantes: cresta genital, gónada indiferenciada y determinación sexual. Las dos primeras fases son comunes en las hembras y en los machos; en la última la gónada indiferenciada se desarrolla de acuerdo al sexo genético que se estableció en la fertilización (Villalpando, 2001).

### 1. Desarrollo embrionario testicular

#### a) Cresta genital

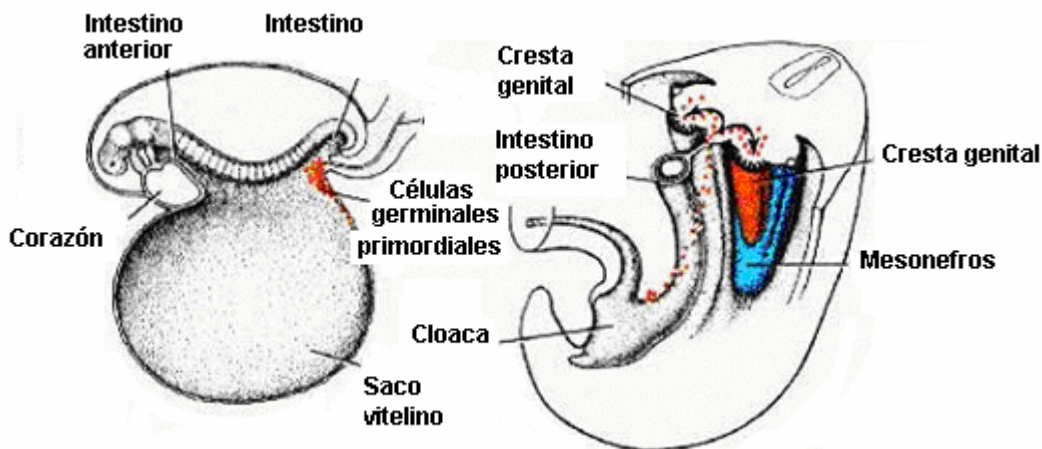
Los aparatos urinario y genital se desarrollan a partir de los gononefrotomos, estructuras pares que se forman en el mesodermo intermedio, a ambos lados de la línea media. Del gononefrotomo, sólo el mesonefros interviene en el desarrollo de estructuras del sistema genital. El mesodermo, recubierto por el epitelio celómico, sufre una evaginación en la cavidad celómica del embrión formando las crestas urogenitales, que posteriormente se dividen en crestas gonadales, medialmente, y crestas urinarias, lateralmente (Rey, 2001). Fig. 1.



**Fig. 1. Microfotografía electrónica de barrido de un embrión de ratón, donde se puede ver la cresta genital. Tomada de Sadler, 1993.**

La diferenciación sexual se inicia con la formación de la cresta genital. Este primordio gonadal está inicialmente constituido por una capa de células del epitelio celómico, -llamado así por su orientación hacia el celoma (cavidad del cuerpo embrionario que alberga el aparato digestivo y reproductor)-, por células germinales primordiales (CGPs) precursoras de los ovocitos y los espermatozoides, además de las células mesenquimáticas y endoteliales (Villalpando, 2001). Además de las células somáticas, las crestas genitales se forman por las células germinales de origen extragonadal quienes se ubican por primera vez en el endodermo del saco vitelino a los 7 días de gestación y se desplazan por medio de dos tipos de movimientos: pasivo y activo. En el primero las células germinales primordiales (CGPs) se mueven con los tejidos que las rodean y que se desplazan de un lugar a otro por crecimiento diferencial del embrión. El movimiento activo implica la capacidad motriz de las células germinales primordiales (CGPs) para desplazarse a través de los tejidos embrionarios. Para salir del intestino las células germinales primordiales (CGPs) deben atravesar la lámina basal que la recubre, para ello las células germinales

primordiales (CGPs) requieren un movimiento activo que se manifiesta por la emisión de pseudópodos y producción de enzimas proteolíticas capaces de romper la lámina basal del intestino y después continuar su camino hacia las futuras crestas genitales a través de las células mesenquimáticas (Fig. 2) (Merchant, 1993). Conforme las células germinales se aproximan a las crestas genitales pueden ser influenciadas por factores quimiotácticos segregados por las gónadas recién formadas (Carlson, 2004).



**Fig. 2.** Las células germinales primordiales, que se forman en la pared del saco vitelino, cerca de la alantoides, migran a través del mesenterio dorsal hasta la cresta genital. Tomada de Sandler y Lagmann, *Embriología Médica*, 1990.

La etapa de la cresta genital comprende de los 9.5 a los 10.5 días de gestación en ratones de tal forma que la proliferación de cada uno de los tipos celulares mencionados da origen a los cordones sexuales que caracterizan a la gónada indiferenciada (Villalpando, 2001).

### **b) Gónada indiferenciada**

Cuando aparecen las crestas genitales, tanto las de los machos como las hembras son indistinguibles desde el punto de vista morfológico (etapa indiferenciada). Esta

etapa se observa en el ratón a los 11 y 11.5 días de gestación en las diferentes especies de roedores estudiados, aunque puede haber variación (Villalpando, 2001). En primer lugar se detecta una proliferación de todas las células somáticas en la región de la cresta genital. Se observa entonces una condensación de células de origen mesotelial y mesenquimático fundamentalmente, que conduce gradualmente a la formación del blastema gonadal. A partir de este primordio embrionario se diferencian dos importantes tejidos gonadales: cordones sexuales y estroma. Los primeros son arreglos epiteliales envueltos por una lámina basal y formados por células íntimamente asociadas a través de diversos tipos de uniones intercelulares. En estos cordones se encuentra la mayoría de las células germinales primordiales (CGPs). Por otro lado, en el estroma se encuentran células de tipo mesenquimático y vasos sanguíneos que irrigan la gónada indiferenciada. Durante esta etapa inicial algunos túbulos del mesónefros vecino mantienen estrecha asociación con la gónada (Merchant, 1993).

### **c) Diferenciación sexual**

#### **(i) Organización de los cordones sexuales**

La diferenciación sexual testicular en los ratones ocurre entre los 12 y 13.5 días de gestación dependiendo de la especie por la presencia del gen *Sry* que se expresa desde los 10.5 días de gestación y se caracteriza por la separación gradual de los cordones sexuales del epitelio celómico por invasión de vasos sanguíneos y células mesenquimáticas, así como por la relocalización de dichos cordones en la parte central del futuro testículo. Debido al rearreglo topográfico celular de éstos en la zona central del testículo, los cordones sexuales son llamados ahora cordones seminíferos.

En su interior los cordones sexuales contienen a las células germinales primordiales (CGPs), que se diferenciarán de proespermatogonias a espermatozoides y a las células somáticas endoteliales que se diferenciarán de presertoli a células de Sertoli (Villalpando, 2001).

En la etapa adulta cada túbulo seminífero está rodeado por una membrana basal y por células musculares lisas o mioideas. El perímetro del túbulo está recubierto por las células de Sertoli, de forma irregular y alargada que se extienden desde la membrana basal hasta la luz del túbulo seminífero. Los complejos de unión forman la barrera hematotesticular que limita el transporte de líquido y de macromoléculas desde el espacio intersticial hasta la luz del túbulo. La célula de Sertoli sufre mitosis activa durante la vida fetal embrionaria (Rhoades, 1996).

#### **(ii) Componente intersticial (Célula de Leydig)**

La célula de Leydig se diferencia a partir de las células mesenquimatosas de los pliegues genitales, probablemente como respuesta a la expresión de la proteína Sry por las células pre-Sertoli (Larsen, 2003). Su morfología muestra células poliédricas y grandes agrupadas cerca de los vasos sanguíneos del intersticio presente entre los túbulos seminíferos. Se caracteriza por tener una gran cantidad de mitocondrias, un retículo endoplásmico liso bien desarrollado, grandes gotas de grasa (ésteres de colesterol), complejos de Golgi pequeños y muy pocos gránulos secretores. Debido a que los esteroides son liposolubles y no son almacenados, la célula de Leydig no necesita la función empaquetadora del Golgi o la capacidad de almacenar gránulos (Rhoades, 1996). Durante las primeras etapas de la gestación la célula de Leydig presenta una alta actividad de esteroidogénesis que es obligatoria para la

diferenciación de los conductos genitales masculinos. En esta etapa es prominente y muy activa (Rhoades, 1996). Tras este período la cantidad de células de Leydig disminuye y permanecen en reposo durante la infancia, aumentando en número y actividad en la pubertad (Syed, 2004). Las células de Leydig embrionarias producen principalmente testosterona. Entre la célula de Sertoli y de Leydig existen interacciones bidireccionales. Las células de Sertoli no puede producir testosterona, pero contiene receptores para testosterona. Las células de Leydig no producen demasiado estradiol pero poseen receptores para él. La testosterona difunde desde la célula de Leydig a la de Sertoli, se une a la proteína transportadora de andrógenos (ABP) y alcanza concentraciones locales muy altas. La testosterona es obligatoria para la espermatogénesis y para el adecuado funcionamiento de la célula de Sertoli. En ésta, la testosterona también actúa como precursor de la producción de estradiol (Rhoades, 1996).

## **2. Genes que regulan la diferenciación sexual masculina**

### **a) Gen determinante de la masculinidad *Sry***

El factor determinante de la diferenciación testicular, denominado *SRY/Sry* en el humano y en otras especies de vertebrados, respectivamente, esta localizado en una región llamada pseudoautosomal, situada en el brazo corto del cromosoma Y en una región de 35 kilobases en los mamíferos (Villalpando, 2001). La evidencia para que *Sry* siga siendo el factor determinante testicular viene de los ratones transgénicos (Gilbert, 2005). Este gen se encuentra presente en una sola copia en individuos masculinos. En los roedores, *Sry* se expresa a los 10.5 días de gestación, aunque los niveles más altos de expresión del *Sry* se detecta a los 12 días de gestación momento



crítico en el que ocurre la diferenciación sexual morfológica del testículo en esta especie, aunque su expresión se extiende hasta 13 días de gestación (Villalpando, 2001). *Sry* es miembro de la gran familia de factores de transcripción, conocidos como proteínas SOX, los cuáles se relacionan por su similitud a la caja HMG (Koopman, 1999). Los estudios de hibridación *in situ* en ratones han demostrado que la expresión del producto del gen *Sry* tiene lugar en el tejido gonadal en el momento de la diferenciación sexual pero no se expresa en las gónadas de los embriones hembras (Carlson, 2001).

#### **b) Genes autosomales**

Se han identificado diferentes genes que juegan un papel crítico en la determinación sexual masculina o femenina y tal vez algunos interaccionan con el gen *Sry* (Fig. 3 y 4).

#### ***Amh***

La Hormona Inhibidora de los Conductos de Müller (AMH, o también conocida como MIS por sus siglas en inglés Müllerian-inhibiting substance) causa regresión de los conductos femeninos de Müller. Es el primer producto identificado de la célula de Sertoli y aparece poco después del inicio de la expresión de *Sry*, al parecer *SOX9* y *SF1* están involucrados en su regulación. Se sabe que la AMH no es un eslabón integral en el camino de la determinación masculina como lo muestra el desarrollo de testículos normales en ratones sin AMH (Behringer R, 1994; Koopman, 1999).

#### ***SF1***

Otro gen que puede ser activado directa o indirectamente por *Sry* es el factor de transcripción *Sf1* (factor esteroideogénico 1; del inglés, *steroidogenic factor 1*) es un

componente importante en el desarrollo gonadal, además de regular la biosíntesis de esteroides masculinos (Koopman, 1999). *Sf1* es necesario para generar la gónada indiferenciada pero mientras que los niveles de *SF1* disminuyen en la cresta genital de los embriones de ratón XX, el gen *Sf1* sigue ejerciendo su acción sobre el testículo en desarrollo (Shen, 1994) En las células de Leydig el gen *Sf1* activa a los genes que codifican las enzimas que producen testosterona (Gilbert, 2005). La transcripción de *Sf1* está presente en la gónada de ambos sexos en ratones entre 9 y 12 días de gestación. *Sf1* juega tres importantes papeles en el desarrollo sexual: 1) en el establecimiento temprano de la gónada previo a la expresión de *Sry*; 2) en la diferenciación masculina regulando la *Amh* y 3) en la regulación de la síntesis de esteroides en células de Leydig en testículos de machos y de la teca en óvarios de hembras (Koopman, 1999).

### ***WT1***

El gen *WT1* inicialmente fue aislado analizando a pacientes con tumor de Wilms, un tumor de riñón embrionario producido por una proliferación anormal del blastema metanéfrico (Parker, 1999). *Wt1* juega un papel importante en la maduración de la cresta genital y en la determinación sexual, quizás por establecer un medio ambiente en el cuál *Sry* pueda actuar. Se ha sugerido que *Wt1* actúa como regulador de la expresión de *Sry* (Koopman, 1999).

### **Aromatasa**

La aromatasa es un miembro de la familia del CYP450 y es responsable de la conversión de testosterona a estradiol. Algo que es muy esencial en la determinación sexual masculina es que el gen que codifica para la aromatasa este fuertemente

reprimido durante el desarrollo testicular. Haqq et al. que refiere Koopman (1999) han sugerido que *Sry* es directamente responsable de su represión.

### Sox9

Es uno de los pocos genes, aparte de *Sry*, en los cuáles la mutación en éste ha mostrado interferir en la determinación sexual masculina (Koopman,1999). Parece ser que *Sox9* puede remplazar a *Sry* en la formación testicular. Mientras que *Sry* es hallado específicamente en mamíferos, *Sox9* es hallado en todos los vertebrados. Por lo tanto *Sry* puede actuar como un “interruptor” para activar a *Sox9* y la proteína *Sox9* iniciar la vía común para la formación testicular (Pask, 1999).

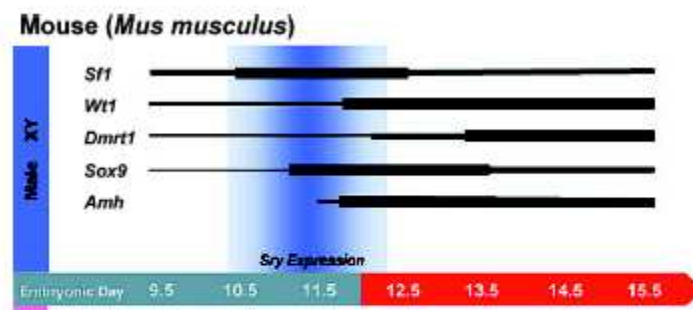


Fig. 3. Diagrama de los perfiles de expresión de los genes críticos para la determinación sexual durante la embriogénesis en ratón *Mus musculus* (Yao y Capel, 2005).

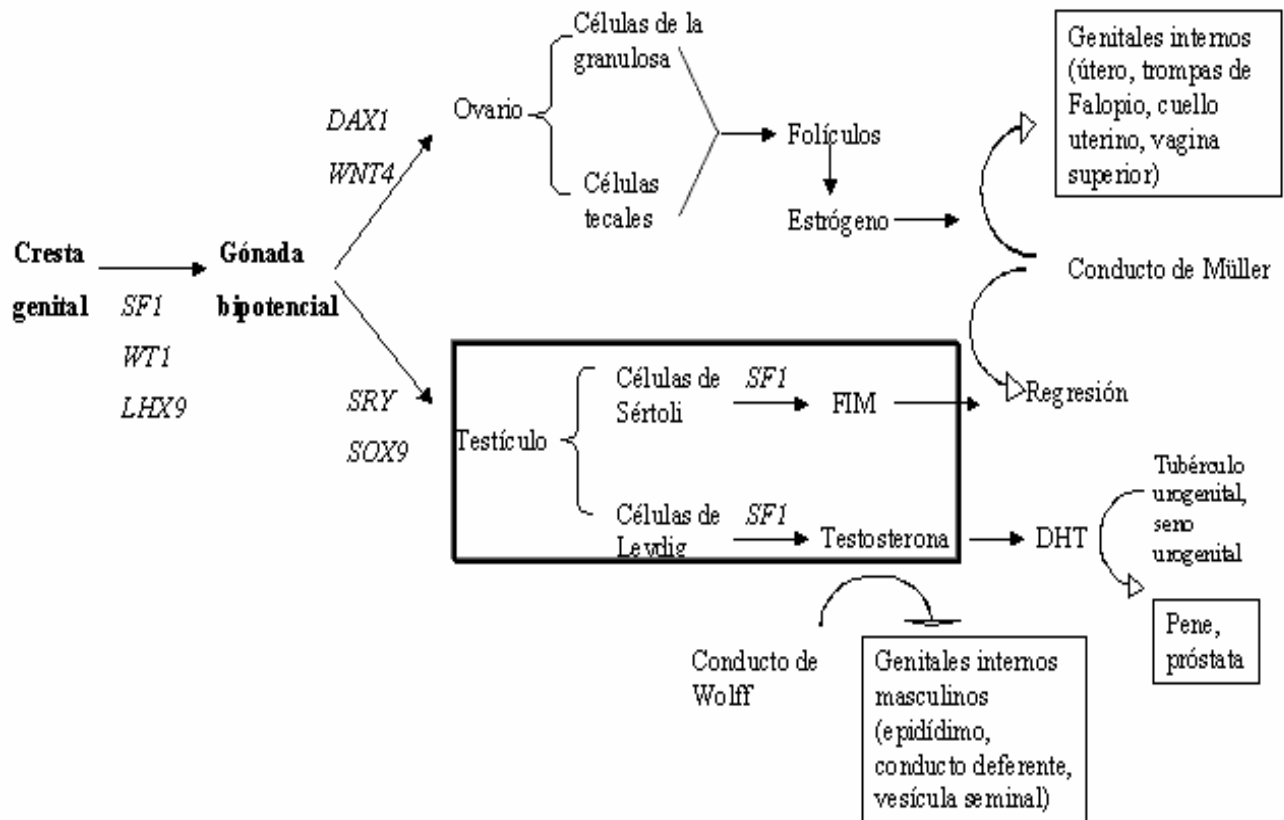


Fig. 4. Cascadas postuladas que conducen a la formación de los fenotipos sexuales en mamíferos. La parte superior corresponde a lo vía de desarrollo genital no estudiada. (Birk, 2000).

Gen	Función
<i>Sry</i>	Participa en la diferenciación del testículo
<i>Wt1</i>	Establecimiento de gónadas e hígado. Posible regulador del <i>Sry</i>
<i>Sox9</i>	Diferenciación de células de Sertoli y desarrollo del Testículo
<i>MIS</i>	Regresión de los conductos de Müller
<i>Dhh</i>	Desarrollo de células germinales
<i>Fgf9</i>	Proliferación en testículo
<i>DMrt1</i>	Mantiene a los tubos seminíferos después del nacimiento
<i>Igf1</i>	Participa en la proliferación, diferenciación y producción de esteroides

Cuadro 1. Genes que participan en el desarrollo gonadal. (Villalpando, 2001)

### **3. Características del Factor de Crecimiento similar a la Insulina**

Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I e IGF-II) son polipéptidos de cadena simple cuya estructura es homóloga a la proinsulina, los cuales pesan 7.5 kDa y se encuentran en plasma en concentración de 20-80 nM y en menor concentraciones en los demás tejidos del cuerpo (Humbel, 1990). Estos regulan la proliferación y diferenciación de múltiples tipos celulares (células musculares, fibroblastos) y son capaces de ejercer efectos metabólicos parecidos a la insulina. A diferencia de la insulina, estos son producidos por más tejidos del cuerpo (placenta, corazón, pulmón, riñón, hígado, médula ósea) y son abundantes en la circulación. Los IGFs tienen la potencia de actuar por mecanismos endocrinos, autocrinos y/o paracrinos (Cohick & Clemmons, 1993).

#### **a) Organización del gen del IGF**

Rotwein et al. (1986) reportó que el gen del IGF-1 contenía 5 exones. Los exones 1-4 codifican para un precursor de 195 aminoácidos (IGFB). Y los exones 1, 2, 3 y 5 codifican para un péptido de 153 residuos (IGFA). La estructura del IGF1 se asemeja a la del IGF2. Smith et al. (2002) reportó que el IGF1 tiene 6 exones, 4 de los cuáles son empalmados alternativamente dependiendo del tipo de tejido y hormona del medio. En el ratón el gen del IGF1 se ha ubicado en el cromosoma 10 (Justice, 1990). Dos péptidos recién sintetizados prepro-IGF-1A y 1B, de 195 y 153 aminoácidos, respectivamente están conformados por: 1) el péptido señal de longitud variable; 2) los cuatro dominios del IGF1; 3) el péptido E del extremo carboxilo terminal (Smith, 2002).

**b) Aspectos estructurales de la proteína**

El péptido del IGF1 maduro está formado por el dominio B, C, A y D, de los cuáles el dominio A y B son estructuras homólogas de la cadena de insulina A y B. El dominio C es análogo del péptido conector en la proinsulina, mientras que el dominio D no se encuentra en la insulina. La secuencia de aminoácidos de seis especies (humano, bovino, porcino, ovino, rata y ratón) han sido determinados. El IGF-I en todas estas especies está formado por 70 residuos de aminoácidos mientras que el IGF-II tiene 67 (Cohick & Clemmons, 1993).

**c) Expresión en tejido testicular**

Tanto la insulina como el IGF1 ejercen acciones metabólicas (transporte y oxidación de glucosa, lipogénesis, síntesis de glucógeno y efectos antilipolíticos) y efectos como promotores del crecimiento (Síntesis de ADN, multiplicación celular, incorporación de uridina radiactiva dentro del RNA, transporte de aminoácidos) (Rechler, 1985). Los efectos biológicos tanto de la insulina como del IGF1 se inician por interacciones específicas con receptores celulares membranales. Cada polipéptido se une con alta afinidad a su receptor y con considerable baja afinidad al receptor de su heterólogo. El receptor de la insulina y del IGF1 tienen estructuras similares con dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$ , unidas por puentes disulfuro (Zapf, 1984).

**d) Receptor del IGF-1**

La señalización del ligando IGF1 e IGF2 esta mediado por el receptor IGF tipo 1 (IGF1R), mientras que hay un segundo receptor (IGF2R) para el IGF2 (Baker, 1996). El receptor del IGF1 (IGF1R) es una molécula transmembranal con actividad de tirosina cinasa. Este se expresa en muchos tipos celulares y muestra una alta

secuencia homóloga con el receptor de insulina (Hubbard, 2000). El IGF1R es una glucoproteína tetramérica compuesta por dos subunidades  $\alpha$  de 706 aminoácidos, en donde están los sitios de unión del ligando, y dos subunidades  $\beta$  transmembranales de 627 aminoácidos (Ullrich, 1986). La subunidad  $\beta$  comprende una región yuxtamembranal, un dominio intracelular de tirosina cinasa y un dominio de carboxilo terminal que tiene como función la interacción con proteínas (Hubbard, 2000) (Fig. 5). El IGF1R se une al IGF1 con alta afinidad. La afinidad con la que se une el IGF2 y la insulina al receptor es considerablemente baja. El IGF2 se une un 20% con relación al IGF1 mientras que la insulina se une menos del 1% (Denley, 2004)

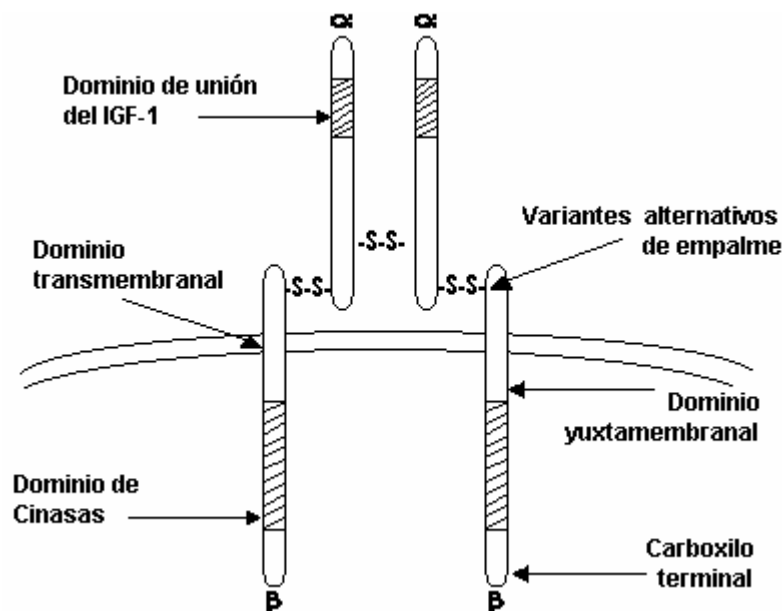


Fig. 5. Receptor del Factor de Crecimiento similar a la Insulina (IGF-1). Los dominios funcionales de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  están nombrados y se indican los enlaces disulfuro que mantienen unido al receptor tetramérico. (Stewart, 1996)

#### e) Proteínas de unión del Factor de crecimiento similar a Insulina IGFbps

La actividad fisiológica del IGF es regulada a través de la acción de las proteínas de unión a IGF (IGFBPs). La familia de IGFBP consta de 6 isoformas (IGFBPs 1-6) de

proteínas secretadas que se unen al IGF1 e IGF2 y modulan su distribución, estabilidad y acción celular (Firth, 2002). Las IGBPs varían en su longitud de 216 a 289 aminoácidos y se componen de una porción rica en residuos de cisteína y de un dominio carboxilo terminal. La parte central de cada IGFBP es única. Los genes de IGFBP tienen una estructura simple y conservada, y cada gen se transcribe y procesa dentro de uno o más mRNAs. Los genes que codifican para IGFBP-1,-2,-4,-5 y -6 contienen 4 exones, y el gen del IGFBP-3 tiene 5 exones (Bach, 1995). Las IGFBP tienen múltiples funciones que modulan la acción de IGF. Los IGFs presentes en la sangre y en otros fluidos biológicos se unen a las IGFBPs, y estas interacciones mantienen reservas de estos factores de crecimiento en la circulación y en otros tejidos (Baxter, 1993). En el testículo de ratón la IGFBP1 se expresa en el testículo de los 16 a 18 d.g. (Guerra, 2005).

#### **f) Cascada de señales del IGF-1**

Cuando se da la unión del ligando (IGF1) al sitio de unión del IGF1R el receptor sufre un cambio conformacional (cambio físico de estructura) seguido por una autofosforilación de tres residuos de tirosina dentro del dominio de cinasas (Kato, 1993). La fosforilación ocurre inicialmente en los residuos de tirosina 1131, 1135 y 1136, también se puede dar en residuos de serina y treonina. Las cascadas de señalización más estudiadas que se activan por el IGF1R son la 3-cinasa fosfatidilinositol (PI3-K)-Akt y la proteína activadora de mitógeno Ras/Raf (MAP) cinasa. Su activación resulta en la prevención de apoptosis y la estimulación de la proliferación y diferenciación celular. Además la activación del IGF1R regula la adhesión celular, la



organización del citoesqueleto y la migración a través de interacciones con moléculas de adhesión e integrinas (Navarro, 2001) (Fig. 6).

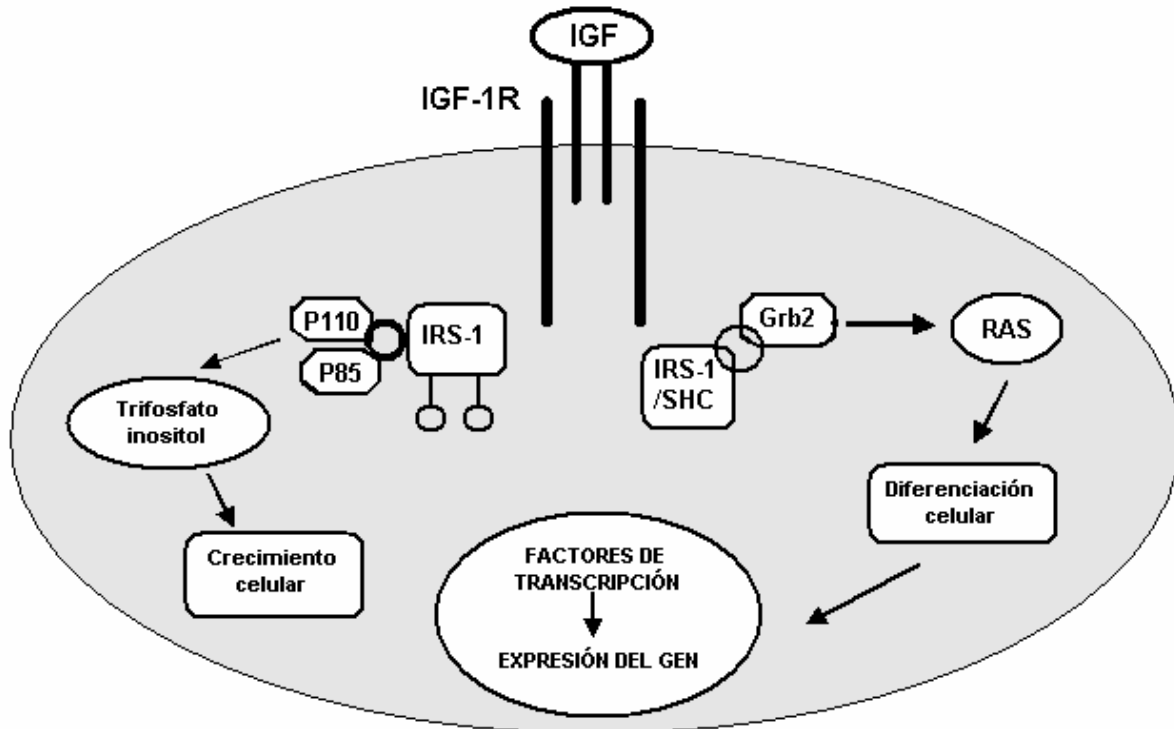


Fig. 6. Cascada de señalización vía IGF-1/IGF-1R. Modificado de Clemmons, 2003.

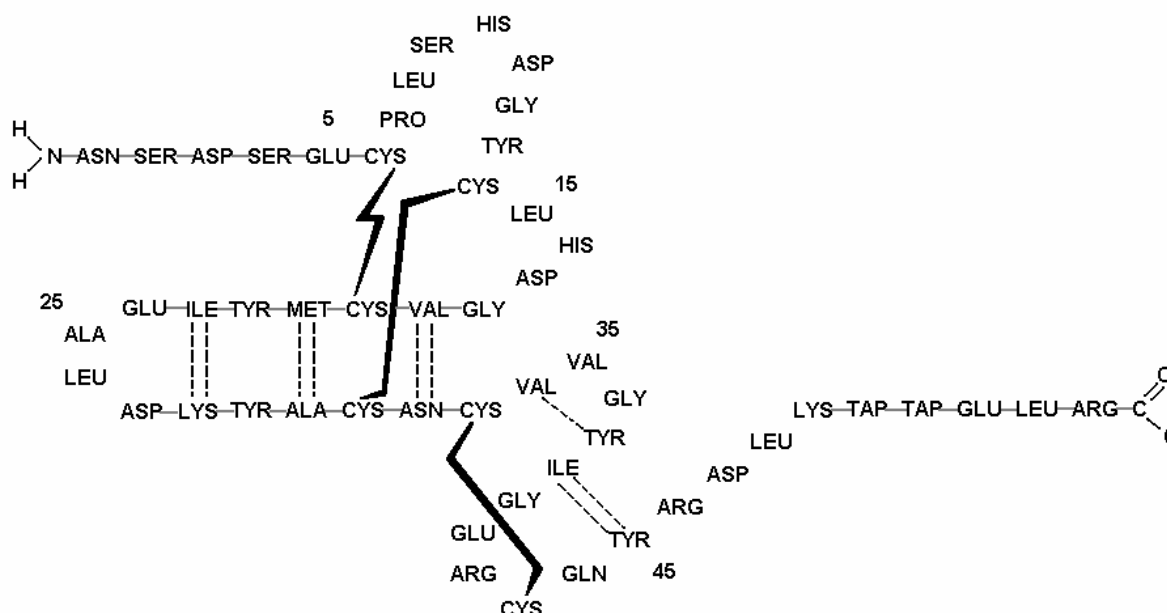
#### 4. Características del Factor de Crecimiento Epidermal EGF

Uno de los primeros factores de crecimiento polipeptídicos descubiertos es el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF). Se describió una proteína aislada de glándulas submaxilares de ratón macho que causaba que abrieran prematuramente los párpados y erupción de dientes en ratones neonatales (Boonstra, 1995). El EGF es considerado como una hormona porque circula en la sangre y puede actuar en sitios a larga distancia. Los niveles normales de EGF en suero de ratón son de aproximadamente 1 ng/mL ( $1.7 \times 10^{-10}$  M). Estos niveles están regulados por hormonas como la tiroxina y la testosterona, además, puede variar por el sexo y el

estado de desarrollo. Además de estar en la sangre, el EGF está presente en fluidos del cuerpo (orina, leche, saliva, fluido seminal) (Pimentel, 1994).

### a) Aspectos estructurales de la proteína

El EGF del ratón es un polipéptido de cadena simple de 6 kDa de peso, compuesto por 53 aminoácidos con tres enlaces disulfuro (Fig. 7).



**Fig. 7. Secuencia de aminoácidos del EGF. Se muestran los tres enlaces disulfuro en líneas sólidas. Las líneas punteadas muestran los sitios en los que es posible que ocurran enlaces de hidrógeno (Boonstra, 1995).**

El EGF del ratón y del humano son biológicamente igual de potentes. La estructura tridimensional del EGF del ratón y la rata son diferentes. Se han detectado dos formas de EGF en el ratón por cromatografía líquida.,  $\alpha$ EGF y  $\beta$ EGF y ambas formas son iguales en potencia como mitógenos (Pimentel, 1994). Los tres enlaces intramoleculares disulfuro son característicos del EGF, se relaciona con péptidos semejantes como el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  ( $TGF\alpha$ ) y son esenciales para que se realice la actividad biológica (Taylor 1972). Se ha mostrado que la arg 41

está directamente involucrado en la interacción del ligando-receptor, mientras que la tyr 37 es estructuralmente importante para la cadena pero no es esencial para la unión. Un papel importante en la unión del EGF a sido asignado a ile23. Este aminoácido está expuesto en la superficie de la proteína y se une directamente a la parte hidrofóbica del receptor. Además, tyr29 y leu47 son esenciales para la actividad biológica (Boonstra, 1995).

#### **b) Organización del gen del EGF**

El gen del EGF en murinos fue asignado en el cromosoma 3 por análisis de hibridación en células somáticas. El extremo 5' del gen del EGF fue aislado de una librería de DNAC y esta secuencia de nucleótidos fue determinada. Una comparación de la secuencia mostró regiones del gen los cuales se cree que están envueltos en la regulación de la expresión hormonal (Pimentel, 1994).

#### **c) Expresión en tejidos y acciones del EGF**

El EGF actúa como un potente estimulador de la mitosis y agente anabólico sobre una variedad de tejidos que originan del ectodermo y endodermo, y participa en el proceso de cicatrización de las heridas. Este factor puede tener un importante papel en el proceso de embriogénesis (Pimentel, 1994). Entre las actividades del EGF están la estimulación del transporte de iones, el aumento de la fosforilación de las proteínas endógenas, alteraciones en la morfología celular y estimulación de la síntesis de DNA (Soley, 1987). El EGF tiene importantes efectos sobre la producción y acción de diferentes hormonas. La síntesis de hormonas inducidas por EGF puede ocurrir por diferentes mecanismos, que pueden envolver o no la síntesis de nuevas proteínas. La acción de la hormona tiroidea en diferentes tipos de células es modulada por el EGF

(Pimentel, 1994). El EGF tiene importantes efectos en la función gonadal. Según sean las condiciones fisiológicas predominantes, el EGF puede tener efectos estimulantes o inhibitorios sobre los procesos esteroidogénicos que ocurren en cultivos frescos de células de Leydig de testículos de rata y ratón prepubertal y adulta (Verhoeven, 1986).

#### **d) Receptor del EGF**

El receptor del EGF del ratón se ubica en el cromosoma 11 (Pimentel, 1994). Éste es una glucoproteína transmembranal de aproximadamente 170 kDa (Fig. 8).

El dominio externo del receptor del EGF contiene al amino terminal de la molécula, 622 residuos de aminoácidos y 12 sitios donde puede ocurrir una N-glucosilación. Además, el dominio externo contiene dos dominios ricos en Cisteína. El dominio de unión del EGF al receptor se ha identificado entre los dominios ricos en cisteínas (Carpenter, 1986). El receptor del EGF contiene un dominio hidrofóbico de 23 residuos de aminoácidos, los cuáles cruzan la membrana. El dominio interno del receptor esta compuesto por 542 residuos de aminoácidos, éste contiene una región de aproximadamente 300 aminoácidos que es homóloga al dominio catalítico de la proteína cinasa codificada por el gen *src* de la familia de oncogenes. Así que el receptor EGF pertenece a la clase de receptores de tirosinacinas (Boonstra, 1995).

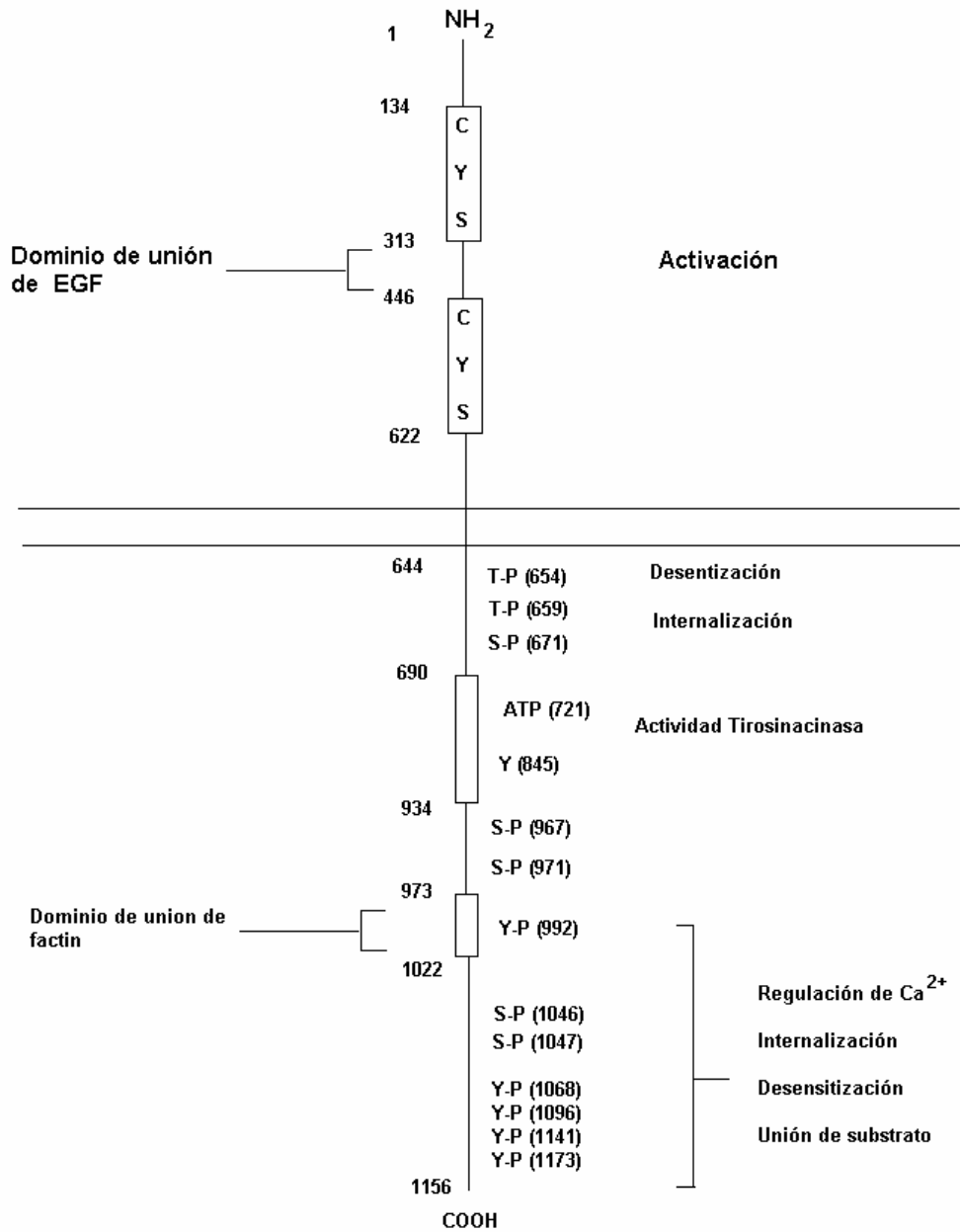


Fig. 8. Representación lineal de la estructura primaria del receptor del EGF (Boonstra, 1995).

### **e) Cascada de señales del EGF**

La señalización transmembranal del receptor del EGF depende de la actividad intrínseca de tirosinacinas del receptor. Sin embargo, los mecanismos moleculares envueltos en la transmisión de señales del EGF a través de la membrana son pobremente entendidos. Dos modelos pueden ser considerados en la transducción de señales: un modelo intramolecular y uno intermolecular (Yarden, 1987). El modelo intramolecular asume que la unión del EGF al receptor induce un cambio conformacional en el dominio extracelular del receptor, lo cuál se transmite de alguna manera a través de la región transmembranal al dominio cinasa y como consecuencia activarlo. En el modelo intermolecular se asume que la interacción receptor-receptor la cuál es mediada por la unión del EGF conduce a la activación del receptor cinasa. En este tipo de mecanismo bifásico para que un cambio de conformación sea transmitido a través de la región hidrofóbica, conectando los dos dominios funcionales (el extracelular y el citoplasmático). Haciendo pruebas de la predicción de cada modelo en un sistema *in vitro* compuesto de un detergente que solubiliza al receptor del EGF se obtuvieron resultados que son mas compatibles con el modelo intermolecular que con el intramolecular, para la activación del receptor del EGF (Yarden, 1987).

### **5. Biosíntesis de los esteroides gonadales.**

Los principales tejidos encargados de la síntesis de esteroides son la corteza adrenal, ovarios y testículos. También durante la preñez, la placenta puede servir como un reservorio de estrógenos y otras hormonas. Seis enzimas P450 (Cuadro 2) son asociadas con la producción de hormonas esteroideas, que a su vez depende de una

---

---

estimulación específica por parte de la célula de origen (Norman, 1997).

### **a) Andrógenos**

Los andrógenos son todos aquellos esteroides que induce la diferenciación y maduración del órgano reproductor masculino, el desarrollo de las características sexuales secundarias y las manifestaciones conductuales en el papel masculino de la reproducción. Son producidos por machos en los testículos, y por hembras en los ovarios y placenta. Presentan el mismo anillo de esterano, al igual que los demás esteroides, pero se caracterizan por la presencia de 19 carbonos en su estructura y por la ausencia de una cadena de dos carbonos sobre el carbono 17 y la presencia de un oxígeno funcional sobre el carbono 3 y 17. Se conocen dos rutas metabólicas generales para la síntesis de andrógenos, que van desde la pregnenolona hasta la testosterona, las vías  $\Delta^5$  y  $\Delta^4$ . Esteroides intermediarios de la vía-  $\Delta^5$  pueden ser convertidos al correspondiente esteroide de la vía- $\Delta^4$  por oxidación del  $3\beta$ -hidroxil a cetona por la  $3\beta$ -esteroide dehidrogenasa, seguido por la migración de un doble enlace del  $C_{5-6}$  al  $C_{4-5}$  por la  $\Delta^5, \Delta^4$  –isomerasa (Norman, 1997). El colesterol es el sustrato de la síntesis de todas las hormonas esteroides, éste es transportado de los depósitos celulares al interior de la membrana mitocondrial por una proteína cinasa A. Se sabe de dos proteínas transportadoras envueltas en el transporte del colesterol hacia la membrana mitocondrial: la proteína reguladora aguda esteroideogénica (StAR) y el receptor periférico tipo benzodiazepina (PBR). Existe una dinámica de interacción proteína-proteína entre estas dos proteínas y la proteína cinasa A para el adecuado transporte del colesterol, sin embargo el mecanismo por el cual se lleva acabo aun no se sabe (Haider, 2004).

## b) Testosterona

Los dos andrógenos más importantes son la testosterona y la 5 $\alpha$  dihidrotestosterona, por lo que su biosíntesis sigue las dos rutas anteriormente mencionadas. En roedores la vía  $\Delta^4$  es la que predomina. Esta hormona es necesaria para el funcionamiento normal de las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales, así como para la aparición y conservación de las características sexuales secundarias masculinas. La molécula es metabolizada en el hígado en dos compuestos 17-ceto, androtestosterona y eticolanolona, los cuales son conjugadas a su respectivo ácido glucorónico o sulfato, que son solubles en agua y excretados en orina (Norman, 1997).

La forma hormonalmente activa de la testosterona en machos es la 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (5 $\alpha$ -DTH). Existen evidencias de la producción de 5 $\alpha$ -DTH por testículos, piel y glándulas submaxiliares, pero es formada especialmente en blancos glandulares como la próstata. La enzima responsable para la conversión de testosterona a dihidrotestosterona es un ana  $\Delta^3$ -cetosteroides-5 $\alpha$ -oxidoreductasa que requiere NADPH como cofactor (Norman, 1997).

Reacción	Nombre de la enzima	Localización subcelular
1	Desmolasa	Mitocondria
2	3 $\beta$ -Esteroides deshidrogenasa/ $\Delta^5$ , $\Delta^4$ -isomerasa	Retículo Endoplásmico
3	17 $\alpha$ -Hidroxilasa	Retículo Endoplásmico
4	C-17 – C-20 Liasa	Retículo Endoplásmico
5	17-cetosteroides reductasa	Retículo Endoplásmico
6	5 $\alpha$ -Reductasa	Membrana Nuclear

**Cuadro 2. Enzimas participantes en la biosíntesis de la testosterona (Norman A, 1997).**



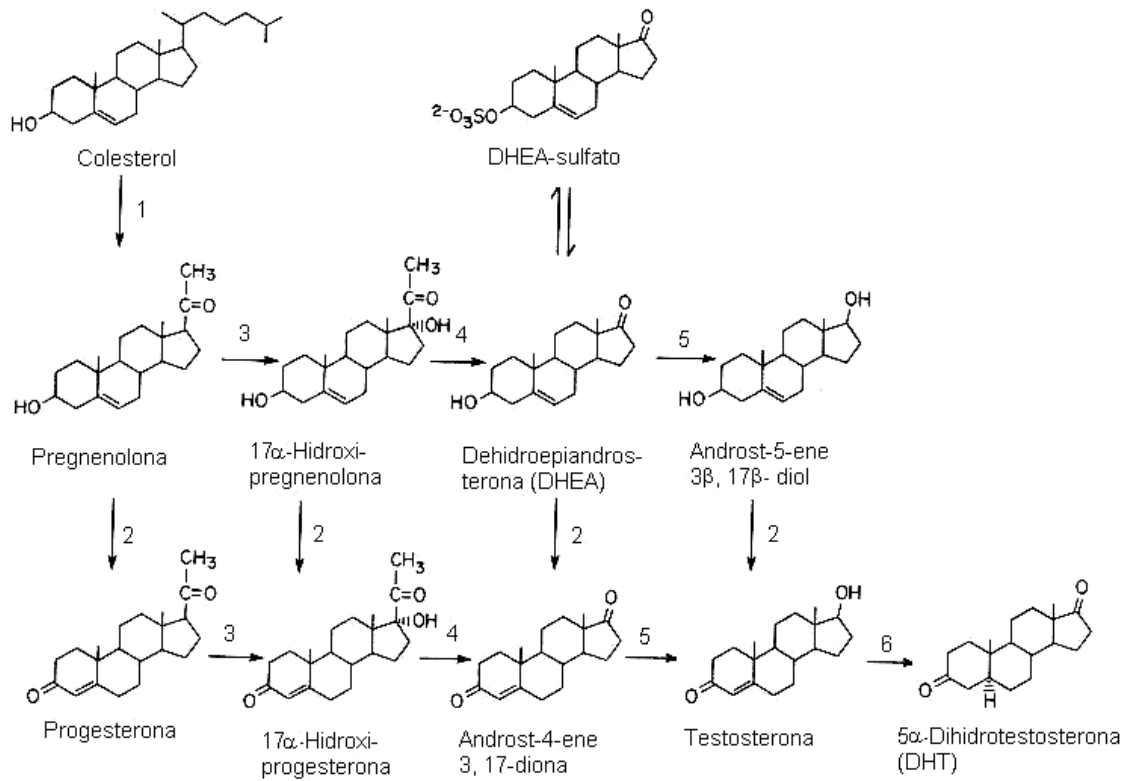


Fig. 10. Ruta de biosíntesis de testosterona (Norman A, 1997).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diferenciación sexual testicular está determinada por el gen determinante de la diferenciación, conocido como *SRY/Sry* en el humano y otros vertebrados, el cual induce la expresión de otros genes y factores de transcripción necesarios para la diferenciación sexual completa. Se sabe que el *Sry* es un factor de transcripción que induce la expresión de factores de crecimiento localmente producidos en el testículo embrionario que se expresan en etapas muy tempranas como el Factor de Crecimiento similar a la Insulina Tipo I y II (IGF-I e IGF-II). El primero regula la producción de la  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona y de la testosterona en el testículo embrionario y postnatal de varias especies de mamíferos. Además, estudios de inmunocitoquímica demostraron la presencia de este factor en células de Leydig a los 18 d.g. Sin embargo, uno de los aspectos que no se han estudiado del IGF-1 es su papel en la proliferación de las células somáticas testiculares Leydig y Sertoli en la etapa embrionaria. Por otra parte el efecto del Factor de Crecimiento Epidermal se ha descrito en varias especies de vertebrados pero no en la etapa embrionaria. Investigaciones recientes demostraron la importancia del IGF-1 para la actividad endócrina del testículo embrionario (Villalpando y Olmos-López, 2003). Sin embargo, no se sabe si el IGF-1 y el EGF intervienen en la proliferación de las células de Leydig durante el desarrollo testicular del ratón *Mus musculus*.

### IV. HIPÓTESIS

1. Las células de Leydig del ratón *Mus musculus* en la etapa embrionaria aumentarán su proliferación con la administración de IGF-1 y EGF por separado.
2. Las células de Leydig del ratón *Mus musculus* en la etapa embrionaria aumentarán su proliferación con la administración simultánea de IGF-1 y EGF logrando un efecto sinérgico.

## V. OBJETIVOS

- 1.- Estandarizar la técnica de separación de las células somáticas de Leydig del testículo embrionario de ratón *Mus musculus*.
- 2.- Evaluar el efecto del IGF-1 en la proliferación de las células de Leydig del testículo del ratón de 14, 16 y 18 días de gestación (fase de crecimiento testicular, fase fetal y fase prenatal).
- 3.- Evaluar el efecto del EGF en la proliferación de células de Leydig del testículo de ratón en las edades mencionadas.
- 4.- Determinar si hay un efecto sinérgico IGF-I/ EGF en la proliferación de las células de Leydig del testículo del ratón de las edades antes descritas.

## VI. MATERIAL Y MÉTODO

### 1) Material biológico

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

### 2) Cirugía experimental de embriones de ratón

Ratones hembras gestantes de la cepa CD1 fueron sacrificadas a los 14, 16 y 18 días de gestación. La eutanasia se realizó mediante dislocación cervical, inmediatamente después fue realizada una incisión abdominal en forma de "V" y se extrajo el útero. Los embriones aislados se disectaron y transfirieron a una caja de Petri estéril con medio de cultivo M199 suplementado. Posteriormente se separaron los embriones macho y se les extirparon los testículos para su posterior manipulación.

### 3) Disgregación celular

Se aislaron un promedio de 40 testículos de cada edad (14, 16 y 18 d.g.). Se colocaron en tubos Eppendorf y se lavó el tejido 2 veces con PBS a 22°C. Se preparó a 4°C una mezcla de 965 µL de PBS libre de Calcio y Magnesio filtrado, 10 µL de Colagenasa (0.2 mg/mL) y 20 µL de DNAsa (0.01 mg/mL). Se incubó el tejido durante 3 min a 37°C y después se disgregó manualmente 3 min. Después de este tiempo se agregaron 110 µL de Inhibidor de Tripsina al 0.2 %. Se mezcló para

---

---

homogeneizar y detener completamente la reacción y se agregaron 390  $\mu\text{L}$  de PBS filtrado a 22°C. Se centrifugó a 3000 rpm, por 15 min. Se decantó el sobrenadante de un solo golpe. Se lavó con 500  $\mu\text{L}$  de PBS y se centrifugó a 3000 rpm por 2 min. Por segunda vez se lavó con 500  $\mu\text{L}$  de PBS y se centrifugó a 3000 rpm por 2 min. Se resuspendieron las células en 1 mL de PBS filtrado a 22°C. Se dejó reposar 12 min en una gradilla a temperatura ambiente. Los túbulos que contienen a las células de Sertoli se precipitan al fondo y las células de Leydig se mantienen en la superficie. Se separó el sobrenadante que contenía a las células de Leydig, con una pipeta siliconizada, y se centrifugó lo recuperado a 3000 rpm por 5 min para la obtención de las células de Leydig. Posteriormente se decantó. Se resuspendió en 500  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo suplementado a 22°C.

#### 4) Conteo celular

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

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

#### 5) Cultivo celular

Sabiendo el número de células que hay en un mililitro, se realizó el cálculo para sembrar 30, 000 células. Se determinó la cantidad de pozos que se obtendrían para dividir las células en 4 grupos. El grupo 1 fue el control que correspondió a las células de Leydig sembradas en Medio Esencial Dulbecco Modificado (D'MEM) suplementado con Bromodeoxyuridina (BrdU) al 0.1%. El grupo 2 fue el IGF-1 que correspondió a las células de Leydig sembradas en Medio D'MEM suplementado con BrdU al 0.1% más IGF-1 (100ng/mL). El grupo 3 fue el EGF que correspondió a las células de Leydig sembradas en Medio D'MEM suplementado con BrdU al 0.1% más EGF (100ng/mL). El grupo 4 fue el IGF-1/EGF que correspondió a las células de Leydig sembradas en Medio D'MEM suplementado con BrdU al 0.1% más IGF-1 (100ng/mL) + EGF (100ng/mL). Dentro de una campana de flujo laminar para proporcionar un ambiente estéril, se adicionó a 200  $\mu$ L de Medio D'MEM suplementado contenido en cajas Petri la muestra respectiva con las 30, 000 células del tejido.

**Cuadro 3. Dosis de factores empleadas en células de Leydig**

EDAD (dg)	Control	IGF-I (ng/mL)	EGF (ng/mL)	IGF-1/EGF (ng/mL)
14	0	100	100	100/100
16	0	100	100	100/100
18	0	100	100	100/100

Después de verificar que las células se encontraban suspendidas en el medio utilizando un microscopio óptico Galen Tm III, las muestras fueron incubadas durante un periodo de 24 horas a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Durante este tiempo se estuvo monitoreando el desarrollo de las células en el medio de cultivo.

---

---

## **6) Identificación de las células de Leydig**

La identificación de las células de Leydig se realizó con la técnica histoquímica que detecta la actividad de la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD). Se sacrificaron ratones hembras de la cepa CD1 de 18 d.g. Se aislaron las células de Leydig de los embriones con el método antes mencionado. Se preparó una solución que contenía 4 mg/mL de  $\beta$  Nicotidamina Adenina Dinucleótido (NAD) y 2 mg/mL de Nitrobluetetrazolium (NBT) diluidas en buffer de fosfatos de acuerdo a las proporciones descritas por Levin et al (1959) con adaptaciones. Se realizó el experimento con dos grupos: un grupo control y un grupo experimental que se realizó por duplicado. A ambos grupos se les adicionaron los reactivos antes mencionados y al grupo experimental se le agregó una solución que contenía 2 mg de la hormona Dehidroepiandrosterona (DHEA), disuelta en NN-Dimetilformamida como sustrato de la reacción enzimática. Las células se incubaron 24h a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>. La detectó la actividad de la enzima por la presencia de un precipitado morado en la superficie de las células llamado Formasian.

## **7) Fijación de células**

Se sacaron las células de la incubadora. Se retiró el medio de cultivo de cada caja. Se lavó con 100  $\mu$ L de PBS cada pozo para eliminar el exceso de medio y se sacudió firmemente sobre un papel absorbente. Se agregaron 200  $\mu$ L de glutaraldehído 0.3% en amortiguador de fosfatos a cada pozo y las células se fijaron por 10 min con agitación leve. Después se retiró el glutaraldehído y se secó cada pozo sacudiendo firmemente sobre un papel absorbente. Se envolvió en papel aluminio cada caja y se guardaron a -20°C durante 24 horas para su posterior inmunodetección.

---

---

## **8) Inmunodetección**

Se sacaron las cajas del congelador y se dejaron a temperatura ambiente 10 min. Se lavaron dos veces con 200  $\mu$ L de PBS a 22°C 5 min. Se retiró el PBS y se incubaron con solución bloqueadora de albúmina al 5% durante 1 hora. Después se lavaron tres veces por 10 min cada vez con 200  $\mu$ L de PBS caliente (<80°C) y posteriormente se incubaron con 50  $\mu$ L de anti-BrdU (1:10) por 1 hora. Se lavaron 3 veces con PBS a 22°C por 5 min, se incubaron con 50  $\mu$ L de anti-mouse FITC 1:10 en la oscuridad por 1 hora. Se enjuagaron con PBS- Tween (0.05%) a 22°C 3 veces. Se secaron los pozos sacudiendo firmemente sobre un papel absorbente. Se envolvieron en papel aluminio las cajas y se mantuvieron a -20°C para la posterior toma de fotografía en el microscopio de fluorescencia.

## **9) Cuantificación de las células marcadas**

Se tomaron las fotografías de los pozos utilizando un microscopio de fluorescencia Zeiss con un objetivo de 10X. Se identificaron las células marcadas con BrdU y se realizó el conteo total en cada campo. Se graficaron los resultados del grupo control contra el grupo experimental, así como todos los grupos de cada edad.

## **10) Análisis estadístico**

Los resultados experimentales fueron analizados estadísticamente utilizando las pruebas de "t" de Student con un nivel de probabilidad del 99.5%, ( $P < 0.05$ ), empleando una n de 3 experimentos independientes con 40 testículos cada uno.



## VII. RESULTADOS

### A. Cultivo celular

Durante el proceso de cultivo celular, el desarrollo celular fue monitoreado en el período de incubación. El desarrollo celular obtenido fue adecuado como se puede observar en los contactos que se establecen entre las células gonadales.

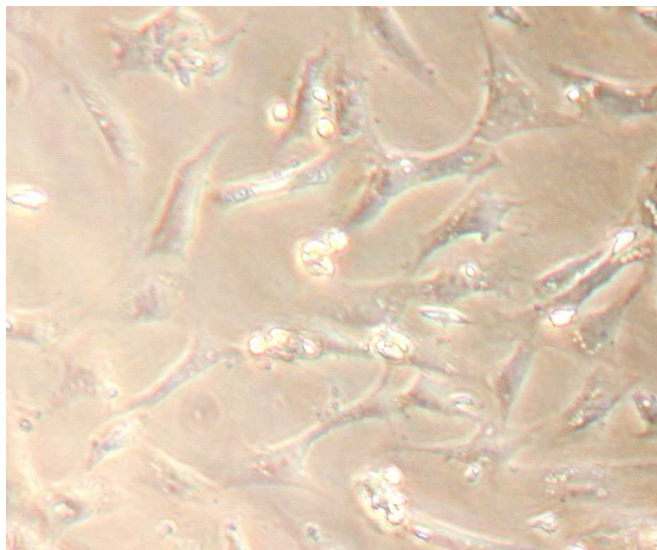


Fig. 11. Crecimiento de células de 14 d.g. en medio de cultivo

### B. Identificación de las células de Leydig

Al aplicar la histoquímica para la identificación de la célula de Leydig, el análisis de los resultados demostró que del 95 al 97 % de las células cultivadas son células de Leydig y que hay un pequeño porcentaje de células mioides (1 al 3%). De esta manera se confirmó que las células empleadas en los ensayos de proliferación son células de Leydig.

### C. Inmunodetección

Al realizar la inmunodetección con el anticuerpo secundario acoplado a la Fluoresceína (anti-mouse FITC) se detectó la proliferación de las células de Leydig, las cuáles fueron estimuladas con diferentes factores. En la Fig. 12 se puede observar una de las fotografías de la inmunodetección. En ésta se muestran la fluorescencia de las células marcadas que incorporaron el BrdU.

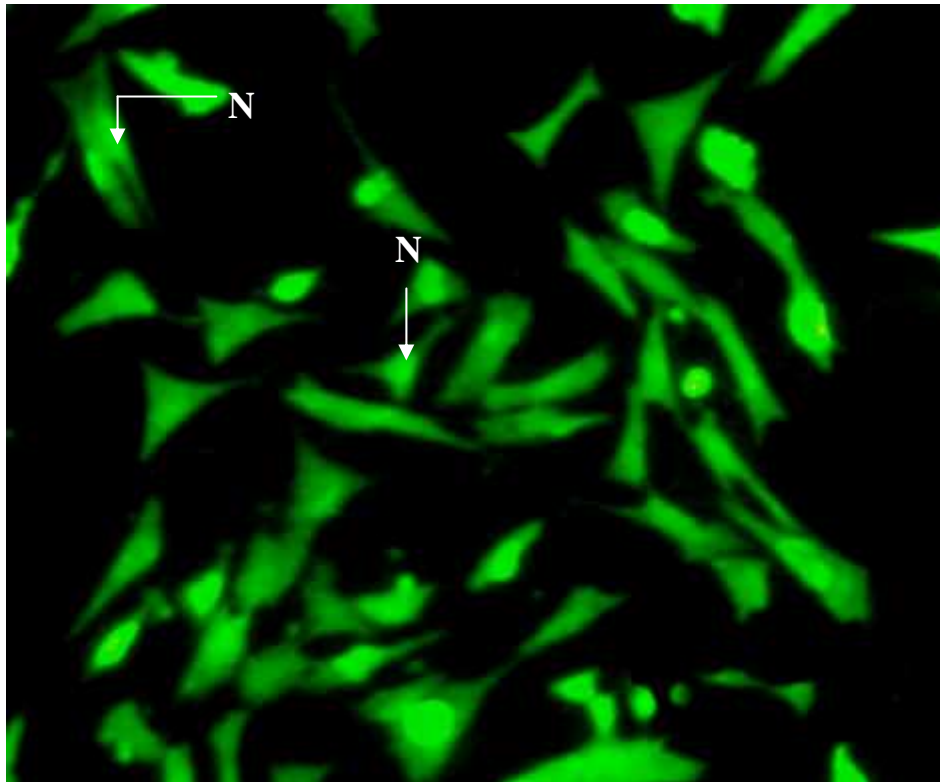
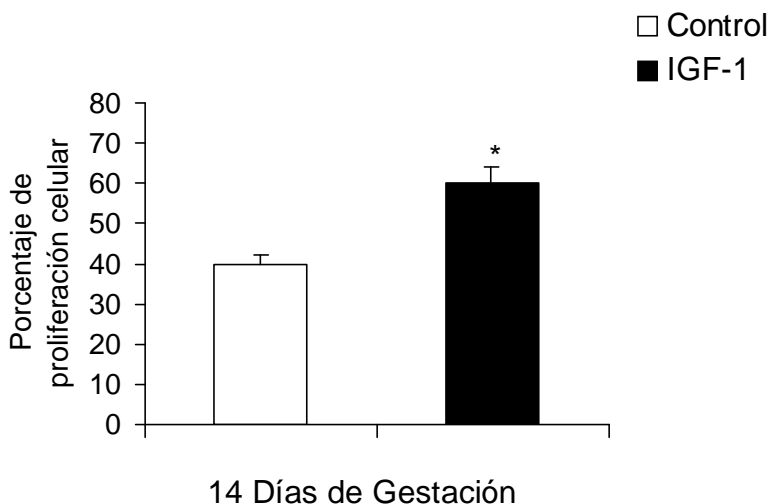


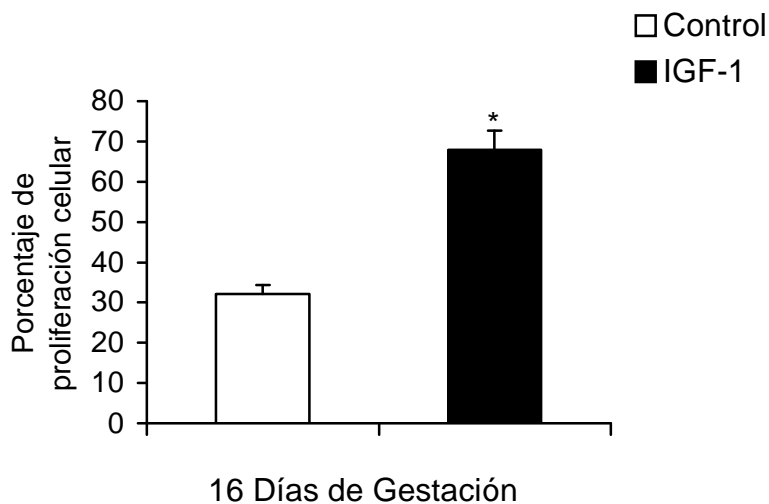
Fig. 12. Células de Leydig de 14 dg. marcadas con BrdU. Las flechas muestran la marca en los núcleos (N). 20X.

#### D. Efecto del IGF-1 en la proliferación de las Células de Leydig

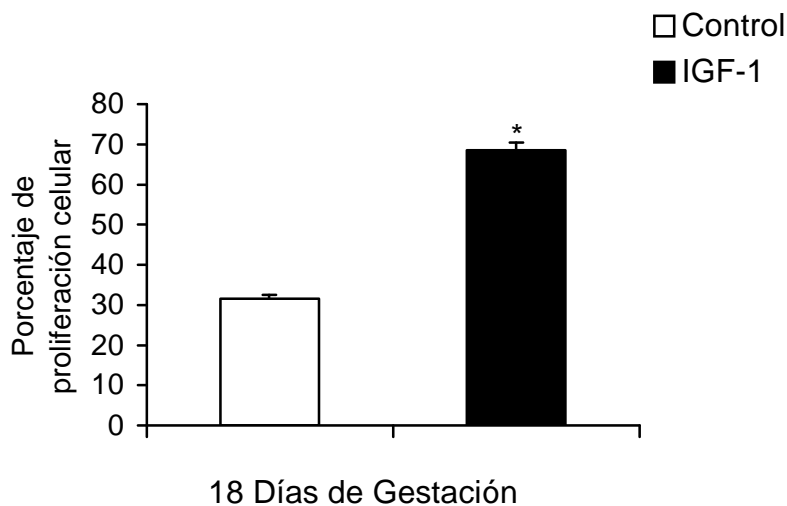
Los resultados que se obtuvieron de los experimentos realizados con IGF-1 en la proliferación de las células de Leydig de testículo de ratón de 14, 16 y 18 días de gestación mostraron en todas las edades que cuando dichas células se incubaron con el IGF-1, aumentó la proliferación celular en mayor cantidad que en ausencia de él. En las células control de 14 días de gestación se observó una proliferación del  $40\% \pm 5\%$ , mientras que en las incubadas con IGF-1 la proliferación fue del  $60\% \pm 7\%$ . (Fig. 13). En las células control de 16 días de gestación se observó una proliferación del  $32\% \pm 7\%$ , mientras que en las células incubadas con IGF-1 la proliferación fue de  $68\% \pm 4.8\%$  (Fig. 14). Finalmente en las células control de 18 días de gestación presentaron una proliferación de  $31\% \pm 3.3\%$ , mientras que el grupo de células incubadas con IGF-1 tuvieron una proliferación del  $69\% \pm 2.4\%$ . (Fig. 15)



**Fig. 13. Efecto del IGF-1 sobre la proliferación de las células de Leydig de ratón (14 d.g.).** La gráfica muestra el promedio de 3 experimentos por variable y la desviación estándar, \* t-student  $p < 0.05$ .



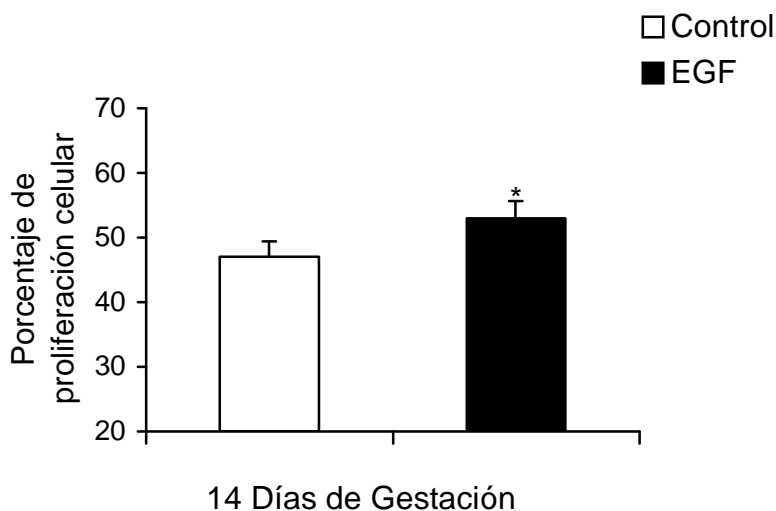
**Fig. 14. Efecto del IGF-1 sobre la proliferación de las células de Leydig de ratón (16 d.g.).** La gráfica muestra el promedio de 3 experimentos por variable y la desviación estándar, \* t-student  $p < 0.05$ .



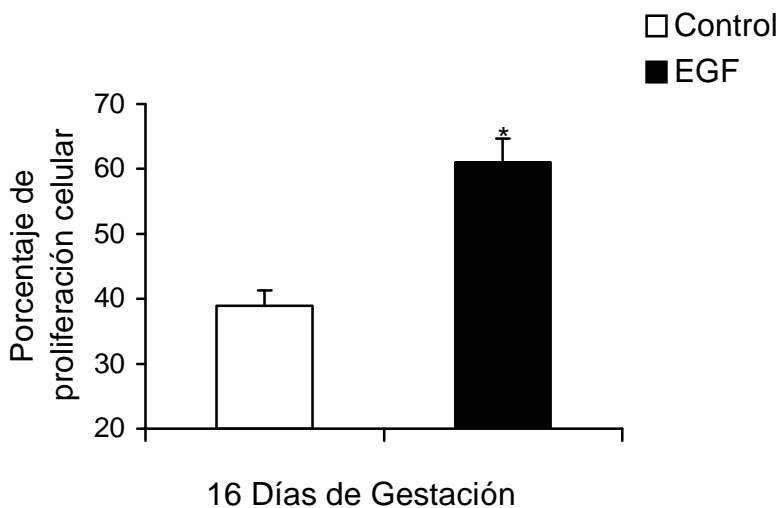
**Fig. 15 Efecto del IGF-1 sobre la proliferación de las células de Leydig de ratón (18 d.g.).** La gráfica muestra el promedio de 3 experimentos por variable y la desviación estándar, \* t-student  $p < 0.05$ .

### E. Efecto del EGF en la proliferación de las Células de Leydig

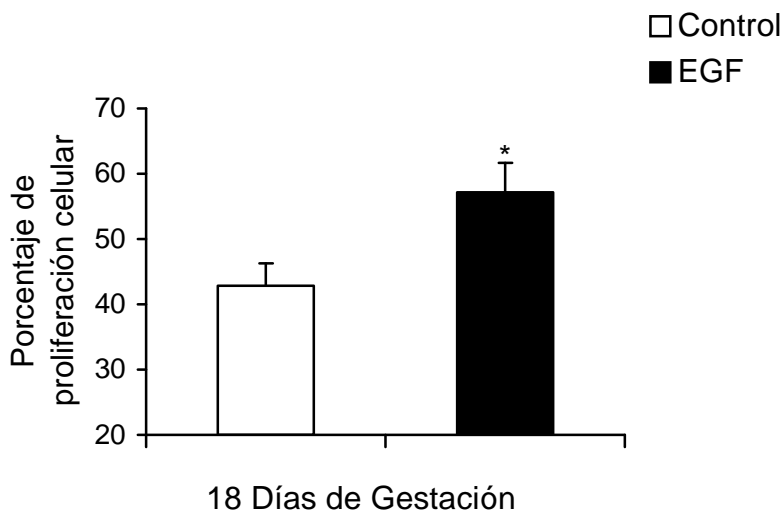
Con relación a los experimentos realizados en las células de Leydig de ratón de 14, 16 y 18 días de gestación a las que se les adicionaron EGF, los resultados que se obtuvieron mostraron que cuando dichas células se incubaron con el EGF la proliferación celular fue mayor que en ausencia del EGF. Sin embargo, éste aumento en la proliferación es de menor impacto que el observado en las células tratadas con el IGF-1. En lo que respecta a las células control de 14 días de gestación presentaron una proliferación de  $47\% \pm 5\%$ , mientras que las células incubadas con EGF mostraron una proliferación del  $53\% \pm 1.2\%$  (Fig. 16). En las células de 16 días de gestación la proliferación en el grupo control fue de  $38\% \pm 7\%$ , en tanto que en las células tratadas con EGF la proliferación  $62\% \pm 6\%$  (Fig. 17). En las células de 18 días de gestación el grupo control presentó una proliferación de  $42\% \pm 3\%$ , mientras que en el grupo incubado con EGF la proliferación fue del  $58\% \pm 8\%$  (Fig. 18).



**Fig. 16 Efecto del EGF sobre la proliferación de las células de Leydig de ratón (14 d.g.). La gráfica muestra el promedio de 3 experimentos por variable y la desviación estándar, \* t-student  $p < 0.05$ .**



**Fig. 17. Efecto del EGF sobre la proliferación de las células de Leydig de ratón (16 d.g.). La gráfica muestra el promedio de 3 experimentos por variable y la desviación estándar, \* t-student  $p < 0.05$ .**



**Fig. 18. Efecto del EGF sobre la proliferación de las células de Leydig de ratón (18 d.g.). La gráfica muestra el promedio de 3 experimentos por variable y la desviación estándar, \* t-student  $p < 0.05$ .**

## F. Efecto del IGF-1/EGF en la proliferación de las Células de Leydig

Las figuras 19, 20 y 21 muestra la proliferación de las células de Leydig de 14, 16 y 18 días de gestación tratadas simultáneamente con IGF-1/EGF. En las tres edades se observó que cuando las células se incubaron con la combinación de IGF-1/EGF fue mayor su proliferación en comparación con las células control. En las células control de 14 días de gestación se observó una proliferación del  $42\% \pm 5\%$ , mientras que en las células incubadas con IGF-1/EGF la proliferación fue del  $58\% \pm 8\%$ . (Fig. 19). En las células control de 16 días de gestación se observó una proliferación del  $36\% \pm 7\%$ , en tanto que las células incubadas con IGF-1/EGF presentaron una proliferación de  $64\% \pm 4.5\%$  (Fig. 20). Finalmente, en las células de 18 días de gestación el grupo control presentó una proliferación de  $39\% \pm 3.3\%$ , mientras que las células incubadas con IGF-1/EGF tuvieron una proliferación del  $61\% \pm 3\%$  (Fig. 21).

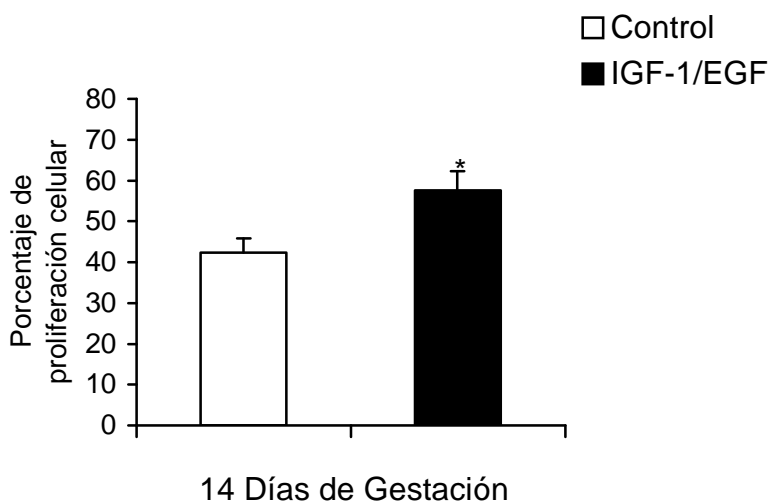
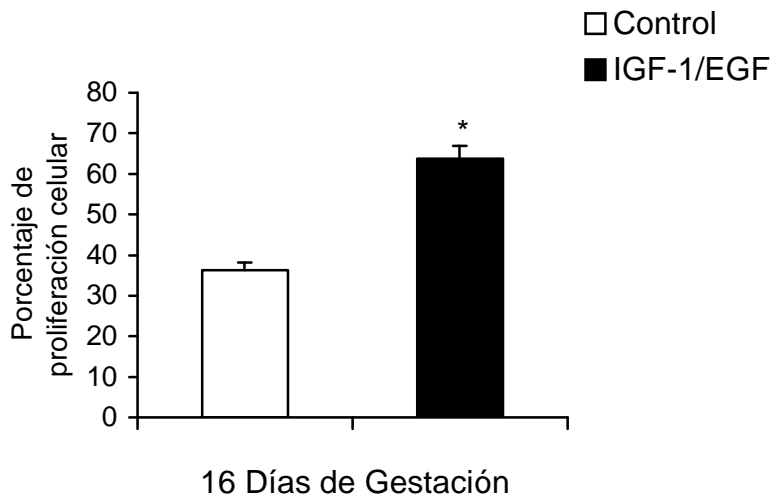
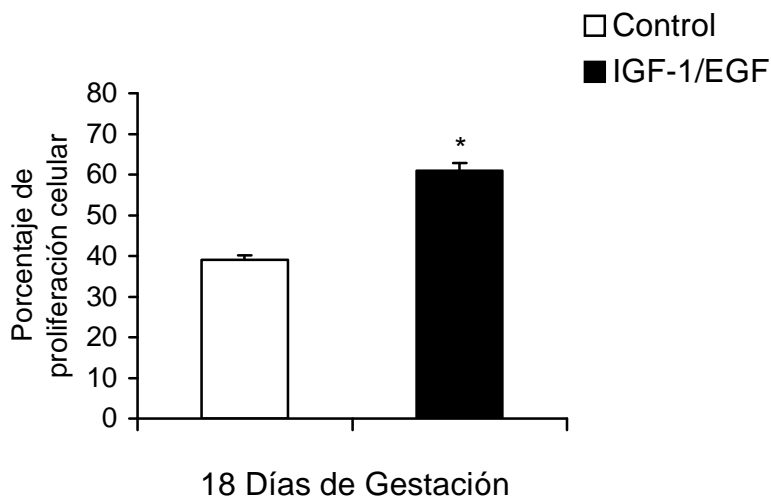


Fig. 19 Efecto del IGF-1/EGF sobre la proliferación de las células de Leydig de ratón (14 d.g.). La gráfica muestra el promedio de 3 experimentos por variable y la desviación estándar, \* t-student  $p < 0.05$ .



**Fig. 20. Efecto del IGF-1/EGF sobre la proliferación de las células de Leydig de ratón (16 d.g.).**  
 La gráfica muestra el promedio de 3 experimentos por variable y la desviación estándar,  
 \* t-student  $p < 0.05$ .



**Fig. 21. Efecto del IGF-1/EGF sobre la proliferación de las células de Leydig de ratón (18 d.g.).**  
 La gráfica muestra el promedio de 3 experimentos por variable y la desviación estándar,  
 \* t-student  $p < 0.05$ .



### G. Comparación del efecto del IGF-1, EGF e IGF-1/EGF en la proliferación de las células de Leydig.

Comparación del efecto sobre la proliferación de las células de Leydig de ratón de 14, 16 y 18 días de gestación por IGF-1, EGF e IGF-1/EGF. Observamos que la proliferación de este tipo celular fue significativamente mayor en las células testiculares que fueron adicionadas con el IGF-1 que en las que se trataron con EGF e IGF-1/EGF (Fig. 22, 23 y 24).

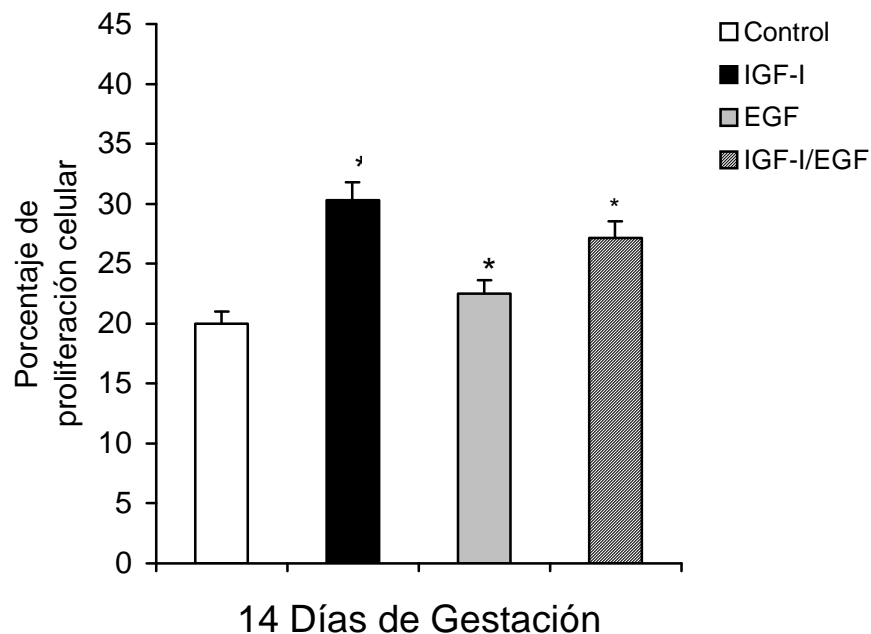


Fig. 22. Efecto de incubar las células de Leydig de ratón (14 d.g.) en presencia de IGF-1, EGF e IGF-1/EGF. La gráfica muestra el promedio de 3 experimentos por variable y la desviación estándar, \* t-student  $p < 0.05$ .

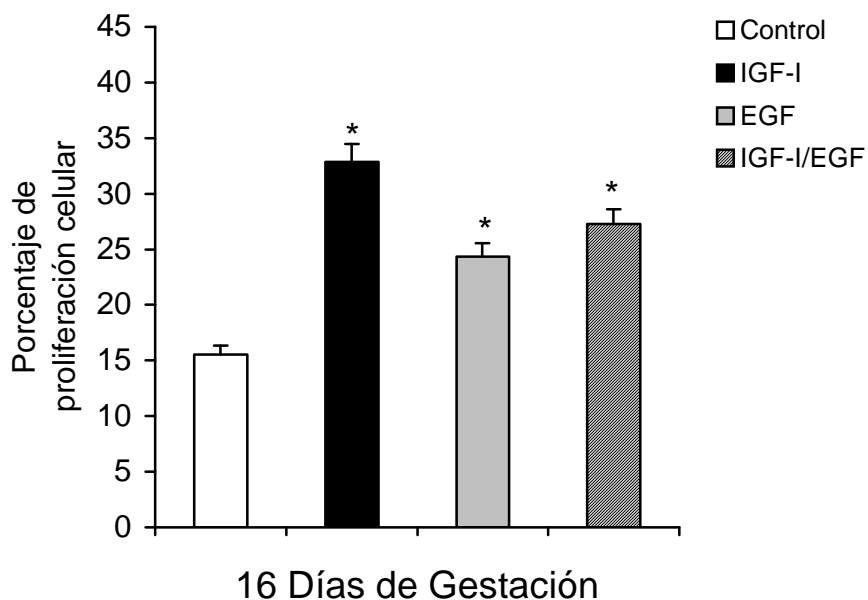


Fig. 23 Efecto de incubar las células de Leydig de ratón (16 d.g.) en presencia de IGF-1, EGF e IGF-1/EGF. La gráfica muestra el promedio de 3 experimentos por variable y la desviación estándar, \* t-student  $p < 0.05$ .

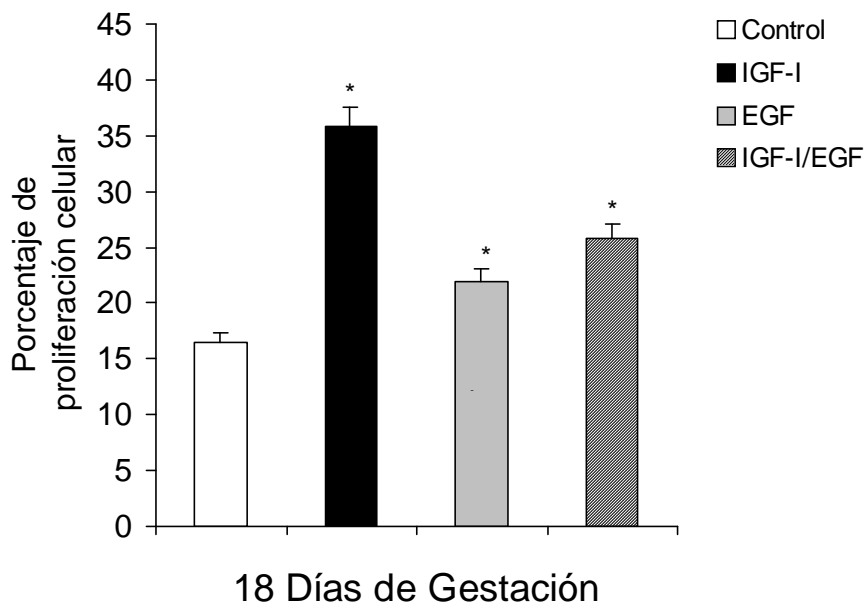


Fig. 24. Efecto de incubar las células de Leydig de ratón (18 d.g.) en presencia de IGF-1, EGF e IGF-1/EGF. La gráfica muestra el promedio de 3 experimentos por variable y la desviación estándar, \* t-student  $p < 0.05$ .

## VIII. DISCUSIÓN

En la presente investigación se analizó por primera vez el papel del IGF-1, del EGF y de la combinación de ambos sobre la proliferación de las células de Leydig del testículo embrionario del ratón *Mus musculus*. Se ha descrito que la fase G1 del ciclo celular es el intervalo donde la célula se prepara para la síntesis de DNA y proteínas estructurales. En este estudio, la proliferación se determinó por la cantidad de células que incorporaron un análogo de la Timina, el BrdU en su núcleo.

### ***Análisis de efecto del IGF-1***

De acuerdo con los resultados obtenidos se observó que el IGF-1 posee la capacidad de inducir la proliferación de las células de Leydig del testículo en todas las edades estudiadas (14, 16 y 18 días de gestación). Nuestros hallazgos apoyan investigaciones anteriores en las que se determinó el efecto que tiene el IGF-1 como factor mitogénico sobre una amplia variedad de tipos celulares como keratinocitos, osteoblastos, células musculares y células epiteliales mamarias (Rhoades, 1996). Por otra parte, estudios realizados por Roullier- Fabré et al (1998) en la rata a los 16 días de gestación descartan el papel del IGF-1 como inductor de la proliferación y ellos proponen que éste factor de crecimiento sea más bien un promotor de la diferenciación de las células productoras de hormonas sexuales. Sin embargo, los resultados obtenidos en la presente investigación demuestran que las células de Leydig aisladas en la etapa embrionaria e incubadas con el IGF-1 aumentan su proliferación. La respuesta a la incubación con el IGF-1 es diferente en cada una de las etapas estudiadas. En el caso de las células de 14 días de gestación hubo un incremento significativo de 20% de

proliferación, mientras que a los 16 días de gestación el incremento fue de 36% y a los 18 días de gestación se mantuvo en 38%, lo cuál establece un intervalo de 10-16% de aumento en la proliferación de los 14 a los 16 días de gestación y una diferencia no significativa de tan solo 2% de los 16 a los 18 días de gestación. Esto nos indica que el mayor efecto del IGF-1 sobre la proliferación celular se alcanza a los 16 días de gestación y permanece constante a los 18 días de gestación. Datos generados en nuestro laboratorio demostraron que éste factor regula de manera autocrina la célula de Leydig ya que el IGF-1 y el receptor a éste se producen en la misma célula (Villalpando-López Olmos, 2003). Los períodos de alta expresión del IGF-1 en el ratón parecen coincidir con períodos de alta producción de  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona, lo cuál explicaría el aumento gradual de la acción del IGF-1 sobre el proceso de proliferación de la célula de Leydig a lo largo del desarrollo testicular.

### ***Análisis de efecto del EGF***

Con respecto a los resultados obtenidos con las células incubadas en presencia de EGF se infiere que éste posee la capacidad de inducir la proliferación de las células de Leydig en todas las edades estudiadas (14, 16 y 18 días de gestación) en menor grado que IGF-1. Se sabe que el EGF puede actuar como un potente mitógeno y agente anabólico de una amplia variedad de tejidos de origen ectodermal y endodermal (Pimentel, 1994). En el caso de las células de 14 días de gestación tratadas con EGF se observó un incremento en la proliferación poco significativo del 5% con respecto al grupo control. En cuanto a las células de 16 días de gestación el aumento fue de 22% y a los 18 días de gestación de 14 %. Actualmente no hay investigaciones del efecto

del EGF en la proliferación de las células de Sertoli y Leydig embrionaria de ratón. El EGF en condiciones fisiológicas puede tener una función tanto estimulante como inhibidora sobre la esteroidogénesis en los cultivos de células de Leydig prepubertales y adultas en el ratón. Sin embargo, estas acciones dependen de la presencia de la LH (Verhoeven, 1986). Además, se sabe que la expresión del receptor del EGF depende de la influencia de muchos factores entre ellos hormonas, factores de crecimiento y neurotransmisores. La expresión del receptor del EGF en la próstata de la rata es modulada por andrógenos (Traish, 1987). El aumento en la proliferación celular de 14 a 16 d.g. puede deberse a la producción de testosterona por la célula de Leydig y a la modulación de esta hormona sobre la expresión del receptor al EGF en estas células.

#### ***Análisis de efecto del IGF-1/EGF***

La hipótesis planteaba que el efecto ejercido sobre la división celular fuera proporcional a la suma del efecto individual de IGF-1 y EGF debido a que estos factores de crecimiento ejercen su acción por la unión a receptores específicos. Sin embargo, los resultados observados en todos los experimentos mostraron un efecto intermedio de la acción de los factores en conjunto. Es decir, la mayor proliferación celular se obtuvo con el IGF-1, la menor con el EGF. A los 14 días de gestación se observó una proliferación celular del 15%, a los 16 días de gestación de 27% y a los 18 días de gestación un 22%. Al igual que en las células tratadas con IGF-1 y EGF, hay un cambio muy importante en la proliferación de los 14 a los 16 d.g. En parte esto puede deberse a que a los 16 d.g. la gónada está en su etapa de mayor crecimiento y produce cantidades detectables de testosterona (Villalpando- López Olmos, 2003). De igual

forma, la actividad del IGF-1 puede ser modificada por señales de receptores de hormonas. La fosforilación de la proteína cinasa activadora de la mitosis y la entrada de calcio a la célula estimulada por el IGF-1 puede ser bloqueada por la toxina pertusis implicando un papel inhibitorio selectivo de la proteína G que regularía la función del IGF-1R (Stewart, 1996). Además, la actividad del IGF-1 pudiera estar siendo modulada por otros factores dando como resultado un proliferación media en experimentos combinados. Esto sustenta la existencia de las interdependencias en las cascadas de traducción de señales por estos factores de crecimiento.

## IX. CONCLUSIONES

- El IGF-1 es un inductor de la proliferación de las células de Leydig teniendo el mayor efecto en la fase prenatal a los 18 d.g.
- Aunque EGF es un inductor de la proliferación de las células de Leydig sus efectos fueron menores a los observados con el IGF-1. El mayor efecto se observó en la fase de crecimiento testicular a los 16 d.g.
- El IGF-1 es el regulador primario y el EGF el regulador secundario de la proliferación de las células de Leydig del testículo embrionario del ratón *Mus musculus*.
- La combinación de ambos factores (IGF-1/EGF) ejerce un efecto intermedio sobre la proliferación de las células de Leydig en todas las edades estudiadas.
- No se demostró ningún efecto en la proliferación de las células de Leydig al incubarlas en la presencia simultánea de ambos factores de crecimiento.

---

---

## X. BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B. Bray D. Lewis J. Raff M. Roberts K. Watson J. 1996, *Biología molecular de la célula*, Editorial Omega, 3ª ed, Pág. 925-976.
2. Arango N. Lovell-Badge R. Behringer 1999, Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: In vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* 99:409-419.
3. Bach L. Rechler M. 1995, Insulin-like growth factor binding proteins. *Diabetes Rev.* 3:38-61.
4. Baker J. Hardy M. Zhou J. Bondy C. Lupu F. Bellvé A. Efstratiadis A. 1996, Effects of an Igf1 Gene Null Mutation on Mouse Reproduction. *Mol Endocrinol.*10:903-918.
5. Baxter R. 1993, Circulating binding proteins for the insulin-like growth factors, *Trends Endocrinol Metab.* 4:91-96.
6. Behringer R. Finegold M. Cate R. 1994, Mullerian-Inhibiting Substance function during mammalian sexual development. *Cell* 79: 415-425.
7. Boonstra J. Rijken P. Humbel B. Cremers F. Verkleij A. Henegouwen P. 1995, The Epidermal Growth Factor, *Cell Biol Int.* 19,5:413-430.
8. Carlson B. 2004, *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*, 2ª ed. Editorial Mosby, 376-394.
9. Carpenter G. Zendegui J. 1986, Epidermal growth factor, its receptor, and related proteins. *Exp Cell Res.* 164:1-10.
10. Clemmons D. Maile L. 2003, Minireview: Integral membrane proteins that function coordinately with insulin-like growth factor I receptor to regulate intracellular signaling. *Endocrinology* 144(5):1664-1670.
11. Cohick y Clemmons 1993, The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol.* 55:131-53.
12. Colón E. Svechnikov K. Carlsson-Skwirut C. Bang P. Soder O. 2005, Stimulation of Steroidogenesis in Immature Rat Leydig Cells Evoked by Interleukin-1 $\alpha$  Is Potentiated by Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factors. *Endocrinology*, 146(1):221-230.
13. Coppola D. Ferber A. Miura M. Sell C. D'Ambrosio C. Rubin R. Baserga R. 1994, A functional insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol.* 14:4588-4595.
14. De Santa Barbara P. Miniot B. Poulat F. Berta P. 2000, Expression and subcellular localization of SF-1, SOX 9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. *Dev Dynam.* 217:293-298.
15. Denley A. Bonython E. Booker G. Cosgrove L. Forbes B. Ward C. Wallace J. 2004 "Structural determinants for insulin-like growth factor II to insulin receptor (IR)-A, the Exon 11 minus isoform of the IR". *Mol Endocrinol.* 18:2502-2512.
16. Firth S. Baxter R. 2002, Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev.* 23:824- 854.



17. Gan B. Hollenberg M. 1986, Autoradiographic localization of binding sites for Epidermal growth factor-urogastrone EGF-URO in coronary arteries, *Eur J Pharmacol.* 167:407.
18. Gilbert S. 2005, *Biología del desarrollo*. 7ª ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires Cap. 17, Pág. 585-614.
19. Hairder S. 2004, Cell biology of Leydig cells in the testes. *Int Rev Citol.* 233: 181-209.
20. Hubbard S. Till J. 2000, Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem.* 69:373-398.
21. Humbel. 1990, Insuline like growth factors I and II *Eur J Biochem.* 190:445-462.
22. Justice M. Siracusa L. Gilbert D. Heisterkamp N. Groffen J. Chada K. Silan C. Copeland N. Jenkins N. 1990, A genetic linkage map of mouse chromosome 10: localization of eighteen molecular markers using a single interspecific backcross. *Genetics* 125:855-866.
23. Kato H. Faria T. Stannard B. Roberts Jr. LeRoith D. 1993, Role of tirosine kinase activity in signal transduction by the insulin growth factor-I (IGF-I) receptor. Characterization of kinase-deficient IGF-1receptor and the action of an IGF-I-mimetic antibody (alpha IR-3). *J Biol Chem.* 268:2655-2661.
24. Koopman P. 1999, *Sry* and *Sox9*: mammalian testis-determining genes. *Cell Mol Life Sci.* 55:839-856.
25. Larsen W. 2003, *Embriología Humana*, Editorial Churchill Livingstone, Madrid España, Pág. 276-283.
26. Levy H. Deane H. Rubin B. 1959, Visualization of steroid 3 $\beta$ -ol dehydrogenase activity intissues of intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology*, 65: 932-943.
27. Lewin B. 2001, *Genes*, Editorial Marbán, Madrid España, Cap. 27, Pág. 835-864.
28. Lodish. 2005, *Biología celular y molecular*, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
29. Mathews C. Van Holde K. Ahern K. 2002, *Bioquímica*, Editorial Pearson Educación, Madrid, Pág. 774-778.
30. Merchant H. 1993, El sexo gonadal, *Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas*, UNAM; 451-460.
31. Navarro M. Baserga R. 2001, Limited redundancy of survival signal from the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Endocrinology*, 142:1073-1081.
32. Norman A. Litwack G. 1997 Hormones. 2a ed. Editorial Academic Press. Pág. 65-72, 341-351.
33. Pardee A. 1989, G1 events and regulation of cell proliferation. *Sci Wash DC* 222:809-814.
34. Parker K. Schimmer B. Schedl A. 1999, Genes essential for early events in gonadal development. *Cell Mol Life Sci.* 55:831-838.
35. Pask A. Graves J. 1999, Sex chromosomes and sex-determining genes: Insights from marsupials and monotremes. *Cell Mol Life Sci.* 55:864-875.

36. Pimentel E. 1994, *Handbook of Growth Factors, Vol II: Peptide Growth Factors*, Cáp. 3, Pág. 97-120.
37. Rechler M. Nissley S. 1985, The nature and regulation of the receptors for insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol.* 47:425.
38. Rey R. 2001, Diferenciación sexual embrio-fetal: de las moléculas a la anatomía, *Revista Chilena de Anatomía.* v.19 n.1 Temuco abr.
39. Rhoades R. Tanner G. 1996, *Fisiología Médica.* Ed. Elsevier Masson.
40. Rotwein P. Pollock K. Didier D. Krivi G. 1986, Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene: alternative RNA processing produces two insulin-like growth factor I precursor peptides. *J Biol Chem.* 261:4828-4832.
41. Rouiller-Fabre V. Lecref L. Gautier C. Saez J. Habert R. 1998 "Expresión and effect of Insulin-like growth factor I on rat fetal Leydig cell and differentiation". *Endocrinology*, 139:2926-2934.
42. Sadler T. 1993, *Embriología Médica.* 6ª ed. Editorial Panamericana. Bogotá.
43. Sell C. Dumenil C. Deveaud C. Miura M. Coppola D. Deangleis T. Rubin R. Efstratiadis A. Baserga A. 1994, Effect of a null mutation of the insulin-like growth factor I receptor gene on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 14: 3604-3612.
44. Shen W. Moore C. Ikeda Y. Parker L. Ingraham H. 1994, Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the Mullerian-inhibiting substance gene: A link to the sex determination cascade. *Cell* 77:651-661.
45. Smith P. Spurrell E. Coakley J. Hinds C. Ross R. Krainer A. Chew S. 2002 "An exonic splicing enhancer in human IGF-I pre-mRNA mediates recognition of alternative exon 5 by the serine-arginine protein splicing factor-2/alternative splicing factor". *Endocrinology*, 143:146-154.
46. Soley M. Hollenberg M. 1987, Epidermal growth factor (urogastrone)- stimulated gluconeogenesis in isolated mouse hepatocytes, *Arch Biochem Biophys.* 255:136.
47. Stewart C. Rotwein P. 1996, Growth, Differentiation, and Survival: Multiple Physiological Functions for Insulin-Like Growth Factors. *Physiol Rev.* 76(4):1005-1026.
48. Syed G. 2004, Cell Biology of Leydig Cell in the Testis, *Int Rev Cyt.* Vol. 233:181-241.
49. Taylor B. Grieco D. 1991, Localization of the gene encoding insulin-like growth factor I on mouse chromosome 10. *Cytogenet Cell Genet.* 56:57-58.
50. Taylor J. Mitchell W. Cohen S. 1972, Epidermal growth factor: physical and chemical properties. *J Biol Chem.* 247:5928-5934.
51. Tilman C. Capel B. 2002, Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. *Recent Prog Horm Res.* 57:1-18.
52. Traish A. Wotiz H. 1987, Prostatic epidermal growth factor receptors and their regulation by androgens. *Endocrinology*, 121:1461.
53. Ullrich A. Gray A. Tam A. Tang-Feng M. Tsubokawa M. Collins C. Henzel W. Le Bon T. Kathuria S. Chen S. Jacobs S. Francke U. Ramachandran J. Fujita-Yamaguchi. 1986, Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests

- 
- 
- structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.* 5:2503-2512.
54. Verhoeven G. Cailleau J. 1986, Stimulatory effects of epidermal growth factor on steroidogenesis in Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol.* 47: 99.
  55. Villalpando I. 2000, Sinfonía de genes gonadales, *Ciencia y Desarrollo.* Sep-Oct, 32-41.
  56. Villalpando I. 2001 Péptidos en la biología del desarrollo de los mamíferos. In: Javier Velásquez Moctezuma (Ed). *Biología de la Reproducción II.* UAM- PUIS. Pág. 121-143.
  57. Villalpando I. López-Olmos V. 2003, Insulin-like growth factor I (IGF-I) regulates endocrine activity of the embryonic testis in the mouse. *J Steroid Biochem & Mol Biol.* 86:151-158.
  58. Wang G. Hardy M. 2004, Development of Leydig Cells in the Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) knockout Mouse: Effects of IGF-I Replacement and Gonadotropic Stimulation. *Biol Reprod.* 70:632-639.
  59. Yao H. Capel B. 2005, Temperature, Genes and Sex: a Comparative View of Sex Determination in *Trachemys scripta* and *Mus musculus*, *J Biochem.* 138:5-12.
  60. Yarden Y. Schelessinger J. 1987, Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor, *Biochemistry.* 26:1443.
  61. Yarden Y. Schelessinger J. 1987, Self-phosphorylation of Epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation. *Biochemistry.* 26:1434.
  62. Zapf J. Schmid Ch. Froesch E. 1984, Biological and immunological properties of insulin-like growth factor factor (IGF) I and II. *J Clin Endocrinol Metab.* 13:3.

## XI. APÉNDICE

### 1. Solución PBS (1:10)

*Para 100 mL*

- 10 mL de PBS 10X (Gibco)
- 90 mL Agua bidestilada

### 2. Medio D'MEM suplementado

- Albúmina 0.1%
- Bicarbonato de sodio 7.5%
- L-glutamina 200 mM
- Penicilina G-sódica con sulfato de estreptomina 5 000 U/ $\mu$ g/mL
- Piruvato de sodio 11mg/mL
- Amortiguador HEPES 250 mM

### 3. Glutaraldehído al 0.3% (fijador)

*Para 10 mL*

- 125  $\mu$ L de glutaraldehído al 25% (Merck)
- cbp 10 mL de PBS .

### 4. Solución bloqueadora de albúmina al 5%

*Para 10 mL*

- 9870  $\mu$ L de PBS
- 0.5 g de Albúmina Sérica Bovina
- 100  $\mu$ L de Gelatina