



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A INSULINA
TIPO II (IGF-II) REGULA LA PROLIFERACIÓN DE
LAS CÉLULAS DE LEYDIG DEL TESTÍCULO
EMBRIONARIO DEL RATÓN *Mus musculus in vitro*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

BEATRIZ ESTELA HERNÁNDEZ ALARCÓN



MÉXICO, D. F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Enrique Moreno Saéñz

VOCAL: Marta Alicia Menjivar Iraheta

SECRETARIO: María Irma Villalpando Fierro

1er. SUPLENTE: Martha Leticia Jiménez Pardo

2do. SUPLENTE: José Ignacio Páramo Ramírez

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Este trabajo fue apoyado por los proyectos PAPIIT (DGAPA-UNAM) IN224607.

ASESOR DEL TEMA: _____
Dra. María Irma Villalpando Fierro

SUPERVISOR TÉCNICO: _____
M. en C. Esmeralda Lira Romero

SUSTENTANTE: _____
Beatriz Estela Hernández Alarcón

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar hasta este momento de mi vida, siendo mi fuerza espiritual para disfrutar cada alegría y vencer todos los obstáculos.

A mi *Alma Mater* por darme el privilegio de recibirme como a una hija más y hacerme orgullosamente UNAM.

A la Facultad de Química, porque al pasar la mayor parte de los días en este recinto, pude conocer a las personas que me ayudaron en mi formación académica y a superarme personalmente.

A la Dra. Irma Villalpando por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y sobretodo por su apoyo para la realización de este trabajo.

A la M. en C. Esmeralda Lira Romero, por su asesoría y apoyo en la realización de técnicas de cultivo celular, inmunocitoquímicas, toma de fotografías y uso del microscopio de fluorescencia.

A Angie, Javier, Pablo y Uriel, a quienes no solo consideré mis compañeros sino también amigos, porque de una u otra forma pusieron su granito de arena, haciendo más agradable mi “paso” por el laboratorio.

A mi dulce Angelito, a quién le estoy enormemente agradecida, por ayudarme a cerrar este ciclo de mi formación como profesional y porque muuuy a su manera siempre me alentó a seguir adelante.

A mis amigos de la facultad y/o comarca:

Ana, Anayely, Antonio Mozo, Araceli, Axel, Blanca, Christian, Claudia, Gilda, Damián, Daniel, Mayra, Noemí y Omar porque junto a ustedes no solo compartí un salón de clases, sino también muy buenos y malos momentos fuera de el; todos y cada uno de ustedes tienen un lugar en mi corazón.

A Antoñito, Marvin y Paola; con ustedes he compartido mis éxitos y fracasos, risas y hasta lágrimas; ustedes, de una o de otra forma, han sido un gran apoyo cuando sentía que el mundo se iba acabar. Además, de que siempre y en todo momento me dan ánimo para seguir adelante.

MIL GRACIAS!!!

Por ultimo, pero no por ello menos importante a Diana Barrera, por compartir sus conocimientos conmigo además de darme su apoyo y comprensión para la realización de mi servicio social, pero sobre todo por brindarme su amistad.

DEDICATORIAS

A mis dos grandes amores: Miguel y Carmen,
porque con mucho amor y esfuerzo, siempre
me han brindado lo mejor, para hacer que
este sueño, que ustedes tuvieron hace
muchos años, hoy se hiciera realidad. Para y
por ustedes con toda mi admiración y
respeto.

A mis hermanitas: Laura y Berey, por creer en
mi y darme su apoyo incondicional; pero
principalmente les agradezco la paciencia que
han desarrollado para aguantar mis buenos ;) y
malos ratos. Las quiero mucho, mucho,
mucho...!!!!

Í N D I C E

	Página
I. Resumen	1
II. Introducción	3
1. Desarrollo gonadal del ratón	
a) Etapa de cresta genital	4
b) Fase indiferenciada	7
c) Diferenciación testicular	10
2. Genes que participan en la diferenciación testicular	
a) <i>Sry</i>	15
b) Autosomales	16
3. Ciclo celular	24
a) Fases del ciclo celular	25
b) Control del ciclo celular	26
4. El factor de crecimiento similar a insulina tipo II	
a) Organización estructural del gen	30
b) Estructura de la proteína	32
5. Funciones del IGF-II	33
a) Diferenciación	34
b) Regulación de esteroides	35
c) Interacción del IGF-II con los receptores de insulina e IGF-I	36
6. Organización del receptor de IGF-II	
a) Gen	37
b) Proteína	38

	Página
III. Planteamiento del problema e hipótesis	40
IV. Objetivos	41
V. Material y métodos	
a) Animales	42
b) Modelo biológico	42
c) Disgregación testicular	42
d) Cuantificación de las células de Leydig	43
e) Cultivo celular	44
• Determinación de la concentración óptima de IGF-II	44
• Efecto del IGF-II en la proliferación de las células de Leydig	44
f) Preservación de antígenos celulares	45
g) Inmunodetección	45
h) Análisis estadístico	46
VI. Resultados	
1. Inmunodetección de 5-Bromo-2´-deoxi-uridina en el núcleo de las células de Leydig	47
2. Determinación de la concentración óptima de IGF-II	47
3. Efecto del IGF-II en la proliferación de las células de Leydig del testículo del ratón	49
a) En la etapa embrionaria a los 14 d.g.	49
b) En la etapa fetal a los 16 d.g.	50
c) En la etapa prenatal a los 18 d.g.	51
4. Comparación de la proliferación de células de Leydig durante el desarrollo embrionario del testículo del ratón	52

	Página
VII. Discusión	53
VIII. Conclusiones	57
IX. Bibliografía	58
X. Apéndice	70

I. Resumen

El factor de crecimiento similar a Insulina tipo II (IGF-II) es un polipéptido con estructura parecida al de la proinsulina y al factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-I), es producido principalmente por el hígado aunque se ha detectado en muchos otros tejidos. El IGF-II desempeña un papel determinante en el crecimiento y regulación de la función de diversos órganos en los mamíferos y al igual que el IGF-I actúa como un mitógeno favoreciendo la diferenciación y división celular en la etapa gestacional y posiblemente también participa en la regulación metabólica. Sin embargo, su papel es controversial hasta el presente y se desconoce su función en el testículo del ratón en la vida gestacional. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto del IGF-II en la proliferación de las células de Leydig del testículo del ratón embrionario, *in vitro*. Se obtuvieron embriones de 14, 16 y 18 días de gestación (d.g.), se extrajeron los testículos y se hicieron grupos de 45 a 50 gónadas. Éstas se disgregaron con enzimas proteolíticas, se obtuvieron las células de Leydig y se sembraron en Medio Eagle Dulbecco Modificado (D´MEM) con suero bovino fetal (SBF) por 24 horas (hrs). Se lavaron las células con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y se incubaron nuevamente con D´MEM sin SBF. Se determinó que la concentración de IGF-II para inducir el mayor porcentaje de proliferación fue de 100 ng/mL. Se realizaron los experimentos, con un grupo control y otro experimental. El primero se incubó con 5-Bromo-2´-deoxi-uridina (BrdU), y al grupo experimental, además, se le adicionaron 100 ng/mL de IGF-II. Se cultivaron 24 hrs, se retiró el medio y las células se fijaron con glutaraldehído en PBS y después se realizó una inmunodetección.

El porcentaje de proliferación de las células de Leydig a los 14 d.g, fue de 59% en el grupo control y 68% en el tratado. A los 16 d.g, en la etapa fetal, se determinó 59% para el grupo control, comparado con 73% de células de Leydig marcadas con BrdU del grupo experimental. A los 18 d.g se detectó 60% de incorporación de BrdU en el grupo control y 68% en las

células tratadas con IGF-II. Se propone que el IGF-II participa en el desarrollo testicular del ratón a nivel embrionario, al regular la proliferación de las células de Leydig.

II. Introducción

El propósito esencial de la diferenciación sexual, es decir, el desarrollo de las características físicas y del comportamiento de hembras y machos, es el de dotar a estos organismos con la anatomía y fisiología necesaria para que la reproducción sexual ocurra (Wilhelm *et al.*, 2007b).

La determinación sexual en los mamíferos involucra complejas interacciones de redes de señalización, tanto celulares como hormonales, que conducirán a desarrollar el fenotipo masculino o femenino durante la etapa gestacional. El desarrollo sexual es un proceso dinámico sujeto a un programa secuencial, ordenado e interrelacionado que se lleva a cabo en varias etapas consecutivas. La primera fase es la denominada sexo genético, en la cual el sexo genético de los individuos queda determinado. Esto ocurre cuando un espermatozoide portador de un cromosoma X ó Y fertiliza a un ovocito portador de un cromosoma X. En la segunda fase, correspondiente al sexo gonadal, la determinación sexual se produce cuando la vía que sigue la gónada bipotencial es determinada por la expresión de genes ligados al cromosoma "Y", que sirven como generadores de embriones XY, en ausencia de estos genes masculinizantes se diferenciará un ovario. Esta fase se describirá más ampliamente en las siguientes páginas. Simultáneamente al desarrollo gonadal se lleva a cabo la diferenciación de un par de conductos denominados conductos de Wolf y de Müller. La diferenciación genital tanto interna como externa, de machos o hembras es el resultado de la secreción hormonal de los testículos en desarrollo para originar el sexo fenotípico por acción de dos hormonas como se mencionará más adelante (Habert *et al.*, 2001; López-López, 2002).

1. Desarrollo gonadal del ratón

El desarrollo gonadal se puede dividir en 3 etapas; la primera es conocida como cresta genital, la segunda es la fase indiferenciada o gónada bipotencial. La tercera etapa es el desarrollo testicular u ovárico.

a) Etapa de cresta genital

En los ratones esta etapa ocurre en el periodo comprendido entre los 9.5 y los 10.5 d.g. El inicio del desarrollo gonadal ocurre con el establecimiento de la cresta genital. Son las células de la parte caudal de la región intermedia del mesodermo las que dan origen a la cresta genital. Ésta se compone de tres segmentos: 1) los pronefros, ubicados en la parte anterior de la cresta, donde se localiza el primordio adrenal; 2) los mesonefros que corresponde a la región central, de la cual surgen las gónadas (superficie ventromedial, alrededor de los 10 d.g); y 3) los metanefros, localizados en la parte más posterior de esta región, de los cuales se desarrollaran los riñones posteriormente (Villalpando, 2000; Tilmann y Blanche, 2001; Carlson, 2004; Wilhelm *et al.*, 2007b).

Desde el inicio y durante todo el desarrollo gonadal, ocurre la interacción entre dos líneas celulares: las células germinales y las células somáticas. Ambos tipos celulares se encargan de llevar a cabo dos funciones importantes para el organismo (Merchant-Larios y Moreno, 2003).

- Células somáticas, son las que elaboran y secretan proteínas y factores hormonales que participan tanto en la diferenciación sexual a nivel embrionario, como en el mantenimiento de las funciones reproductoras en la etapa adulta.

- Células germinales son las que participan en la proliferación, diferenciación y maduración de gametos (Merchant-Larios, 1991).

Como se mencionó anteriormente, el sexo genético del individuo se establece en el momento de la fertilización. No obstante, existe un periodo en el cual no es posible diferenciar a las células precursoras de los ovocitos y los espermatozoides. Este periodo corresponde al de las células germinales primordiales (CGP) (Merchant-Larios y Moreno, 2003).

Experimentos realizados en aves, demostraron el origen extragonadal de las CGP; mientras que en mamíferos, no se ha hecho una demostración experimental, que apoye el origen. Sin embargo, hay evidencias de que las CGP se ubican en el endodermo del saco vitelino embrionario desde los 5 d.g. (Merchant-Larios,1991).

Las CGP tienen un origen extragonadal, debido a que no surgen de la cresta genital o de los mesonefros, sino que migran desde una fuente completamente distinta de alguna de estas estructuras (Wilhelm *et al.*, 2007b). Las CGP son detectadas en la base del alantoides y después son transportadas por movimientos de reacomodo de los órganos hacia el intestino posterior, quedando ubicadas entre las células epiteliales de este órgano (Merchant-Larios y Moreno, 2003).

En los mamíferos, las CGP se desplazan por dos diferentes tipos de movimiento desde su sitio de origen hasta la región urogenital del embrión, donde se formarán las gónadas. Los movimientos empleados son:

- Pasivo: En este las células se mueven a la par de los tejidos que las rodean y que por crecimiento diferencial del embrión, se desplazan de un lugar a otro.

- Activo: Implica la capacidad motriz de las CGP para desplazarse a través de los tejidos embrionarios (Merchant-Larios, 1991).

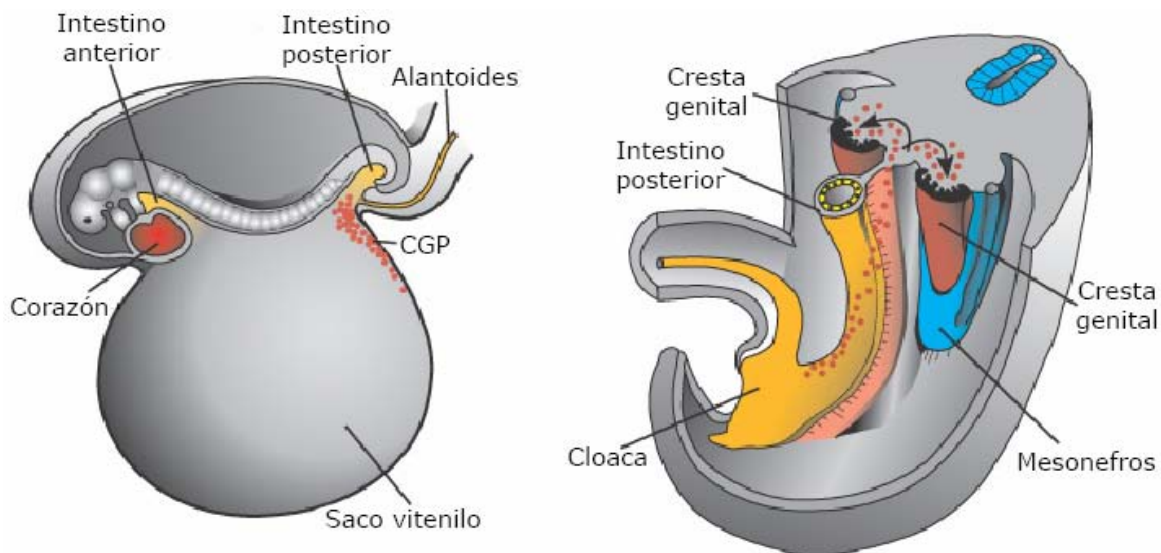


Fig. 1. Las CGP son detectadas en la base de la alantoides, posteriormente migran desde el intestino posterior hasta la cresta genital (Tomada de Sadler, 2004).

Las CGP para poder salir del intestino posterior, deben de romper la lámina basal que las recubre. Para tal efecto, es necesario que las células emitan pseudopodos para desplazarse y que sean capaces de romper la lamina del intestino, secretando enzimas proteolíticas que le permitan llegar hasta las futuras crestas genitales (Merchant-Larios, 1991).

A la fecha se sabe poco sobre los mecanismos que guían a las CGP hasta su ubicación final en las crestas genitales. Estas células se desplazan sobre una monocapa de células mesenquimáticas y sobre colágena a la que se le agrega fibronectina. Se observó que la fibronectina se encuentra concentrada a lo largo del camino que siguen las CGP hacia las crestas genitales. Aunque la fibronectina se ha asociado con el desplazamiento de las CGP, actualmente se sabe que el factor de crecimiento transformante $\beta 1$

(TGF- β 1) es el agente quimiotáctico que guía a estas células hasta las crestas genitales, (Godin y Wylie, 1991).

El inicio de otra fase del desarrollo de las CGP comienza con la llegada de éstas a la gónada y la pérdida de su capacidad para migrar; ahí junto con varias células somáticas, conforman la cresta genital en las que posteriormente se desarrollará la gónada indiferenciada (Merchant-Larios y Moreno, 2003).

Durante la etapa de gónada indiferenciada ocurre la proliferación de células germinales primordiales, mesenquimáticas y endoteliales que darán origen primero a un blastema gonadal y posteriormente a los cordones sexuales que caracterizan a la gónada indiferenciada y que se menciona a continuación (Villalpando, 2000).

b) Fase indiferenciada

Una vez que se ha establecido la cresta genital, y aun cuando el sexo tanto en machos como en hembras, queda determinado por la unión del ovocito y el espermatozoide, existe una etapa en la que no es posible distinguir entre una gónada masculina y otra femenina desde el punto de vista morfológico, es por ello que esta etapa recibe el nombre de fase indiferenciada (Rey, 2001; Carlson, 2004).

La etapa de gónada indiferenciada se lleva a cabo en el ratón entre los 11 y los 11.5 d.g. (Villalpando, 2000); en este estadio, se detecta gran actividad proliferativa de células somáticas (mesenquimáticas y mesoteliales) en la región de la cresta genital (Merchant-Larios y Moreno, 2003). Esto potencia la formación de un agregado compacto denominado blastema gonadal derivado de la condensación de células de origen mesotelial y mesenquimático. De este primordio gonadal se diferenciarán

dos importantes tejidos gonadales: los cordones sexuales, que es el sitio donde se encuentra la mayoría de las CGP que están rodeados por una lámina basal; y el estroma en donde se localizan células de tipo mesenquimático y vasos sanguíneos que llevan sangre a la gónada indiferenciada. Es decir, en esta fase la cresta gonadal es colonizada por CGP y tiene lugar la proliferación de las células somáticas, que darán origen a los tejidos epitelial y estromático que posteriormente servirán como precursores del testículo u ovario en machos o hembras respectivamente.

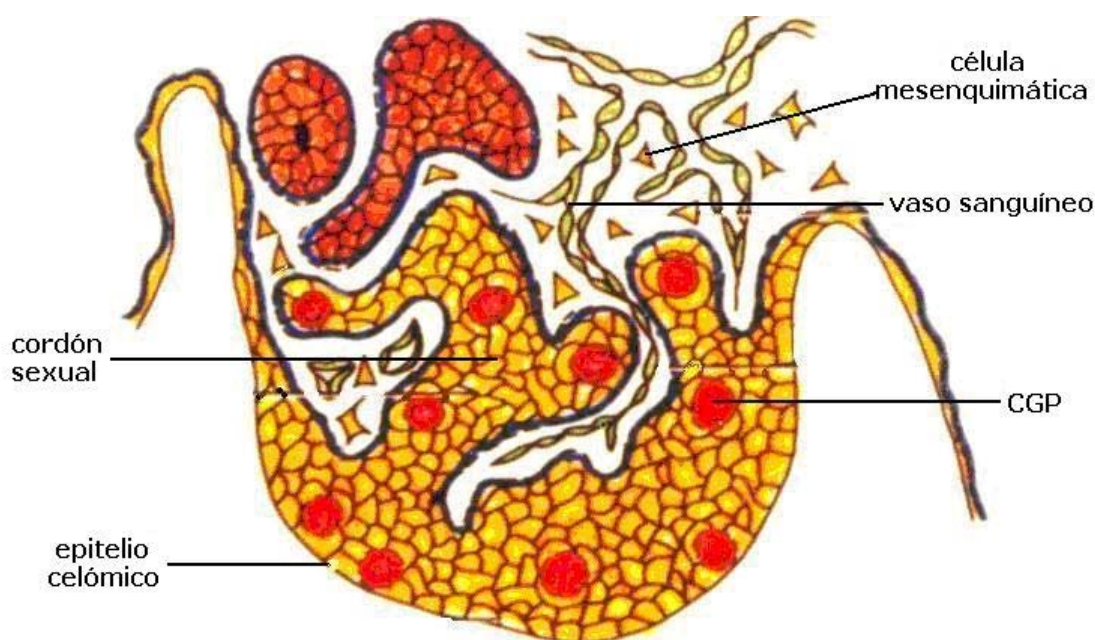


Fig. 2. Esquema de la gónada durante la etapa indiferenciada. En el ratón de los 11 a los 11.5 d.g, ocurre la condensación de células mesenquimáticas y mesoteliales que forman el blastema gonadal y es a partir de éste que se diferencian los cordones sexuales y el estroma (modificada de Merchant-Larios, 1991).

Durante esta misma etapa, tanto en hembras como machos, coexisten 2 tipos de conductos, los de Müller (paramesonéfricos) y los de Wolf (mesonéfricos). Los primeros, son los que dan origen al sistema de conductos en hembras, éstos se diferencian, en trompas de Falopio, útero y

la parte superior de la vagina. Mientras que en los machos, los conductos de Wolf son los progenitores del sistema de conductos que forman parte de los genitales tales como epidídimo, conductos deferentes y vesícula seminal. Sólo un sistema de conductos prevalece y es el que se forma, dependiendo de la presencia o ausencia de hormonas tales como la testosterona y la hormona inhibidora de los conductos de Müller (AMH) (Wilhelm *et al.* 2007b).

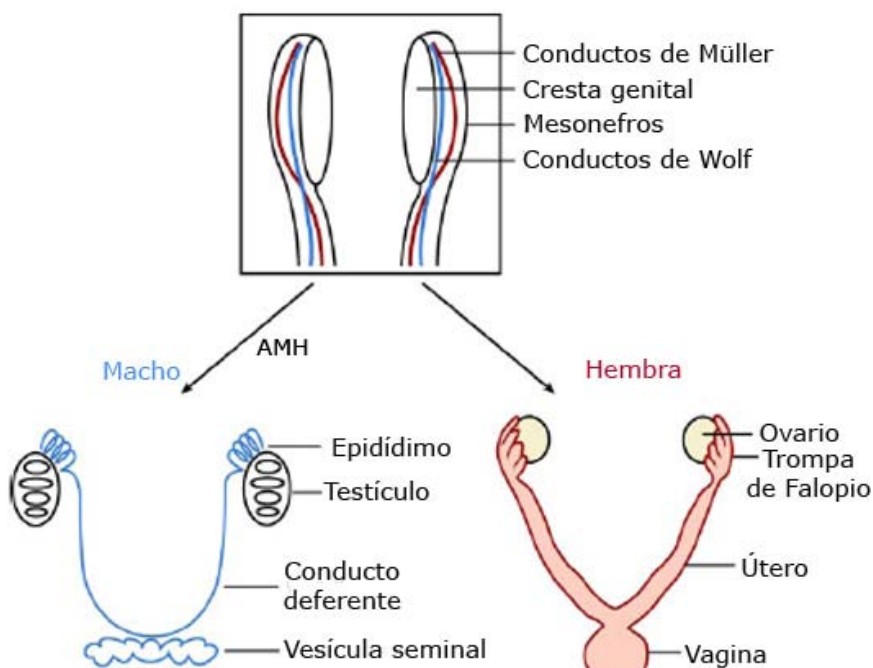


Fig. 3. Desarrollo y diferenciación de los conductos del sistema genital interno. En machos, los conductos de Müller son degenerados por la influencia de la AMH, mientras que los conductos de Wolf se diferencian en epidídimo, conductos deferentes y vesícula seminal por la acción de la testosterona. En hembras, los conductos de Wolf sufren regresión y se diferencian en trompas de Falopio, útero y parte superior de la vagina (modificada de Wilhelm *et al.*, 2007b).

c) Diferenciación testicular

En los mamíferos, la primera manifestación estructural de la diferenciación sexual se detecta en la gónada de los machos (Merchant-Larios, 1991).

Los primeros indicios de diferenciación testicular aparecen, en el ratón, con la formación de cordones cilíndricos, que posteriormente serán los túbulos espermatogénicos (Wilhelm, *et al.* 2007b).

Esta etapa de la diferenciación testicular en el ratón ocurre alrededor de los 12 d.g; y se caracteriza por la separación de los cordones sexuales del epitelio celómico (Merchant-Larios, 1991; Villalpando, 2000). Esta separación se produce tanto por la compactación de los cordones; ahora denominados cordones testiculares, como por la proliferación e invasión de células mesenquimáticas y vasos sanguíneos desde la región mesonéfrica. Además, se lleva a cabo la reubicación de dichos cordones en la parte central del futuro testículo (Villalpando, 2000; Merchant-Larios y Moreno, 2003). Dado el lugar que éstos ocupan en la zona central del testículo, los cordones sexuales reciben el nombre de cordones seminíferos y después serán tubos seminíferos cuando desarrollen un lumen en la etapa postnatal (Merchant-Larios, 1991).

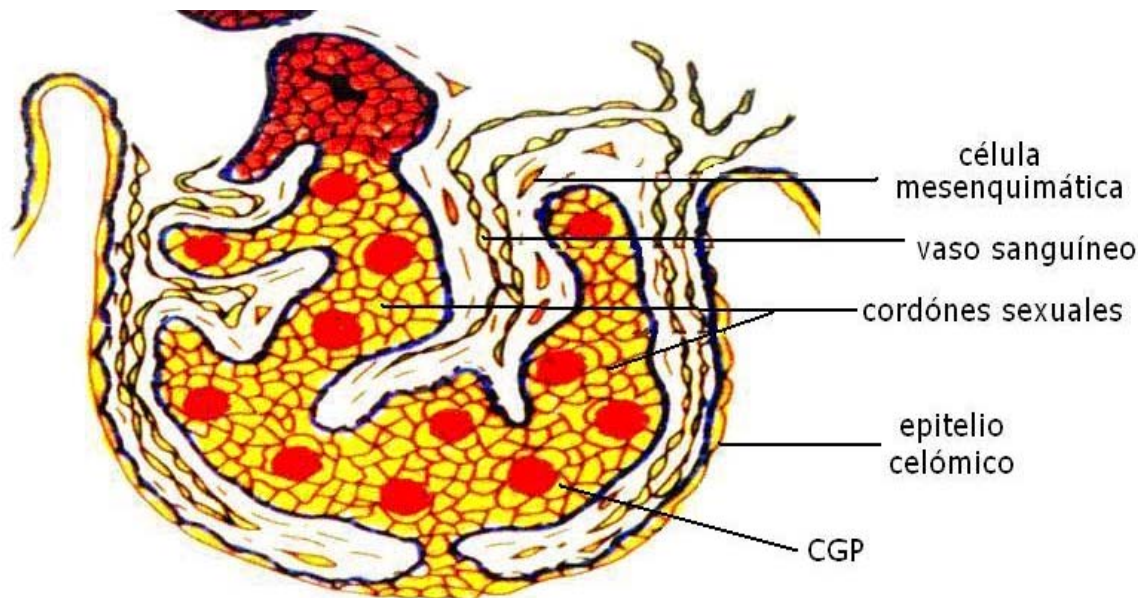


Fig. 4. Diferenciación testicular (12.5 d.g). En esta etapa del desarrollo sexual en machos, se observa la separación de los cordones sexuales del epitelio celómico debido a una activa invasión de células mesenquimáticas y vasos sanguíneos (modificada de Merchant-Larios, 1991).

El testículo se organiza en cordones testiculares o seminíferos y región intersticial (Habert *et al.*, 2001). Los cordones testiculares tienen en su interior, células germinales, agrupadas en la parte central de los mismos, y células pre-Sertoli rodeando a las células germinales. En el tejido intersticial, que rodea a los cordones testiculares, se localizan distintos tipos celulares: células mioides, que se encuentran delimitando al conjunto de células germinales y de Sertoli; fibroblastos, células precursoras de Leydig (importantes por su actividad endócrina) y vasos sanguíneos (Merchant-Larios, 1991; Villalpando, 2000; Wilhelm *et al.*, 2007b).

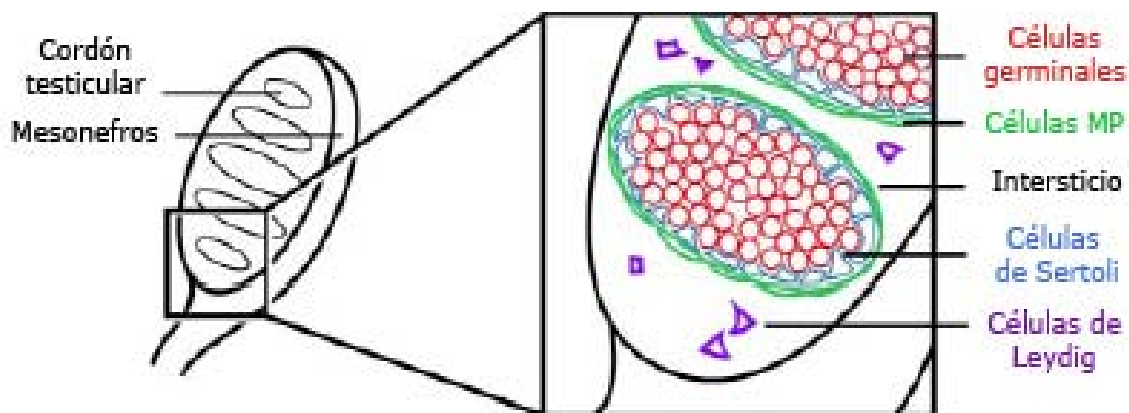


Fig. 5. Representación esquemática del testículo embrionario de ratón a los 13.5 d.g. Se indica la distribución de los diferentes tipos celulares que forman a los cordones testiculares, células germinales y de Sertoli; así como células mioides peritubulares (MP) y células de Leydig en el intersticio. (Modificada de Wilhelm *et al.*, 2007).

Las células de Sertoli, como se menciona en el párrafo anterior, entre múltiples funciones, sirven como sostén de las CGP, además de que sintetizan la hormona inhibidora de los conductos de Müller (AMH) (Merchant-Larios y Moreno, 2003). Se cree que las células de Sertoli actúan como centro organizador en la gónada de machos y orquestan la diferenciación de todos los otros tipos celulares (Wilhelm *et al.*, 2007b).

La AMH o sustancia inhibidora de los conductos de Müller (MIS), es una hormona, miembro de la familia de los factores de crecimiento transformantes- β (TGF- β) y es la primera proteína secretada por estas células somáticas durante la diferenciación testicular y su expresión es independiente de la presencia de las CGP (Merchant-Larios y Moreno, 2003).

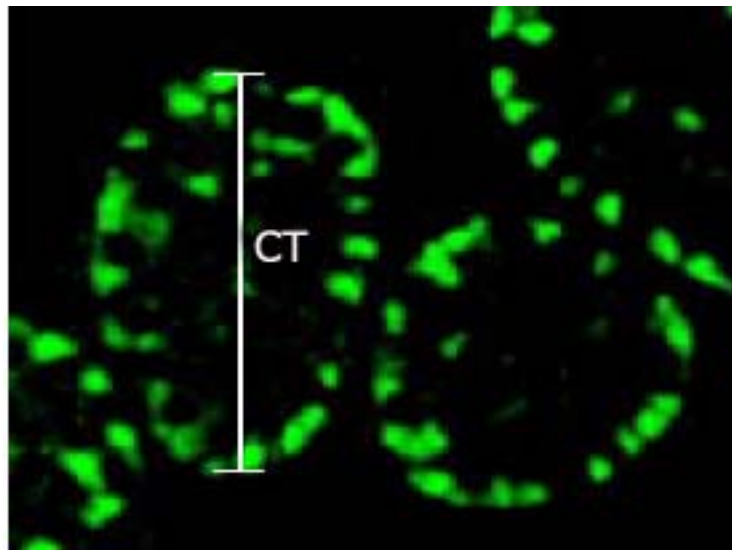


Fig. 6. Ubicación de las células de Sertoli dentro de los cordones testiculares, en cortes de testículo de ratón de 14.5 d.g. Se observa la inmunofluorescencia en las células de Sertoli con un anticuerpo para SOX9 en el interior de los cordones testiculares (CT). (Modificada de Wilhelm *et al.*, 2007).

En el intersticio, el segundo compartimiento del testículo, se diferencian las células esteroidogénicas de Leydig; al poco tiempo de la formación de los cordones testiculares, a los 12.5 d.g. partir de células mesenquimáticas, pero la diferenciación más evidente es a partir de los 14 d.g. en el ratón (Merchant-Larios y Moreno, 2003; Wilhelm *et al.*, 2007b).

Fueron descritas por primera vez en 1850 por Franz Leydig, pero fue hasta más de 50 años después que Bouin y Ancel demostraron, que estas células secretaban una hormona que tiene un papel determinante en el establecimiento y mantenimiento de las características secundarias en el sexo masculino (Revisado por Wilhelm *et al.*, 2007b).

La función principal de estas células es la de producir testosterona a partir del colesterol (Habert *et al.*, 2001). Es frecuente encontrar las células

de Leydig formando grupos cerca de los vasos sanguíneos, de acuerdo con su función androgénica (Wilhelm, *et al.*, 2007b).

La testosterona es requerida para el desarrollo de los conductos de Wolf, por otro lado, la ausencia de esta hormona en hembras provoca la regresión de estos conductos desarrollándose los de Müller (Tilman y Capel, 2001).

En los mamíferos la ontogénesis de la función de las células de Leydig involucra al menos dos generaciones de células; la primera generación se desarrolla durante la etapa fetal, estas células se encargan de la masculinización del sistema urogenital de los machos. La segunda generación aparece durante la pubertad y la testosterona que producen es para iniciar a la espermatogénesis; además del mantenimiento de la función sexual en machos (Habert *et al.*, 2001).

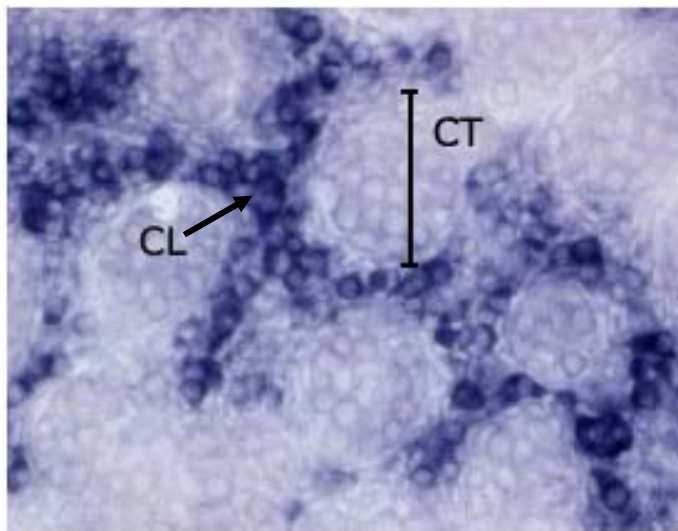


Fig. 7. Localización de las células de Leydig en cortes de testículo de ratón de 14.5 d.g. Se observan a las células de Leydig (CL) en el intersticio del testículo, marcadas por hibridación *in situ* de la enzima 20, 22 desmolasa expresada en estas células. También se observan los cordones testiculares (CT). (Modificada de Wilhelm *et al.*, 2007).

Debido a que la diferenciación de la primera generación de células de Leydig tiene lugar después de que este proceso ocurre en las células de Sertoli, se cree que las primeras lo hacen por acción paracrina de las células de Sertoli (Habert *et al.*, 2001).

2. Genes que participan en la diferenciación testicular

a) *Sry*

El establecimiento del sexo fenotípico, en los mamíferos, es determinada por la presencia o ausencia de un solo gen, de aproximadamente 14 kb, ubicado en la región pseudoautosomal del cromosoma "Y", conocido como factor determinante del testículo (*Sry*) (Habert *et al.*, 2001; Tilmann y Capel, 2001). Se ha planteado que la diferenciación testicular es causada por la expresión del *Sry*, en un subconjunto de células somáticas la cresta genital, que son inducidas a diferenciarse en células de Sertoli y no a las CGP (Koopman *et al.*, 1990; Rossi *et al.*, 1993). Si este gen no está presente, o su función es inapropiada, se formará un ovario (Willhem *et al.*, 2007b). Por lo tanto, *Sry* puede iniciar la vía de masculinización, activando genes específicos del sexo masculino y/o reprimiendo genes específicos, que participan en el desarrollo del ovario (Tilmann y Capel, 2001).

La acción del *Sry* es intracelular y no se difunde; es probable que controle la expresión de otros genes en la misma célula, modificando la producción de un factor o factores responsables de los diversos cambios morfogenéticos necesarios para la diferenciación del testículo a partir de la gónada indiferenciada (Merchant-Larios y Moreno, 2003).

Este gen codifica para una proteína no histona (miembro de la familia llamada "high mobility group Box", HMG. Esta se caracteriza por tener un

dominio que se une a una secuencia específica del ácido desoxiribonucleico (ADN) (Villalpando, 2000; Merchant-Larios y Moreno, 2003; Carlson, 2004; Wilhelm *et al.*, 2007b). Estudios *in vitro* demostraron que el *Sry* se une a una secuencia específica del ADN de manera preferente, provocando una curvatura de 60-85°, en la región a la cual se enlaza. Es probable que con esto, se ponga en contacto y exponga a otros genes involucrados en la determinación testicular (Villalpando, 2000; Wilhelm *et al.*, 2007b).

En los roedores, el *Sry* se observa a los 10.5 d.g. y los niveles mas altos de su expresión se detectan a los 12 d.g, coincidiendo con el momento en que ocurre el desarrollo testicular en esta especie (Hacker *et al.*, 1995; Wilhelm *et al.*, 2007b).

Aunque el *Sry* se descubrió *in vivo* hace 15 años, no se ha identificado su gen blanco. Sin embargo, hasta el momento, el mejor candidato es *Sox9*, que comienza a expresarse inmediatamente después de *Sry* y en un patrón espacial muy similar (Wilhelm *et al.*, 2007).

b) Autosomales

Se han identificado varios genes de gran importancia, para dar inicio a la formación de la cresta genital; entre ellos se encuentran: el gen supresor del tumor de Wilms (*Wt1*), el factor esteroidogénico (*Sf1*), *Lhx9*, *Emx2* y *M33* (Wilhelm *et al.*, 2007b). Pero se ha visto que se requiere de la función de al menos dos de estos genes: *Wt1* y *Sf1* para el establecimiento de la cresta genital (Carlson, 2004).

Wt1: Se ha observado que su expresión es desde los 9 d.g., aunque es más evidente a los 12 d.g. y es predominante en cresta genital, mesonefros, riñón y en la gónada. Sin embargo, después de este periodo no

es detectable en el tejido gonadal (Armstrong *et al.*, 1993; Merchant-Larios y Moreno, 2003).

Se sabe que de la expresión de *Wt1*, depende el establecimiento y mantenimiento de la gónada indiferenciada en los mamíferos ya que mutaciones en este gen provocan el síndrome de Denys-Rash que se caracteriza por fallas renales y anomalías tanto gonadales como genitales (Villalpando, 2000).

Wt1 codifica una proteína nuclear con dominios de dedos de zinc que puede actuar como activador o represor transcripcional según el contexto promotor y tipo celular sobre el que actúe. La carencia de tres aminoácidos (KTS) entre tres o cuatro dedos de zinc mostró en ratones de ambos sexos, una notoria reducción gonadal y falta de diferenciación, sugiriendo que *Wt1* se requiere para la supervivencia y diferenciación de células gonadales, posiblemente mediante su función como un activador transcripcional. A la fecha *Sf1*, entre otros genes, ha mostrado ser activado por esta isoforma de *Wt1 in vitro*, sugiriendo que *Sf1* es un blanco genuino de *Wt1* (Wilhelm y Englert, 2002).

Sf1: se expresa durante el desarrollo de la cresta genital (9–10 d.g). Entre los 12.5 y 15 d.g cuando ya ocurrió la diferenciación sexual el *Sf1* se puede detectar en niveles altos en los cordones sexuales, tanto en células de Leydig (esteroidogénicas) como en las de Sertoli (no esteroidogénicas). Se ha observado que la falta de funcionalidad de este gen en los ratones provoca falla completa de la adrenal y del desarrollo gonadal, obesidad y anomalías de la hipófisis y de gonadotropinas trayendo como consecuencia que no haya producción de hormonas esteroides sexuales, como progesterona, testosterona y estradiol. Tampoco hay síntesis de corticoesteroides, conduciendo a una insuficiencia renal por lo que los

animales mueren a los 10 días de nacimiento (Villalpando, 2000; Merchant-Larios y Moreno, 2003; Wilhelm *et al.*, 2007b).

Lhx9: Este gen se expresa en la cresta genital del ratón embrionario a los 9.5 d.g. Se ha observado que *Lhx9* y *Wt1* pueden unirse directamente al promotor de *Sf1* y tener un efecto aditivo para su activación *in vitro* (Wilhelm y Englert, 2002). La deficiencia de *Lhx9* en la cresta genital disminuye drásticamente la expresión de *Sf1*, lo que indica que *Lhx9* puede encontrarse corriente arriba de *Sf1* en la cascada de desarrollo (Birk *et al.*, 2000).

Emx2: Se expresa en el epitelio de los componentes del sistema urogenital durante su desarrollo. En ratones que presentan mutaciones en este gen, carecen completamente de tracto genital y de gónadas (Miyamoto *et al.*, 1997; Wilhelm *et al.*, 2007b). Sin embargo, aún se desconoce la regulación y posibles genes blancos de este gen durante el desarrollo temprano gonadal (Wilhelm *et al.*, 2007b).

M33: Recientemente, se ha asociado a este en la regulación de *Sf1* para su expresión en el bazo y la glándula adrenal (Kato-Fukui *et al.*, 2005). La deficiencia de *M33* en ratones XY provoca reversión sexual, posiblemente por interferir en la vía del *Sry* (Kato-Fukui *et al.*, 1998).

Sox9: Se expresa en bajas concentraciones en la gónada indiferenciada alrededor de los 10.5 d.g (Morais da Silva *et al.*, 1996; Kent *et al.*, 1996; Wilhelm *et al.*, 2007b). En contraste con *Sry*, la expresión de este gen se mantiene en el núcleo de las células precursoras de Sertoli después de los 11.5 d.g y aun después del nacimiento en gónadas XY. En humanos y ratones con anomalías en este gen, además de manifestar displasia campomélica (solo en humanos), muestran reversión sexual; lo cual sugiere que *Sox9* es necesario para el desarrollo sexual en machos

(Barrionuevo *et al.*, 2006; Merchant-Larios y Moreno, 2003). *Sox9* no sólo es necesario sino también es suficiente para el desarrollo sexual en machos. Se ha visto que ratones XX que sobreexpresan este gen se desarrollan como machos, esto sugiere que *Sox9* es blanco importante de *Sry* (Vidal *et al.*, 2001).

Por otro lado, estudios recientes en torno a este gen demostraron que el gen de prostaglandina D sintasa (*Pgds*) es regulado, *in vivo*, por *Sox9* (Wilhelm *et al.*, 2007a).

Fgf9: codifica para el factor de crecimiento 9 de fibroblastos (FGF9), su gen se expresa desde los 11.5 d.g. en ambos sexos. Posteriormente su detección queda restringida, a los cordones testiculares (Tilmann y Capel, 2001; Wilhelm *et al.*, 2007b). Se ha demostrado que este gen es necesario en la vía de diferenciación de machos, actuando justamente corriente abajo del *Sry*, regulando positivamente la proliferación de las células precursoras de Sertoli (Tilmann y Capel, 2001; Schmahl *et al.*, 2004).

Dax1: la proteína para la cual codifica este gen (ubicado en el cromosoma X), pertenece a una familia de receptores nucleares y se expresa a los 11.5 d.g en células somáticas de la cresta genital tanto de hembras como de machos; en estos últimos, los niveles de expresión de este gen empiezan a decrecer conforme se empiezan a formarse los cordones testiculares (Merchant-Larios y Moreno, 2003).

Dhh: este es otro gen que se expresa en células somáticas desde los 11.5 d.g, posteriormente, de manera específica, en células de Sertoli a los 12.5 d.g y codifica para la molécula de señalización "desert hedgehog" (DHH); su receptor, "Patched 1", (PTCH1) es expresado en células del intersticio (Bitgood *et al.*, 1996). Observaciones hechas en ratones con mutaciones en este gen sugieren que *Dhh* es necesario para la

diferenciación de las células de Leydig, al inducir una regulación positiva de *Sf1* en estas células (Bitgood *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 2002).

Pgds: se expresa en niveles relativamente altos en testículo y tracto reproductivo en numerosas especies, entre ellas el ratón (Baker y O'Shaughnessy, 2001). Esta enzima es la encargada de catalizar la isomerización de PGH_2 , un precursor común de varias prostaglandinas (Wilhelm *et al.*, 2007a). Experimentos *in vitro* demostraron que la prostaglandina D_2 (PGD_2), es producida y secretada por las células de Sertoli, además de que es necesaria y suficiente para el reclutamiento de células que no expresan *Sry* para expresar *Sox9* y diferenciarse en células de Sertoli. La vía de señalización paracrina de PGD_2 funciona como un mecanismo de respaldo parcial, en caso de que haya una alteración en la función del *Sry*, y así asegurar que el número de células de Sertoli sea alcanzado y entonces iniciar la diferenciación sexual masculina (Wilhelm *et al.*, 2007b).

Amh: Es la molécula más estudiada que se expresa en las células de Sertoli a los 12.5 d.g (Münsterberg y Lovell-Badge, 1991), y es la responsable de la regresión de los conductos de Müller por apoptosis. El receptor tipo II de esta hormona (MISIR) se expresa en el mesénquima que rodea a los conductos de Müller en animales XY y XX, y en las células de Sertoli y de la granulosa de embriones y en testículo y ovario de adultos (Wilhelm *et al.*, 2007b).

Lim1 o *Lhx 1*: Este gen está involucrado en la formación temprana de las gónadas de ambos sexos, ya que tiene un papel importante en el desarrollo de los conductos sexuales tanto en hembras como en machos. (Wilhelm *et al.*, 2007b).

Dmrt1: Este gen se expresa desde etapas tempranas del desarrollo gonadal en ambos sexos, en el ratón, entre los 13.5 y 14.5 d.g., *Dmrt1* se expresa específicamente, en los cordones seminíferos, tanto en células de Sertoli y CGP (Raymond *et al.*, 1999). *DMRT1* es junto con *Sry*, el único gen regulador, conocido por ser expresado exclusivamente en la cresta genital de mamíferos antes de la diferenciación sexual (Raymond *et al.*, 1999).

Tabla 1. Genes implicados en el desarrollo sexual en los mamíferos

Gónada Bipotencial

Gen	Función de la proteína	Fenotipo en la gónada de ratones por carencia del gen
<i>Wt1</i>	Factor de transcripción; establecimiento temprano de las gónadas y riñones, posible regulador en la expresión de <i>Sry</i> .	Bloqueo en el desarrollo de la cresta genital
<i>Sf1</i>	Receptor nuclear; establecimiento temprano de las gónadas, regulador de genes para la producción de esteroides.	Bloqueo en el desarrollo de la cresta genital
<i>Lhx9</i>	Factor de transcripción; establecimiento temprano de las gónadas.	Bloqueo en el desarrollo de la cresta genital
<i>Emx2</i>	Factor de transcripción; establecimiento temprano de las gónadas.	Bloqueo en el desarrollo de la cresta genital
<i>M33</i>	Factor de transcripción	Disgenesia gonadal

(Adaptada de Tilmann y Capel, 2002; Wilhelm *et al.*, 2007).

Tabla 2. Genes implicados en el desarrollo sexual en los mamíferos

Determinación testicular

Gen	Función de la proteína	Fenotipo en los ratones de la gónada nulo
<i>Sry</i>	Factor de transcripción; gen determinante testicular	Reversión sexual en XY
<i>Sox9</i>	Factor de transcripción; diferenciación de las células de Leydig, iniciación del desarrollo testicular, regulación de la expresión de <i>Pgds</i>	Reversión sexual en XY
<i>Fgf9</i>	Molécula de señalización; proliferación en gónadas masculinas	Reversión sexual en XY
<i>Dax1</i>	Receptor nuclear	Alteraciones en la formación de los cordones de testiculares y la espermatogénesis
<i>Dhh</i>	Molécula de señalización; reguladora de las interacciones de células de Sertoli – miodos y células Sertoli –Leydig, desarrollo de células germinales masculinas	Alteración en la diferenciación de células de Leydig y miodos peritubulares
<i>Pgds</i>	Enzima que cataliza la isomerización de PGH ₂	No fenotipo
<i>Amh</i>	Hormona; regresión de los conductos de Müller	No degeneración de los conductos de Müller
<i>Lim1</i>	Factor de transcripción	Agenésis de los conductos de Wolff y de Müller
<i>Dmrt1</i>	Factor de transcripción; mantenimiento de los túbulos seminíferos después del nacimiento	Pérdida de células de Sertoli y germinales

(Adaptada de Tilmann y Capel, 2002; Wilhelm *et al.*, 2007).

DETERMINACIÓN SEXUAL EN LOS MAMÍFEROS

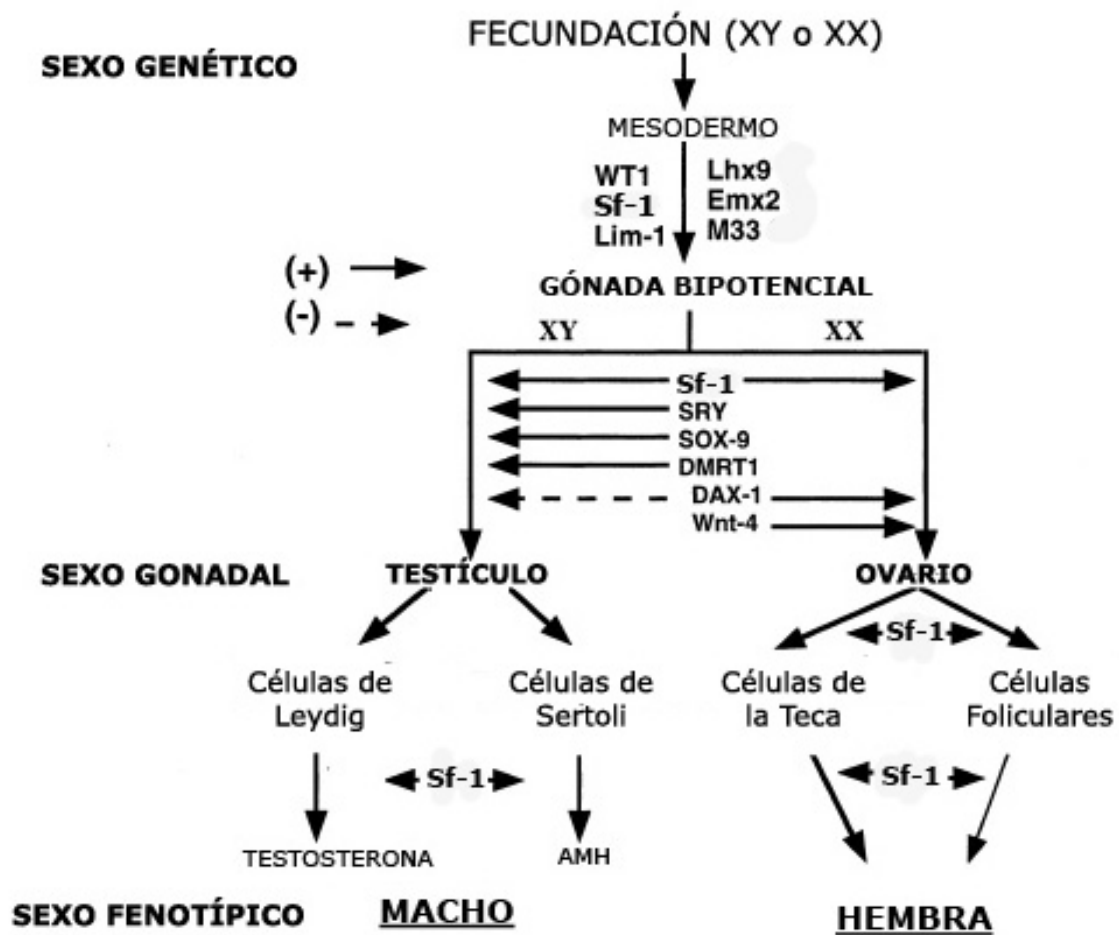


Fig. 8. Determinación sexual en los mamíferos. Esquema de la determinación sexual en mamíferos y los genes involucrados en diferenciación de machos y hembras. (Modificada de Habert *et al.*, 2001).

3. Ciclo celular

Todos los seres vivos tienen como misión fundamental la de reproducirse, preservando sus características esenciales a través de las generaciones. Al reproducirse, las células de los diferentes organismos tendrán que asegurar que todo su material se reparta en forma aproximadamente equitativa entre las células hijas resultantes. Sin embargo, el ADN debe ser duplicado exactamente, ya que es la molécula encargada de definir a los diferentes organismos y la responsable de la herencia. Los acontecimientos que ocurren durante la reproducción celular están comprendidos dentro del proceso conocido como ciclo celular. (Vázquez-Ramos, 2003).

El ciclo celular está constituido por cuatro etapas: las fases G1, S y G2, que en conjunto constituyen la denominada interfase, y la fase M o mitosis (Griffiths *et al.*, 2002).

El núcleo se encuentra en interfase, dirigiendo las actividades sintéticas de la célula y preparándose para la siguiente división mitótica. Durante la interfase, se duplican todos los componentes celulares incluyendo el ADN; es por esto que una célula pasa la mayor parte del tiempo en fase de crecimiento (Cervantes-Peredo, 2004).

La división celular o mitosis ocupa una pequeña porción del ciclo celular. Es un proceso continuo de eventos nucleares y citoplasmáticos, que incluye: la profase, metafase, anafase y citocinesis (Cervantes-Peredo, 2004).

a) Fases del ciclo celular

Fase G1: es en esta fase donde la célula toma la decisión de dividirse nuevamente. Este periodo transcurre entre el fin de una mitosis y el inicio de la síntesis del ADN. La duración de esta fase es muy variable e incluso hay células que se encuentran permanentemente en ella, entrando en una fase G0. En la fase G1 las células se preparan para la división, por lo que hay una intensa actividad metabólica, donde la célula aumenta de tamaño (Cervantes-Peredo, 2004).

Las células postmitóticas de organismos multicelulares pueden "salir" del ciclo celular y permanecer sin proliferar durante días, semanas o en algunos casos durante toda la vida del organismo (es el caso de la mayoría de las neuronas, las células del músculo esquelético o de las células del cristalino del ojo). Estas células abandonan el ciclo celular en fase G1 y entran en una fase llamada G0 para diferenciarse.

Fase de síntesis o S: es la porción limitada de la interfase en la cual la cromatina es replicada. Durante este mismo periodo disminuye de manera considerable los procesos de transcripción y traducción, ya que el ADN está ocupado por los complejos de replicación; no obstante, hay síntesis de proteínas histonas para el ensamblado de la cromatina (Cervantes-Peredo, 2004). Antes de que se lleve a cabo la mitosis, deben generarse dos moléculas de ADN idénticas para ser repartidas entre las dos células hijas.

Fase G2: inicia cuando se ha completado la duplicación del material genético y termina cuando la célula entra en mitosis. En esta fase, la célula se prepara para entrar a mitosis, por lo que también hay actividad metabólica. La duración es más uniforme, no obstante, cuando el material genético sufre algún daño, este periodo puede alargarse para permitir su

reparación antes de ser repartido a las células hijas (Cervantes-Peredo, 2004).

Mitosis: es el proceso de división celular por el cual, a partir de una célula madre, se originan dos células hijas con el mismo número de cromosomas y con idéntica información genética que la célula inicial (Vázquez-Ramos, 2003).

Las células eucariontes han desarrollado sistemas de señalización intercelular que les permiten evaluar las condiciones de su entorno. Existen determinadas señales que estimulan la proliferación celular mientras que otras la inhiben (Griffiths *et al.*, 2002).

b) Control del ciclo celular

Es esencial que las diferentes fases del ciclo celular estén correctamente coordinadas, es decir, deben seguir un orden estricto y cada una de ellas deben ser completadas antes de que se inicie la siguiente. Los errores que surgen durante la coordinación del proceso pueden conducir a alteraciones cromosómicas importantes, como por ejemplo a la pérdida de cromosomas completos o parte de ellos, o a la distribución inadecuada del material genético en las dos células hijas. Las moléculas encargadas de la progresión del ciclo celular son una serie de complejos proteicos formado por dos subunidades: una ciclina y una proteína cinasa dependiente de ciclina (CDK) (Griffiths *et al.*, 2002; Cervantes-Peredo, 2004).

Las ciclinas reciben este nombre porque cada una de ellas están presentes en determinado momento del ciclo celular. La aparición de una determinada ciclina está regulada transcripcionalmente por el ciclo: de manera que un complejo ciclina-CDK activo conduce a la activación de un

factor transcripcional que, a su vez, activa la transcripción de esta nueva ciclina (Griffiths *et al.*, 2002).

Las CDK, como su nombre lo indica, son proteínas cuya actividad se encuentra regulada por su ciclina correspondiente y catalizan la fosforilación de determinados residuos de serina y treonina de la proteína diana (Griffiths *et al.*, 2002).

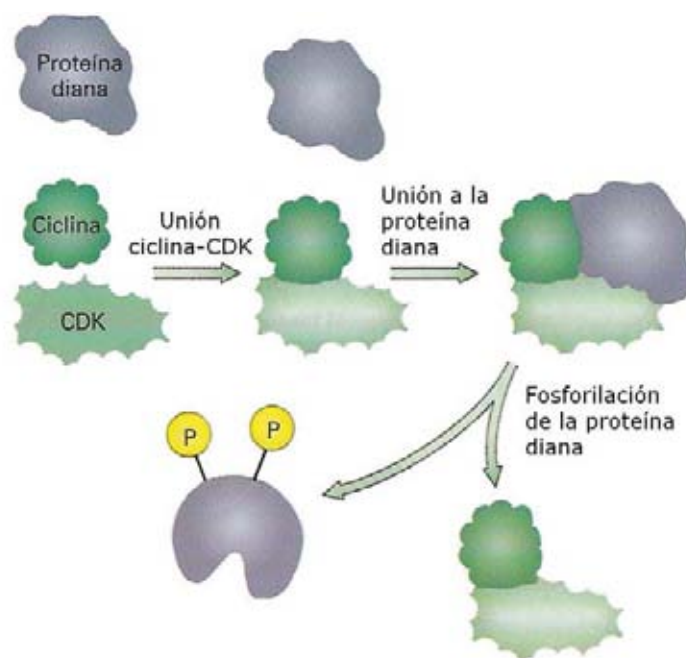


Fig. 9. Pasos en la fosforilación de las proteínas diana por el complejo ciclina-CDK. Primero, se produce la unión de una ciclina y de una CDK para formar un complejo ciclina-CDK activo. Entonces, la proteína diana se une al complejo por la parte de la ciclina, y así se colocan los sitios de fosforilación próximos al centro activo de la CDK. Una vez que la proteína diana es fosforilada, pierde la capacidad de unión a la ciclina y es liberada del complejo. Tomada de Griffiths *et al.*, 2002.

La ciclina asociada es el factor que determina qué proteínas son fosforiladas por cada CDK. La ciclina sujeta a la proteína para que la cinasa pueda fosforilarla, modificando la actividad de la proteína (Griffiths *et al.*, 2002).

Las ciclinas presentes en cada fase del ciclo celular son diferentes, por lo que cada una de estas fases se caracteriza por la fosforilación de un conjunto específico de proteínas (Griffiths *et al.*, 2002).

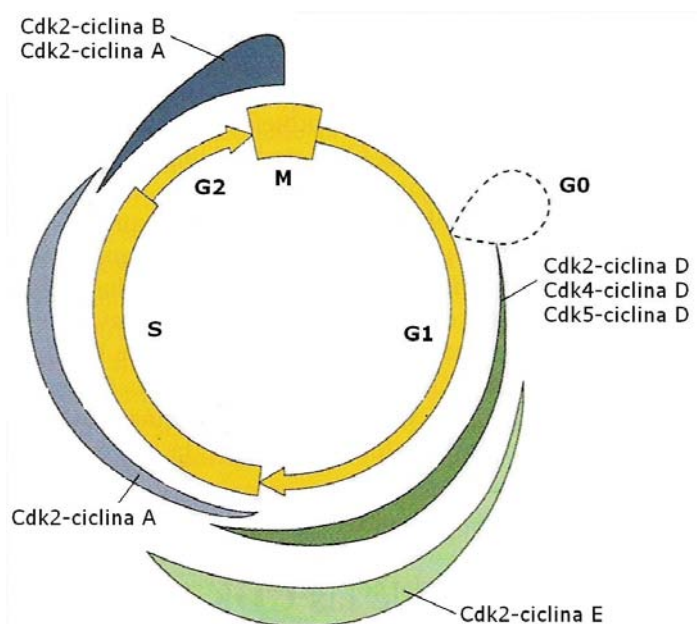


Fig. 10. Participación de los diferentes complejos ciclina-CDK a lo largo del ciclo celular de una célula de mamífero. La anchura de las bandas refleja las actividades relativas de los diferentes complejos ciclina-CDK. Diferentes ciclinas se pueden unir a distintas CDK para formar diversos complejos, aumentando así el número de combinaciones ciclina-CDK que pueden formarse durante el ciclo celular. Tomada de Griffiths *et al.*, 2002.

La fosforilación inicia una serie de sucesos que culmina con la activación de factores de transcripción concretos. Estos factores de transcripción promueven la expresión de determinados genes cuyos

productos son necesarios en la siguiente fase del ciclo celular (Griffiths *et al.*, 2002).

Desde la fase M tardía hasta la mitad de la fase G1, las proteínas Rb y E2F constituyen un complejo inactivo, y por tanto incapaz de promover la transcripción. En la fase G1 tardía, aparece el complejo Cdk2-ciclina E, que fosforila la proteína Rb. Esta fosforilación produce un cambio conformacional que provoca su disociación del factor E2F. La proteína E2F libre activa la transcripción de un grupo de genes que cifran enzimas esenciales para la replicación del ADN. Las células se encuentran ahora en disposición de proceder a la fase S (Griffiths *et al.*, 2002)

Al no ser fosforilada la proteína Rb, esta no presenta actividad alguna; ya que, como se mencionó anterior mente, la función de la proteína Rb en el ciclo celular es impedir la activación del factor de transcripción E2F. Por lo tanto, al mantener Rb activada, se bloquea la acción del factor E2F y se impide la progresión del ciclo celular (Griffiths *et al.*, 2002).

Además de los complejos ciclina-CDK, para la regulación del ciclo celular, participan otras proteínas que actúan como reguladores positivos y que codifican para factores de crecimiento, sus receptores, proteínas que participan en la transducción de señales y factores de transcripción necesarios para que la célula replique su ADN. Los genes que codifican para estos reguladores positivos del ciclo celular se conocen como proto-oncogenes, ya que su expresión aumentada o inadecuada los convierte en oncogenes. Además existen genes reguladores negativos del ciclo que actúan inhibiendo la división celular, conocidos como genes supresores de tumores, los cuales codifican principalmente para factores de transcripción o sus reguladores (Cervantes-Peredo, 2004).

4. El factor de crecimiento similar a insulina tipo II

Los factores de crecimiento similares a insulina (IGFs) comenzaron a estudiarse por su capacidad para estimular la sulfatación de cartílago, además de que sirven como mediadores de la hormona de crecimiento. En un principio fueron denominadas somatomedina A y C, para el IGF-II e IGF-I respectivamente (O´Dell y Day, 1998; Leal-Guadarrama *et al.*, 2003).

Se observó que los IGFs tienen un alto grado de homología y efecto similar a la insulina al incorporar glucosa a la célula; sin embargo, aunque los IGFs se unen al receptor de insulina con poca afinidad, éstos cuentan con receptores especiales para cada uno de ellos.

El IGF-II forma parte de un complejo sistema, el cual está formado por péptidos (IGFs), receptores celulares con los que puede interactuar y proteínas de unión circulantes que regulan sus funciones. Donde cada uno de estos miembros son de gran importancia para un adecuado desarrollo de los seres vivos, desde etapas gestantes hasta la vida adulta (Pavelić *et al.*, 2007).

a) Organización estructural del gen

El *Igf-II* tiene una longitud de 12 kb aproximadamente, se localiza en la región distal del cromosoma 7 del ratón, cerca del gen de la insulina donde ambos comparten la misma polaridad de transcripción y está constituido por 6 exones, 5 intrones y 2 pseudoexones (Rotwein y Hall, 1990; Hu *et al.*, 1995). En el humano, se le asignó el número 11p15 al gen del *IGF-II* (Brissenden *et al.*, 1984), el cual tiene una longitud 30 kb y está conformado por 9 exones y 4 promotores (O´Dell y Day., 1998). El gen del *Igf-II* se caracteriza por ser de tipo impronta paternal (esto se refiere a que

solo uno de los alelos es expresado) y tejido específico (DeChiara *et al.*, 1991; Beechey *et al.*, 1996).

En el gen del *Igf-II* del ratón, los exones 1-3 codifican para distintas regiones y son transcritas por 3 promotores distintos, denominados P1, P2 y P3, cada uno acompañado por sus respectivos exones. Cada uno de los promotores 2 y 3 contienen una caja TATA; en contraste con éstos el promotor 1 carece de esta caja y otras secuencias típicas de control transcripcional. El exón 1 tiene 3 grandes sitios de inicio de la transcripción distribuidos en 556 nucleótidos, los exones 4–6 son los que codifican para el precursor de IGF-II de 180 aminoácidos. Por otro lado, los 2 pseudo-exones parecen ser restos evolutivamente conservados de un caja promotor-exón alternativo que está activo en el IGF-II humano. La pérdida del homólogo de este promotor, que dirige la expresión (específicamente en el adulto) del gen del IGF-II en algunos tejidos humanos, puede explicar la desaparición del IGF-II de la mayoría de los tejidos del ratón durante el periodo postnatal temprano (Rotwein y Hall, 1990).

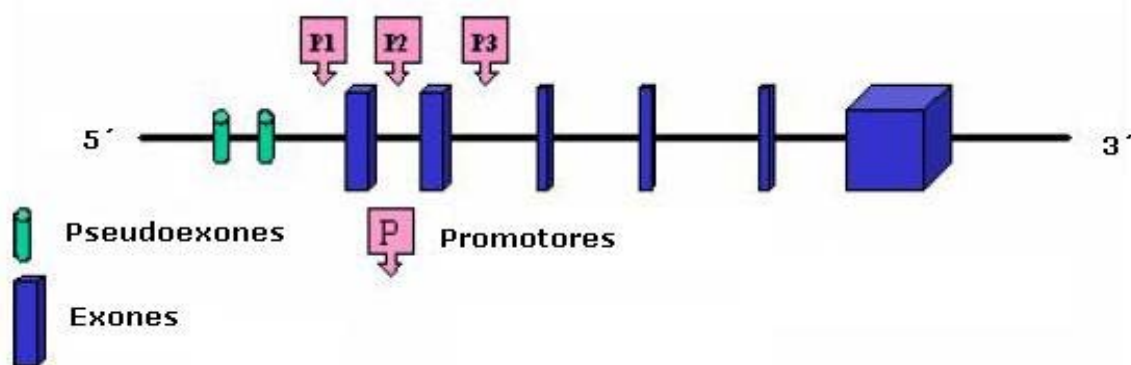


Fig. 11. Organización del gen *Igf-II* en el ratón. EL *Igf-II* se localiza en el cromosoma 7 del ratón y tiene una longitud de aproximadamente 12 kb. Además, el *Igf-II*, está formado por 6 exones, 3 promotores y 2 pseudoexones (Tomada y modifica de Rotwein y Hall, 1990; Hu *et al.*, 1995).

En el laboratorio del departamento de Biología celular y Fisiología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), demostraron la expresión del ARNm del *Igf-II* desde etapas tempranas de la diferenciación testicular a los 12 d.g y los niveles más altos de transcritos del *Igf-II* se detectaron de los 16 a los 18 d.g (Franco-Carrera, 2006). En este mismo trabajo, se observó que la insulina participa como un regulador negativo de la expresión del *Igf-II* en el testículo de ratón, al hacer indetectables los transcritos del *Igf-II* de los 12 a los 14 d.g. y disminuir de manera considerable los niveles de expresión durante las etapas fetal y prenatal, de los 16 y 18 d.g. respectivamente.

b) Estructura de la proteína

El IGF-II es un péptido pequeño, que guarda una alta homología con el IGF-I (70 aminoácidos –aa-), está formado por 67 aa. y con un peso molecular de 7.5 kDa (Daughaday y Rotwein, 1989; O´Dell y Day, 1998; Pavelić *et al.*, 2007). El IGF-II es sintetizado a partir de una molécula precursora denominada prepo- IGF-II, la cual está formada por 180 aa. y dividida en 6 dominios, uno de ellos es el péptido señal, de 24 aa.; mientras que el péptido que contiene al carboxilo terminal (péptido E) está formado por 89 aa.; ambos son eliminados post-traduccionalmente para dar como resultado una proteína monomérica con el número de aa. y peso molecular antes mencionados (O´Dell y Day, 1998; Pavelić *et al.*, 2007).

Los IGFs se dividen en 4 dominios (denominados con las primeras letras del alfabeto). Para el caso particular del IGF-II en el dominio B está constituido por 29 aa. Dentro de éste se localiza la región que participa en el reconocimiento del receptor tipo 1 (IGF-R1) que es la misma región que se une al receptor de la insulina (IR) (O´Dell y Day, 1998). Sin embargo, el péptido que determina la preferencia de unión al IGF-R1, es el domino C (de 5 aa.); por otro lado, de los 21 aa. que forman el dominio A, 3 residuos son

determinantes en la afinidad por el receptor tipo 2 (IGF-R2) por este factor, por ultimo el dominio D que está formado por 12 aa. (Denley *et al.*, 2005; Pavelić *et al.*, 2007).

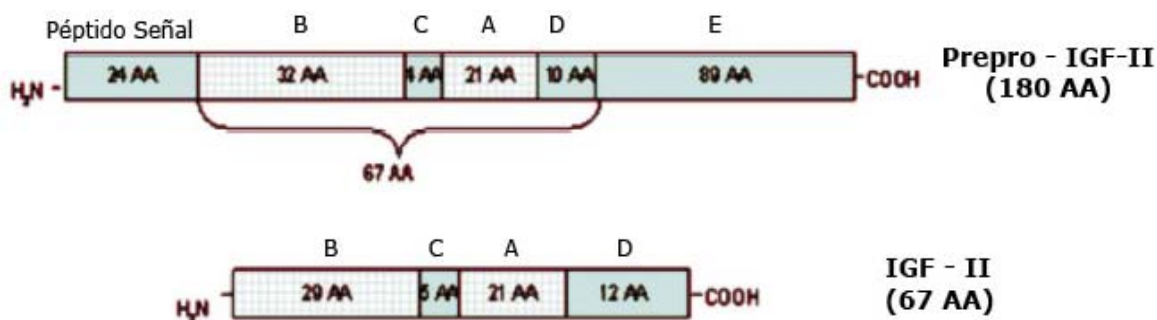


Fig. 12. Estructura de la preprohormona y hormona del IGF-II. La preprohormona del IGF-II se divide en 6 dominios, de los cuales el péptido señal y el dominio E son eliminados post-traduccionalmente y sólo 4 dominios (B, C, A y D) son los que conforman al péptido del IGF-II (Tomada y modificada de Pavelić *et al.* 2007).

5. Funciones del IGF-II

Los IGF-I e IGF-II pueden actuar cerca o en el mismo lugar donde se expresan, es decir, de forma autócrina y paracrina, o bien de manera endócrina, al ejercer sus efectos sobre células distantes (Foulstone *et al.*, 2005).

Experimentos realizados en ratones modificados genéticamente para no expresar los genes de los IGFs, demostraron la importancia de estos y sus receptores. Al mutar el gen del IGF-II se observa un significativo retraso en el crecimiento fetal, especialmente durante las primeras etapas de gestación (DeChiara *et al.*, 1990; Baker *et al.*, 1993).

Los ratones que presentan la doble mutación del gen del IGF-II y del IGF-R1 mostraron un gran retraso en el crecimiento, en comparación con los que sólo tenían mutado el gen del IGF-R1; ésto llevó a la conclusión de que no sólo el IGF-R2 interviene en el crecimiento por acción del IGF-II (Baker *et al.*, 1993).

En humanos a diferencia de los ratones, la expresión del IGF-II continúa después del nacimiento (O'Dell y Day, 1998). Se ha descrito que los niveles de IGF-II en el humano durante la etapa gestacional van de los $102 \pm 30 \mu\text{g/L}$ a $282 \pm 5 \mu\text{g/L}$, mientras que las concentraciones encontrados en el suero fetal de rata fueron de 1.8 a 4.4 $\mu\text{g/mL}$, no obstante, después del nacimiento la cantidad de IGF-II en suero es indetectable (Moses *et al.*, 1980)

a) Diferenciación

Estudios realizados en cultivos celulares demostraron el efecto de los IGFs en la diferenciación de las células de origen mesodérmico (Revisado por Humbel, 1990). Uno de estos experimentos se realizó utilizando paredes corporales de embriones de pollo, que al ser incubadas con IGFs, se diferenciaban en células musculares. Además, se observó un incremento en la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (Schmid *et al.*, 1983). Por otro lado, estudios *in vitro* con líneas celulares de músculo esquelético de roedores, demostraron que la secreción autócrina del IGF-II es esencial en el proceso de diferenciación terminal de estas células para la formación de miotubulos postmitóticos (Florini *et al.*, 1991).

Otras investigaciones realizadas *in vitro* con roedores, demostraron el papel del IGF-II en la diferenciación de las células precursoras del hueso denominados osteoblastos (Gangji *et al.*, 1998).

b) Regulación de esteroides

En 1993 Mesiano y Jaffe, encontraron que el IGF-II participa en la secreción de cortisol y del sulfato de dehidroepiandrosteronas (DHEA-S), inducidas por hormonas adrenocorticotrópicas en células fetales adrenales; ya que incrementa la expresión de las enzimas esteroidogénicas claves tales como la 20, 22 desmolasa, la 17 α -hidroxilasa y la 3- β hidroxisteroide deshidrogenasa.

En las células de la granulosa de humano, se observó que el IGF-II, además de participar en la esteroidogénesis, por sí mismo puede tener un efecto sinérgico en presencia de la insulina (Mason *et al.*, 1994). Otros estudios realizados en células de la teca demostraron la participación paracrina del IGF-II sobre la producción de andrógenos (Nahum *et al.*, 1995).

En porcinos se encontró que la expresión del ARNm del IGF-II era específica en células de la teca interna, mientras que el ARNm del IGF-I fue detectado en las células de la granulosa; al mismo tiempo que se observaba un aumento en el tamaño folicular (Yuan *et al.*, 1996).

No sólo se ha investigado el papel del IGF-II en la regulación de esteroides en el ovario; también en cultivos primarios de células intersticiales del testículo de rata, se observó que por la exposición de éstos a IGFs son capaces de incrementar la esteroidogénesis en las células de Leydig. Lo que sugiere un mecanismo paracrino a nivel intratesticular (De Mellow *et al.*, 1987).

La principal fuente de los IGFs es el hígado, pero es en la sangre donde se encuentran en mayor concentración. Ambos IGFs también se

forman en el riñón y en otros tejidos, aunque en menores cantidades (Leal-Guadarrama *et al.*, 2003).

Postnatalmente la biosíntesis de los IGFs depende fundamentalmente de los niveles de hormona de crecimiento (GH), de insulina y de prolactina; sin embargo, en el caso particular del IGF-II es relativamente independiente de la GH (Pavelić *et al.*, 2007). En cambio los estrógenos y el cortisol antagonizan su formación (Leal-Guadarrama *et al.*, 2003).

c) Interacción del IGF-II con los receptores de insulina e IGF-I

Existe reacción cruzada, con distintas afinidades entre los receptores de IR, el IGF-R1 y el IGF-R2 y sus respectivos ligandos. El IGF-II se une débilmente al IR y aunque el IGF-II tiene una alta afinidad por su receptor IGF-R2, también se une al IGF-R1. Los IGF-R1 e IGF-R2 presentan características y propiedades estructurales y de unión diferentes (O'Dell y Day, 1998).

Los efectos biológicos de los IGFs en las células blanco, son mediados por tres tipos de receptores en la superficie de las células: IGF-R1 e IGF-R2. Como se mencionó antes el IGF-II se une con mayor afinidad al IGF-R2 (Foulstone *et al.*, 2005), con menor afinidad al IGF-R1 y muy poca afinidad por el IR. En general, muchos de los efectos biológicos principales que desempeña el IGF-II son mediados por el IGF-R1 (O'Dell y Day, 1998).

En 1997 Louvi y colaboradores demostraron que la función del IGF-II como promotor de crecimiento del embrión durante la vida prenatal del ratón es en parte mediada por la señalización a través del IR.

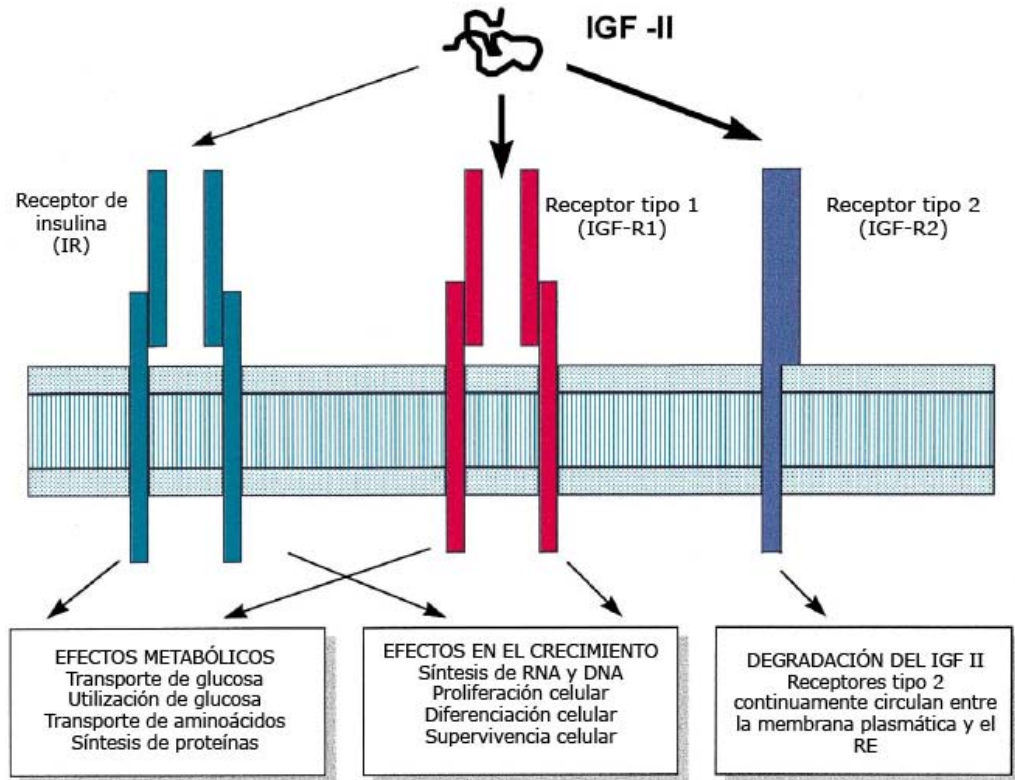


Fig. 13. Interacción del IGF-II con otros receptores. Receptor de insulina (IR), el de IGF-I (IGF-R1) e IGF-II (IGF-R2/M-6-P). Modificada de O'Dell y Day, 1998.

6. Organización del receptor de IGF-II

a) Gen

Al igual que el gen del IGF-II, su receptor (*Igf2r*) es de tipo impronta maternal (se expresa exclusivamente en el alelo materno); este gen se ubica en el cromosoma 17 en el ratón (Barlow *et al.*, 1991).

En 1988 Oshima y colaboradores, usando técnicas de biología molecular, observaron que el cDNA del receptor del IGF-II consta de 9,104 nucleótidos de los cuales 7,473 codifican para una proteína de 2491 aa.

b) Proteína

Para que los IGFs lleven a cabo sus acciones biológicas es necesario que se unan a glicoproteínas de membrana que funcionan como receptores.

El receptor del IGF-II, también conocido como receptor tipo 2, que además corresponde al receptor de manosa 6- fosfato (IGF-R2/M-6-P), es estructural y funcionalmente distinto al IGF-R1 (Pavelić *et al.*, 2007). El IGF-R2 está formado por una proteína transmembranal de cadena sencilla y tiene un peso molecular de 250 kDa. Consta de 15 dominios homólogos de repetición extracelulares, cada una de estas secuencias está constituida por una serie de 134 a 167 aa.; todas ellas son ricas en cisteína; el dominio transmembranal formado por 23 aa. y una región intracelular de 163 aa. El receptor no contiene dominios tirosina cinasa como el IGF-R1; (Rechler y Nissley, 1985; Morgan *et al.*, 1987; Oshima *et al.*, 1988).

La parte extracelular del receptor tiene un sitio de unión para IGF-II, principalmente el dominio 11, aunque la secuencia número 13 de la región extracelular es importante para que haya una mayor afinidad por el IGF-II; mientras que para la unión de manosa -6-fosfato (M-6-P) se requiere el reconocimiento de dos sitios del receptor (el primero de 1-3 dominios y el segundo en los dominios comprendidos del 7-9 de la región) (Devi *et al.*, 1998).

III. Planteamiento del problema e hipótesis

Desde el descubrimiento del gen *Sry* (1990) muchas de las investigaciones se han centrado en los eventos posteriores a su expresión. Distintos enfoques experimentales, entre los que se incluyen las técnicas de cultivo celular y de tejidos, destacan la importancia de los factores de crecimiento en todas las etapas del desarrollo testicular. Varios factores de crecimiento así como familias de factores de crecimiento se han convertido en moléculas claves que ejercen su influencia en diferentes etapas durante la formación del testículo (Mackay y Smith, 2007).

Investigaciones realizadas en el laboratorio de Biología Celular y Fisiología del IIB en la UNAM, demostraron la presencia del ARNm así como la proteína del IGF-II en el testículo embrionario del ratón (Franco-Carrera, 2006; Morales-Rivera, 2007).

La capacidad del testículo para expresar IGF-II, sugiere que la producción local de este factor es importante para el desarrollo testicular. A la fecha, no se ha descrito cual es la participación del IGF-II en la proliferación de las células somáticas del testículo de ratón embrionario, específicamente de las células de Leydig.

Hipótesis

Si el IGF-II desempeña un papel importante en la división celular durante la gestación, entonces participará como un regulador positivo en la proliferación de células de Leydig del testículo embrionario de ratón *Mus musculus in vitro*.

IV. Objetivos

Objetivo General

Determinar si el factor de crecimiento similar a Insulina tipo II (IGF-II) participa en la proliferación de las células somáticas del testículo de ratón.

Objetivos particulares

- Establecer la concentración del IGF-II que induce la proliferación de las células de Leydig del testículo embrionario del ratón.
- Evaluar el efecto del IGF-II en las células de Leydig durante el desarrollo testicular del ratón en las siguientes etapas:
 - 1) Embrionaria, a los 14 d.g.
 - 2) Fetal, a los 16 d.g.
 - 3) Prenatal, a los 18 d.g.

V. Material y métodos

a) Animales

Se emplearon ratones macho y hembra de la cepa CD1 de 7-9 semanas de edad los cuales fueron mantenidos en el Bioterio del IIB de la UNAM. Los animales fueron puestos en jaulas estériles con SANI-CHIPS de Harlan Teklad de México Grade Laboratory en condiciones estériles. Se alimentaron con alimento esterilizado para ratón Harlan Teklad México LM-485, con agua estéril acidificada a un pH de 2.5 y se mantuvieron en una temperatura de 18 a 22 °C y con un fotoperiodo de 12/12 luz/oscuridad. Se pusieron a cruzar 5 hembras con un macho de la misma edad y fueron revisadas diariamente, el día que se visualizó el tapón de copulación se estableció como día cero de la gestación.

b) Modelo biológico

Se utilizaron ratones hembras de la cepa CD1 gestantes con 14, 16 y 18 días de gestación; a las cuales se les realizó la eutanasia por dislocación cervical, para la obtención de los embriones se les practicó una incisión abdominal en forma de "V". Una vez aislados los embriones se les realizó una incisión a nivel abdominal y se seleccionaron únicamente los embriones macho a los que se les extrajeron los testículos para su posterior manipulación experimental.

c) Disgregación testicular

Se obtuvieron 45 y 50 testículos de cada edad (14,16 y 18 d.g). Se colocaron en tubos Eppendorf y se lavaron 2 veces con PBS a 22°C. Se preparó a 4°C una mezcla de 965 µL de PBS, 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 durante 3 min. Después de este tiempo se agregaron 110 µL de inhibidor de tripsina al 0.2 %. Se mezcló para homogeneizar y detener la reacción y se agregaron 390 µL de PBS filtrado a 22°C. Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min. Se decantó el sobrenadante y se lavó con 500 µL de PBS y se centrifugó a 3000 rpm durante 2 min. Por segunda vez se lavó con 500 µL de PBS y se centrifugó a 3000 rpm 2 min. Se resuspendieron las células en 1 mL de PBS filtrado. Se dejó reposar 12 min en una gradilla a temperatura ambiente. Con el procedimiento anterior, los túbulos que contienen a las células de Sertoli se precipitan al fondo y las células de Leydig se mantienen en la superficie. Con una pipeta siliconizada se separó el sobrenadante que contenía a las células de Leydig, y lo recuperado fue centrifugado (3000 rpm durante 5 min) para la obtención de las células de Leydig. Posteriormente se decantó. Se resuspendió en 500 µL de Medio Eagle Dulbecco Modificado (DMEM) suplementado.

d) Cuantificación de las células de Leydig

Posterior a la disgregación celular se realizó un conteo de las células viables para su cultivo; para lo cual se tomaron 10 µL de las células resuspendidas en el medio y adicionar 10 µL de azul de Evans mezclando perfectamente. Después se tomó un volumen de 10 µL de esta mezcla y se colocó en una cámara de Neubauer limpia. Se observó en un microscopio óptico marca Cambridge Instruments 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 de células en un mililitro, con la siguiente ecuación:

No. Cél/ mL= (No. Células observadas en los 4 cuadrantes) x 2500 x 1

Donde:

2500 es el factor asociado a la cámara de Neubauer

1 es el factor de dilución

e) Cultivo celular

Una vez obtenido el número de células totales por mL, se calculó el número de células en el volumen restante 490 μ L. Por último se realizaron los cálculos para saber la alícuota necesaria para sembrar 15,000 células por pozo (placas de 96 pozos) en 250 μ L de medio de cultivo DMEM suplementado con suero bovino fetal (SBF) y se incubó por 24 horas (hrs). Transcurrido este tiempo se lavaron con 250 μ L de PBS y se incubaron por 24 hrs, en las condiciones antes descritas, con medio DMEM suplementado con antibiótico y sin SBF. Pasadas las 24 hrs se realizó un lavado con 250 μ L de PBS.

- Determinación de la concentración óptima de IGF - II

Para determinar la concentración óptima de IGF-II se realizaron dos grupos: el control y el experimental; al primero se le adicionaron 250 μ L de medio DMEM y 0.25 μ L de 5-Bromo-2'-deoxi-uridina (BrdU), mientras que al grupo experimental además de lo antes mencionado se le agregaron diferentes concentraciones de IGF-II: 50, 100, 150 y 200 ng/mL.

- Efecto del IGF-II en la proliferación de las células de Leydig

Las células se incubaron nuevamente por 24 horas con 250 μ L de medio DMEM y BrdU para el grupo control y para el grupo experimental DMEM, BrdU y 100ng/mL de IGF-II que fue la concentración a la que se

observó la máxima respuesta de proliferación (ver resultados). Se recuperó el medio de cultivo y se guardó en tubos Eppendorf a -20°C para analizarlo posteriormente en otros estudios.

f) Preservación de antígenos celulares

Las células fueron lavadas dos veces con 250 μL de PBS y se fijaron con una solución fría de glutaraldehído al 0.3% por 15 min. Se retiró el fijador y se lavó cada pozo con 250 μL de PBS. Se retiró el PBS y se almacenaron a -20°C para posteriormente realizar la inmunodetección.

g) Inmunodetección

Se sacaron las cajas del congelador y se atemperaron por 10 min. Se lavaron dos veces con 200 μL de PBS a 22°C por 5 min cada uno. Se retiró el PBS y las células fueron incubadas con 250 μL solución de bloqueo durante 1 hr. Después se lavaron dos veces durante 5 min cada vez con 200 μL de PBS caliente (80°C) y posteriormente se incubaron 2 horas con 20 μL de anti-BrdU (1:100). Se lavaron 2 veces con PBS a 22°C por 5 min, se incubaron con 30 μL de anti-mouse FITC 1:100 en oscuridad durante 2 hrs. Se enjuagaron con 200 μL PBS- Tween (0.05%) a 22°C por 5 min. Se secaron los pozos sacudiendo firmemente sobre un papel absorbente. Se envolvieron en papel aluminio las cajas y se mantuvieron a -20°C .

Posteriormente se tomaron las fotografías de los pozos utilizando un microscopio de fluorescencia Zeiss modelo LSM Pascal con un objetivo de 10X y coeficiente de aumento ocular de 3.0. Se identificaron las células marcadas con BrdU y se realizó el conteo total en cada campo. Se hicieron graficas de los resultados obtenidos del grupo control contra el grupo experimental de cada edad estudiada.

h) Análisis estadístico

Los resultados se analizaron estadísticamente con la prueba t de Student; comparando la media del porcentaje de proliferación celular del control contra experimental en cada edad estudiada. Además, se realizó una prueba Anova; utilizando el programa GraphPad versión 3.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA.

VI. Resultados

1. Inmunodetección de 5-Bromo -2'-deoxi-uridina en el núcleo de las células de Leydig

La inmunodetección de la BrdU se realizó utilizando un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a fluoresceína que permitió detectar la proliferación de las células de Leydig, estimuladas con el IGF-II (Fig.15).

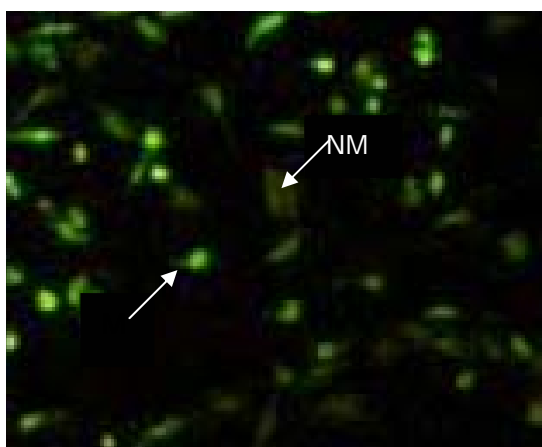


Fig. 15. Células de Leydig de 16 d.g marcadas con BrdU. Se muestran células de Leydig del testículo de ratón que incorporaron la BrdU en el núcleo (M), también se observan células no marcadas (NM) que no incorporaron BrdU. 30X.

2. Determinación de la concentración óptima de IGF-II

Se determinó que la concentración óptima de IGF-II fue de 100 ng/mL, debido a que en esta concentración se observó el mayor porcentaje de células marcadas con BrdU con 54.7% en el grupo control y 66% en el grupo tratado con la concentración de IGF-II antes mencionada. Por otro lado, la concentración de 150 ng/mL arrojó 54.7% del grupo control y 64% de incorporación en el grupo experimental. Asimismo, se detectó que a la

concentración de 200 ng/mL, el porcentaje de proliferación fue de 54.7 % del grupo control y 62 % en el grupo tratado con IGF-II (Fig. 16).

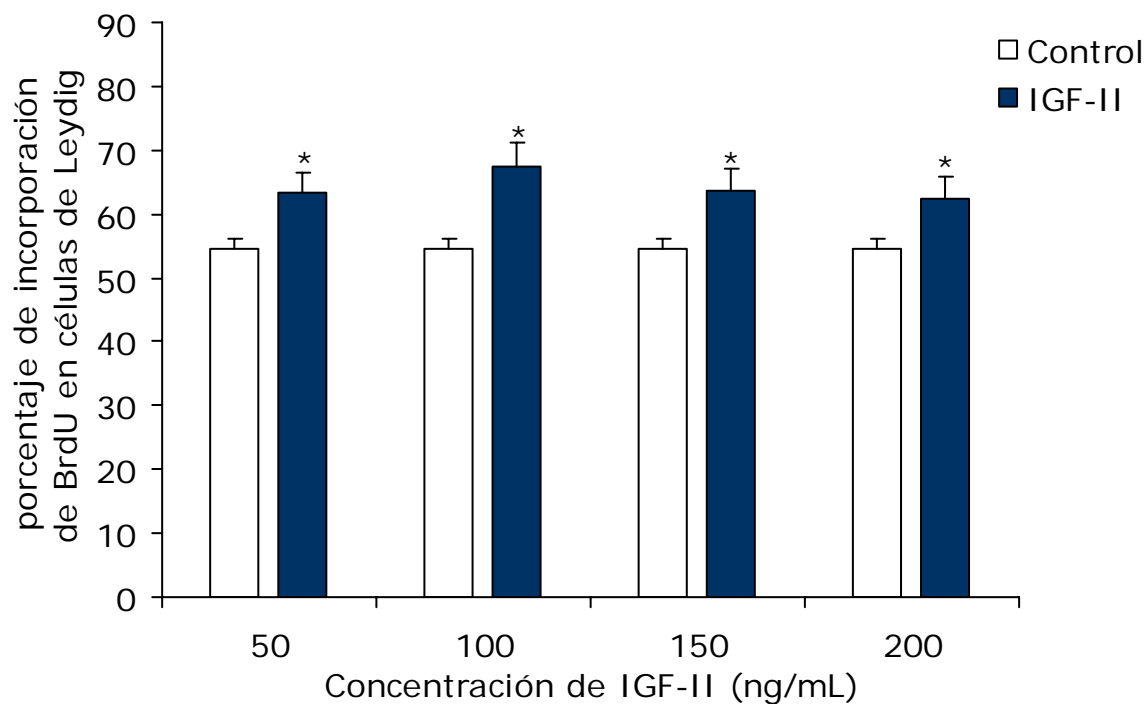


Fig. 16. Efecto de diferentes concentraciones de IGF-II sobre la proliferación de células de Leydig de ratón. Las barras representan la media y el error estándar de la proliferación de las células de Leydig que incorporaron BrdU. *experimental con respecto al control; t de Student $p < 0.05$.

3. Efecto del IGF-II en la proliferación de las células de Leydig del testículo del ratón

a) En la etapa embrionaria a los 14 d.g.

En las células de Leydig a los 14 d.g.; etapa en la que el testículo inicia su crecimiento se encontró 59% de células marcadas con BrdU en el grupo control, mientras que en el grupo tratado se detectó 68% de incorporación de BrdU en el núcleo de estas células (Fig. 17).

El análisis estadístico con la prueba t de Student reveló que las diferencias observadas en la proliferación de las células de Leydig son estadísticamente significativas a $p < 0.01$. Debido a lo cual se acepta la hipótesis nula sobre el efecto del IGF-II en la proliferación de las células de Leydig.

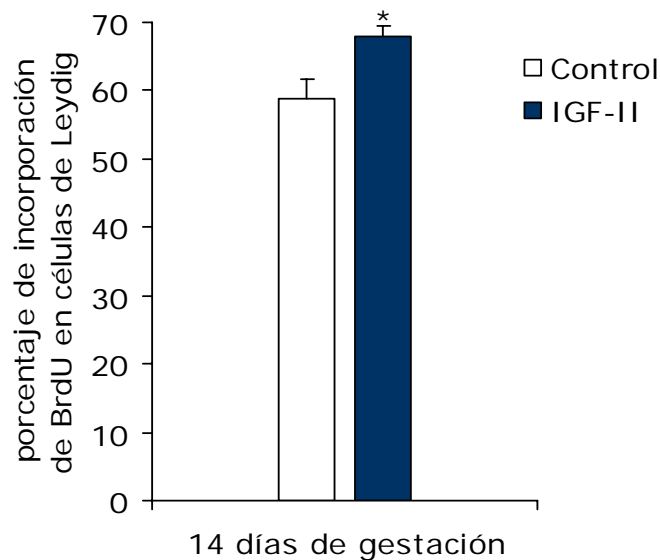


Fig. 17. Efecto del IGF-II sobre la proliferación de las células de Leydig durante la embrionaria, a los 14 d.g. Las barras representan la media y el error estándar de 4 experimentos independientes. *experimental con respecto al control; t de Student $p < 0.01$.

b) En la etapa fetal a los 16 d.g.

En las células de Leydig de 16 d.g., correspondientes a la etapa fetal encontramos 59% de células proliferando al incorporar el BrdU en el grupo control comparado con el grupo experimental en el que se determinó 73% de células marcadas con BrdU (Fig.18).

El análisis estadístico con la prueba t de Student reveló que las diferencias observadas en la proliferación de las células de Leydig son estadísticamente significativas a $p < 0.01$. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula sobre el efecto del IGF-II en la proliferación de las células de Leydig.

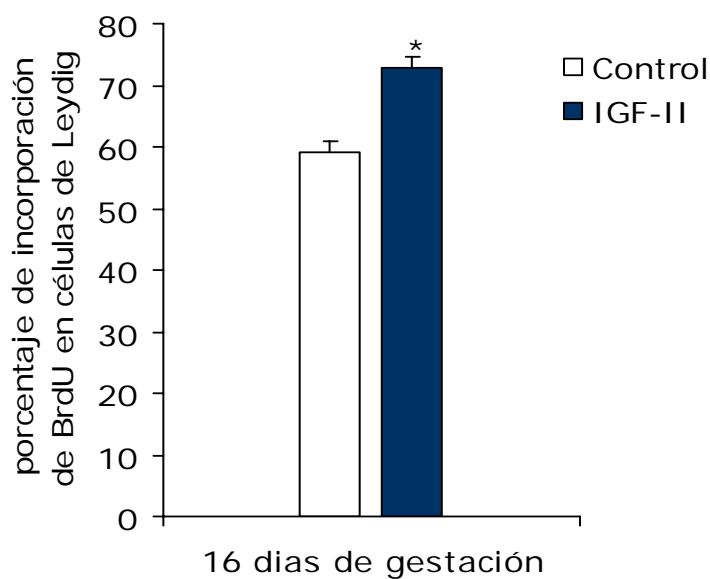


Fig. 18. Efecto del IGF-II sobre la proliferación de las células de Leydig durante la etapa fetal, a los 16 d.g. Las barras representa la media y el error estándar de 4 experimentos independientes, *experimental con respecto al control; t de Student $p < 0.01$.

c) En la etapa prenatal a los 18 d.g.

A los 18 d.g correspondientes a la etapa prenatal observamos 60% de incorporación de BrdU debido a la proliferación de células de Leydig en el grupo control. En el grupo tratado con IGF-II se observó 68% de incorporación de BrdU (Fig. 19).

El análisis estadístico con la prueba t de Student reveló que las diferencias observadas en la proliferación de las células de Leydig son estadísticamente significativas a $p < 0.01$. Por lo tanto se acepta la hipótesis nula sobre el efecto del IGF-II en la proliferación de las células de Leydig.

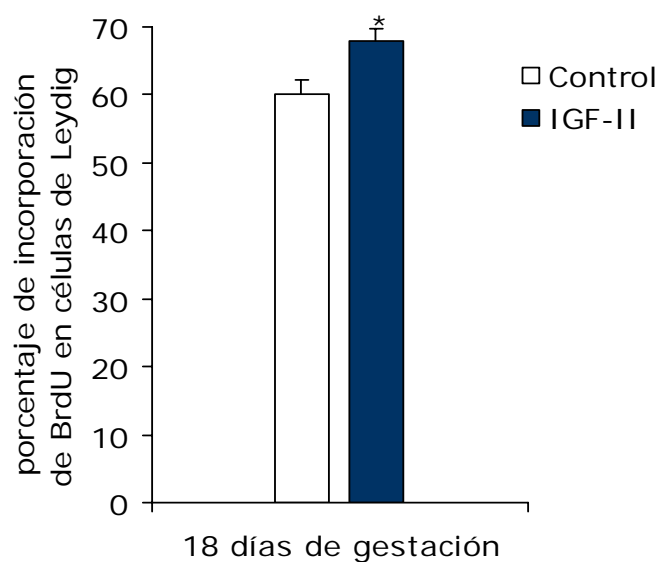


Fig. 19. Efecto del IGF-II sobre la proliferación de las células de Leydig durante la etapa prenatal, a los 18 d.g. La gráfica representa la media y el error estándar de 4 experimentos independientes, *experimental con respecto al control; t de Student $p < 0.01$.

4. Comparación de la proliferación de células de Leydig durante el desarrollo embrionario del testículo del ratón

Al comparar la proliferación de las células de Leydig de testículo del ratón en las diferentes edades de gestación, observamos que el mayor crecimiento celular inducido por el IGF-II fue durante la etapa fetal (16 d.g) y que a los 14 y 18 d.g las células testiculares de Leydig incorporaron porcentajes similares de BrdU (Fig. 20). El análisis de varianza demostró que las diferencias observadas son estadísticamente significativas con una $p < 0.05$. Asimismo, la comparación con la prueba de Tukey arrojó que existen diferencias significativas de los grupos experimentales de 14 vs 16 d.g., 14 vs 18 d.g. y 16 vs 18 d.g.

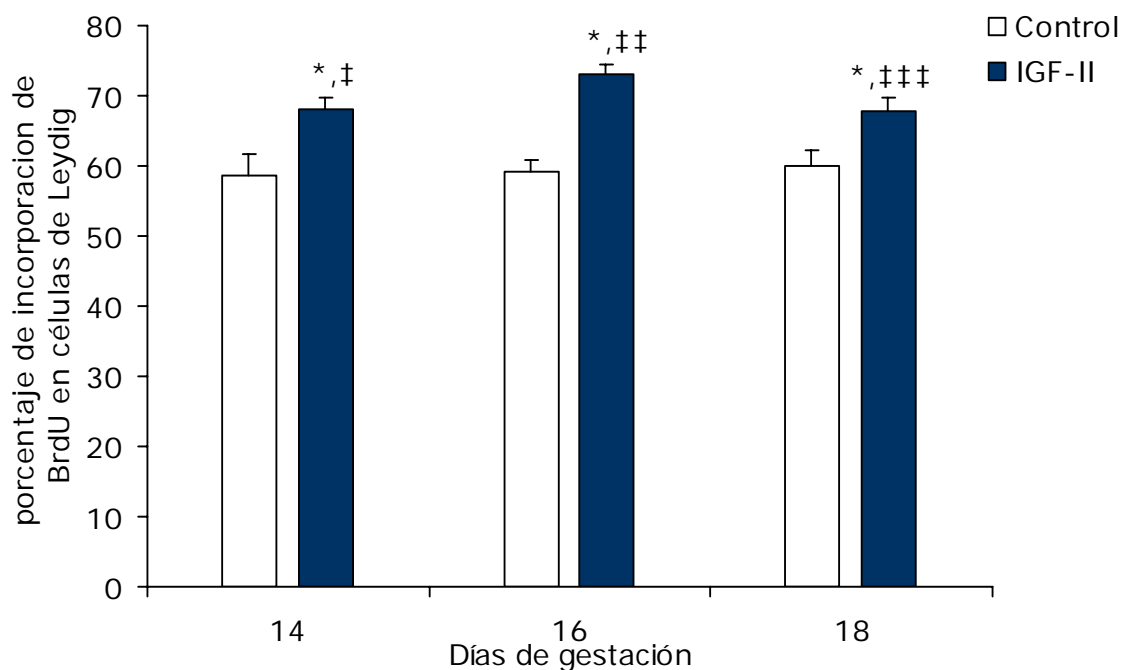


Fig. 20. Efecto del IGF-II sobre el crecimiento de las células de Leydig a lo largo del desarrollo embrionario del ratón. Las gráficas representan la media y el error estándar. *experimental con respecto al control; t de Student $p < 0.01$ y †14 vs ††16 d.g. prueba Tukey $p < 0.05$, †14 vs †††18 d.g. prueba de Tukey $p < 0.05$ y ††16 vs †††18 d.g. prueba de Tukey $p < 0.05$.

VII. Discusión

Para que un organismo pueda crecer, son necesarios tres eventos: la masa celular debe aumentar, el material genético debe duplicarse, y la mitosis debe ocurrir, asegurando así que cada célula hija reciba un complemento genético idéntico para asegurar la perpetuación de la estirpe celular. En los organismos eucariontes, estos eventos se llevan a cabo de manera ordenada y progresiva constituyendo el ciclo celular. Dentro de éste, la fase G1 es el periodo en el que la célula tiene una alta actividad metabólica puesto que se están sintetizando las enzimas necesarias para la duplicación del ADN, mientras que en la fase S se lleva a cabo la síntesis de ADN (Cervantes-Peredo, 2004). En este trabajo los resultados de proliferación celular se determinaron por el porcentaje de células que incorporaron BrdU en el ADN en lugar de timidina, en la fase S.

Uno de los primeros aspectos estudiados fue establecer una curva estándar para la proliferación de las células de Leydig del testículo fetal del ratón. Los resultados obtenidos de la determinación de la concentración de IGF-II, reveló que la concentración de 100 ng/mL indujo el mayor porcentaje de incorporación de BrdU en las células de Leydig y que a partir de 150 ng/mL el número de células marcadas fue menor al aumentar la concentración del IGF-II. Estos datos sugieren que los receptores podrían saturarse, aunque el número de receptores para el IGF-II no se ha determinado actualmente en las células testiculares.

En el ratón *Mus musculus*, la expresión del ARNm del *Igf-II* comienza desde etapas tempranas de la diferenciación testicular a los 12 d.g. teniendo su máxima expresión en la etapa prenatal a los 18 d.g., (Franco-Carrera, 2006; Villalpando y col., datos sin publicar). Posteriormente en 2007, Morales-Rivera y Villalpando y col., datos sin publicar en el 2008, describieron que el IGF-II se detecta en el testículo desde los 14 d.g. y que

su expresión aumenta con la edad de desarrollo; siendo en las células de Leydig el lugar donde más se expresa este factor de crecimiento. Estos datos plantean que el IGF-II tiene alguna función en el testículo embrionario.

En este trabajo se analizó la participación que tiene el IGF-II sobre la proliferación de células somáticas *in vitro*, específicamente en las células de Leydig, del testículo del ratón *Mus musculus*; en tres distintas etapas del desarrollo embrionario. Hasta donde sabemos este es el primer trabajo sobre la regulación de la proliferación por IGF-II en este tipo celular.

De acuerdo con los resultados obtenidos se observó un mayor porcentaje de células que incorporaron BrdU en los grupos tratados con IGF-II en todas las edades estudiadas; lo cual indica que el IGF-II tiene un papel importante en la proliferación de las células de Leydig durante el desarrollo testicular embrionario del ratón *Mus musculus*. La capacidad que tiene el testículo embrionario de expresar IGF-II en las etapas estudiadas y su participación en la proliferación indica que este factor, entre otros, también regula el crecimiento de este órgano. Los resultados concuerdan con investigaciones previas realizadas en varios tipos celulares en los que se demostró el papel que tiene el IGF-II sobre la proliferación de células de mamíferos en la etapa embrionaria y adulta como keratocitos del estroma corneal bovino (Musselmann *et al.*, 2008), células endoteliales de la cornea humana (Storckenfeldt *et al.*, 1991), células germinales de rata macho (Söder *et al.*, 1992), linfocitos T (Kooijman *et al.*, 1992), células de la teca de ovario de rata (Duleba *et al.*, 1997), hepatocitos (Kimura y Ogihara, 1998), osteoblastos (Bellows *et al.*, 2006) y células epiteliales de la retina (Spraul *et al.*, 2000). Asimismo, este factor indujo el incremento de la síntesis de ADN individualmente o en combinación con otros factores de crecimiento tales como el IGF-I y el TGF- β .

Los presentes hallazgos nos indican que el papel del IGF-II en la proliferación de células de Leydig es regular positivamente el ciclo celular de estas células debido a que aumento el porcentaje incorporación de BrdU de los 14 a los 16 d.g. Esperábamos que el efecto fuera mayor conforme avanzaba el crecimiento del testículo en la etapa prenatal a los 18 d.g. Sin embargo, se observó el mismo porcentaje de células marcada con BrdU en las edades de 14 y 18 d.g. de los grupos experimentales. Es probable que a estas edades las células de Leydig sean reguladas negativamente por la presencia de insulina y otros reguladores negativos del ciclo celular como el producto del gen supresor de tumor Rb (Mancini et al., 1994; Cervantes-Peredo, 2002). Puesto que el tratamiento con insulina disminuyó la expresión del ARNm del IGF-II (Franco-Carrera, 2006); aunque habría que determinar si la expresión de la proteína también disminuye. Por otro lado, la disminución del porcentaje de células marcadas a los 18 d.g. podría ser explicada por investigaciones previas en el laboratorio, donde se demostró que a esta misma edad el IGF-II regula la producción de testosterona y por ello el porcentaje de incorporación de BrdU haya disminuído con respecto al porcentaje observado en las células de 16 d.g. tratadas con IGF-II (Morales-Rivera, 2007).

A pesar, de la alta homología del IGF-I e IGF-II sus receptores son estructuralmente diferentes. El IGF-R1 se caracteriza por tener un dominio intracitoplasmático de activación a proteínas cinasas, mientras que el IGF-R2 tiene activa la vía del receptor manosa-6-fosfato conduciendo probablemente a la degradación y/o activación de proteínas que reprimen al IGF-II así como también a la degradación del mismo péptido de la sangre (O´Dell y Day, 1998).

En los resultados obtenidos en el grupo experimental de 16 d.g., que corresponde a la etapa fetal, se encontró el mayor porcentaje de incorporación de BrdU de todas las etapas estudiadas en el desarrollo

testicular. Estos resultados confirman otros hallazgos en los cuales a los 16 y 17 d.g. son considerados como las etapas en la que las células de Leydig y células de Sertoli del ratón tienen la mayor capacidad de responder al efecto de agentes mitogénicos (Saez, 1994; González-Miranda, 2007; Hernández-Zimbrón, 2007; Santamaría-González, 2007; Villalpando, 2008 datos sin publicar)

VIII. Conclusiones

- ❖ La concentración establecida para inducir la máxima proliferación de las células de Leydig, es de 100 ng/mL de IGF-II.
- ❖ El IGF-II induce la proliferación de las células somáticas de Leydig del testículo de ratón desde los 14 hasta los 18 d.g.
- ❖ La mayor respuesta de este factor de crecimiento se detectó a los 16 d.g, que corresponde a la etapa fetal.
- ❖ Los resultados de la presente investigación apoyan la hipótesis propuesta de que el IGF-II induce la proliferación de las células de Leydig del testículo embrionario de ratón *in vitro*.

IX. Bibliografía

ARMSTRONG J. F., Pritchard-Jones K., Bickmore W. A., Hastie N. D. y Bard J. B. 1993. **The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo.** Mech Dev. 40: 85 – 97.

BAKER J., Liu J. P., Robertson E. J. y Efstratiadis A. 1993. **Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth.** Cell 75: 73 – 82.

BAKER P. J. y O'Shaughnessy P. J. 2001. **Expression of prostaglandin D synthetase during development in the mouse testis.** Reproduction 122: 553 – 559.

BARLOW D. P., Stögeer R., Herrmann B. G., Saito K. y Schiweifer N. 1991. **The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the *Tme* locus.** Nature 349: 84 – 87.

BARRIONUEVO F., Bagheri-Fam S., Klattig J., Kist R., Taketo M. M., Englert C. y Scherer G. 2006. **Homozygous inactivation of *Sox9* causes complete XY sex reversal in mice.** Biol Reprod. 74: 195 – 201.

BEECHEY C. V., Ball S. T., Stuart Townsend K. M. y Jones J. 1997. **The Mouse Chromosome 7 distal imprinting domain maps to G-bands F4/F5.** Mamm Genome 8: 236-240.

BELLOWS C. G., Jia D., Jia Y., Hassanloo A. y Heersche J. N. 2006. **Different effect of insulin and insulin-like growth factors I and II on osteoprogenitors and adipocyte progenitors in fetal rat bone cell populations.** Calcif Tissue Int. 79: 57 – 65.

BIRK O. S., Casiano D. E., Wassif C. A., Cogliati T., Zhao L., Zhao Y. Grinberg A., Huang S., Kreidberg J. A., Parker K. L., Porter F. D. y Westphal H. 2000. **The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation.** Nature 403: 909 – 913.

BITGOOD M. J., Shen L. y McMahon A. P. 1996. **Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline.** Curr Biol. 6: 298 – 304.

BRISSENDEN J. E., Ullrich A. y Francke U. 1984. **Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and epidermal growth factor.** Nature 310: 781 – 784.

CARLSON B. 2004. **Embriología humana y biología del desarrollo.** 2a edición. Ed. Hartcourt. pag.368 – 391.

CERVANTES-PEREDO A. **Mitosis.** En: Genética General. Manual de prácticas de laboratorio. 1a edición, 2002. Facultad de Química, UNAM. pág. 27, 28 y 30.

CLARK A. M., Garland K. K. y Russell L. D. 2000. **Desert hedgehog (*Dhh*) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules.** Biol Reprod. 63: 1825 – 1839.

DAHMS N. **Research and Selected publications.** 2004. <http://www.biochem.mcw.edu/people/faculty/dahms/research.html>.

DAUGHADAY W. H. y Rotwein P. 1989. **Insulin-like growth factors I and II. Peptide, Messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations.** Endocr Rev. 10: 68– 91.

DECHIARA T. M., Efstratiadis A., y Robertson E. J. 1990. **A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting.** Nature 345: 78 – 80.

DECHIARA T. M., Robertson E. J. y Efstratiadis A. 1991. **Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene.** Cell 64: 849-859.

DULEBA A. J., Spaczynski R. Z., Olive D. L., Behrman H. R., 1997. **Effects of insulin and insulin-like growth factors on proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells.** Biol Reprod. 56: 891-897.

DENLEY A., Cosgrove L. J., Brooker G. W., Wallace J. C. y Forbes B. E. 2005. **Molecular interactions of the IGF system.** Cytokine Growth Factor Rev. 16: 421 – 439.

DEVI G. R., Byrd J. C., Slentz D. H. y MacDonald R. G. 1998. **An insulin-like growth factor II (IGF-II) affinity-enhancing domain localized within extracytoplasmic repeat 13 of the IGF-II/mannose 6-phosphate receptor.** Mol Endocrinol. 12: 1661 – 1672.

DE MELLOW J. S., Handelsman D. J. y Baxter R. C. 1987. **Short-term exposure to insulin-like growth factors stimulates testosterone production by testicular interstitial cells.** Acta Endocrinol. 115: 483 – 489.

FOULSTONE E., Prince S., Zaccheo O., Burns J. L., Harper J., Jacobs C., Church D. y Hassan A. B. 2005. **Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer.** J Pathol. 205: 145 – 153.

FLORINI J. R., Magri K. A., Ewton D. Z., James P. L., Grindstaff K. y Rotwein P. S. 1991. **"Spontaneous" differentiation of skeletal myoblasts is dependent upon autocrine secretion of insulin-like growth factor-II.** J Biol Chem. 266: 15917 – 15923.

FRANCO-CARRERA E. 2006. **Estudio ontogenético de la expresión del RNA mensajero del factor de crecimiento similar a insulina tipo II (IGF-II) y el efecto de la insulina en su expresión.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

GANGJI V., Rydzziel S., Gabbitas B. y Canalis E. 1998. **Insulin-like growth factor II promoter expresión in cultured rodent osteoblasts and adult rat bone.** Endocrinology 139: 2287 – 2292.

GODIN I. y Wylie C. C. 1991. **TGF β ₁ inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture.** Development 113: 1451 – 1457.

GONZÁLEZ-MIRANDA B. A. 2007. **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 de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

GRIFFITHS J.F., Millar H. J., Suzuki T. D., Lewontin C. R. y Gelbart M. W. 2002. **Genetica.** 7a edición. Ed. McGraw-Hill. pag. 648-650.

HACKER A., Capel B., Goodfellow P. y Lovell-Badge R. 1995. **Expression of Sry, the mouse sex determining gene.** Development 121: 1603-1614.

HABERT R., Lejeune H. y Saez J. M. 2001. **Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells.** Mol Cell Endocrinol. 179: 47 – 74.

HERNÁNDEZ-ZIMBRÓN L. F. 2007. **Efecto del factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF-I) y del factor de crecimiento epidermal (EGF) en las células de Sertoli durante el desarrollo embrionario del ratón *Mus musculus*.** Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.

HU J. F., Vu T. H. y Hoffman A. R. 1995. **Differential biallelic activation of three insulin-like growth factor II promoters in the mouse central nervous system.** Mol Endocrinol. 9: 628 – 636.

HUMBEL R. E. 1990. **Insulin-like growth factors I and II.** Eur J Biochem. 190: 445 – 462.

KATOH-FUKUI Y., Tsuchiya R., Shiroishi T., Nakahara Y., Hashimoto N., Noguchi K. y Higashinakagawa T. 1998. **Male – to – female sex reversal in *M33* mutant mice.** Nature 393: 688 – 692.

KATOH-FUKUI Y., Owaki A., Toyama Y., Lusaka M., Shinohara Y., Maekawa M., Toshimori K. y Morohashi K. 2005. **Mouse Polycomb *M33* is required for splenic vascular and adrenal gland.** Blood 106:1612 – 1620.

KENT J., Wheatley S. C., Andrews J. E., Sinclair A. H. y Koopman P. 1996. **A male-specific role for *SOX9* in vertebrate sex determination.** Development 122: 2813-2822.

KIMURA M. y Ogihara M. 1998. **Effects of insulin-like growth factor I and II on DNA synthesis and proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes.** Eur J Pharmacol. 354: 271 – 281.

KOOIJMAN R., Willems M., Rijkers G. T., Brinkman A., Van Buul-Offers S. C., Heijnen C. J. y Zegers B. J. 1992. **Effects of insulin-like growth factors and growth hormone on the in vitro proliferation of T lymphocytes.** J Neuroimmunol. 38: 95 – 104.

KOOPMAN P., Munsterberg A., Capel B., Vivian N. y Lovell-Badge R. 1990. **Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation.** Nature 348: 450 – 452.

LEAL-GUADARRAMA L., Ochoa-Rojas M. C., Méndez J. D. 2003. **Importancia clínica de los Factores de crecimiento parecidos a la insulina.** Gac Méd Méx. 139 (6): 589 – 599.

LOPÉZ-LOPÉZ M. **Citogenética Humana. Parte II: Los cromosomas sexuales cromatina X o cuerpos de barr.** En: Genética General. Manual de practicas de laboratorio. 1a edición, 2002. Facultad de Química, UNAM. pág. 57.

LOUVI A., Accili D. y Efstratiadis A. 1997. **Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development.** Dev Biol. 189: 33 – 48.

MACKAY S. y Smith R. A. 2007. **Effects of growth factors on testicular morphogenesis.** Int Rev Cytol. 260: 113 – 173.

MANCINI M. A., Shan B., Nickerson J. A., Penman S. y Lee W. H. 1994. **The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein.** Proc Natl Acad Sci USA. 91: 418 - 422.

MASON H. D., Willis D. S., Holly J. M. y Franks S. 1994. **Insulin preincubation enhances insulin-like growth factor-II (IGF-II) action on steroidogenesis in human granulosa cells.** J Clin Endocrinol Metab. 78: 1265 – 1267.

MERCHANT-LARIOS H. 1991. **El sexo gonadal.** Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM. pag. 451- 460.

MERCHANT-LARIOS H. y Moreno N. **Diferenciación celular durante el desarrollo de la gónada.** En: Biología celular y molecular. 1ra edición. Ed. Pearson Educación. 2003. pag.713 – 735.

MESIANO S. y Jaffe R. B. 1993. **Interaction of insulin-like growth factor-II and estradiol directs steroidogenesis in the human fetal adrenal toward dehydroepiandrosterone sulfate production.** J Clin Endocrinol Metab. 77: 754 – 758.

MIYAMOTO N., Yoshida M., Kuratani S., Matsuo I. y Aizawa S. 1997. **Defects of urogenital development in mice lacking Emx2.** Development 124: 1653 – 1664.

MORAIS da Silva S., Hacker A., Harley V., Goodfellow P., Swain A. y Lovell-Badge R. 1996. **Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds.** Nat Genet. 14: 62 – 68.

MORALES-RIVERA J. 2006. **Estudio inmunocitoquímico de la expresión del factor de crecimiento similar a la insulina tipo II en la etapa intrauterina.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

MORGAN D. O., Edman J. C., Standring D. N., Fried V. A., Smith M. C., Roth R. A. y Rutter W. J. 1987. **Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein.** Nature 20: 301 – 307.

MOSES A. C., Nissley S. P., Short P. A., Rechler M. M., White R. M., Knight A. B. y Higa O. Z. 1980. **Increased levels of multiplication-stimulating activity, an insulin-like growth, in fetal rat serum.** Proc Natl Acad Sci USA. 77: 3649 – 3653.

MUSSELMANN K., Kane B. P., Alexandrou B. y Hassell J. R. 2008. **IGF-II is present in bovine corneal stroma and activates keratocytes to proliferate in vitro.** Exp Eye Res. 86: 506 – 511.

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

NAHUM R., Thong K. J. y Hillier S. G. 1995. **Metabolic regulation of androgen production by human thecal cells in vitro.** Hum Reprod. 10: 75 – 81.

O'DELL. S. D. y Day I. N. M. 1998. **Molecules in focus Insulin-like growth factor II (IGF-II).** Int J of Biochem Cell Biol. 30: 767 – 771.

OSHIMA A., Nolan C. M. Kyle J. W., Grubb J. H. y Sly W. S. 1988. **The human cation-independent mannose-6-phosphate receptor. Cloning and sequence of the full-length cDNA and expression of functional receptor in COS cells.** J Biol Chem. 263: 2553-2562.

PAVELIĆ J., Matijević T. y Knežević J. 2007. **Biological & physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family.** Indian J Med Res. 125: 511- 522.

RAYMOND C. S, Kettlewell J. R., Hirsch B., Bardwell V. J. y Zarkower D. 1999. **Expression of Dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development.** Dev Biol. 215: 208 – 220.

RECHLER M. M. Y Nissley S. P. 1985. **The nature and regulation of the receptors for insulin-like growth factors.** Annu Rev Physio. 47: 425 – 442.

REY R. **FETAL SEX DIFFERENTIATION: FROM MOLECULES TO ANATOMY.** *Rev. chil. anat.* [online]. Apr. 2001, vol.19, no.1, p.75-82.

ROSSI P., Dolci S., Albanesi C., Grimaldi P. y Geremia R. 1993 **Direct evidence that the mouse sex-determining gene Sry is expressed in the somatic cells of male fetal gonads and in the germ cell line in the adult testis.** Mol Reprod Dev. 34: 369 – 373.

ROTWEIN P. y Hall L.J. 1990. **Evolution of insulin-like growth factor II: characterization of the mouse IGF-II gene and identification of two pseudo exons.** DNA Cell Biol. 9: 725 – 735.

SADLER T. W. 2004. **Embriología médica**. 9ª edición. Ed. Panamericana. pag. 354.

SAEZ J. M. 1994. **Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation**. Endocr Rev. 15: 574 – 626.

SANTAMARÍA-GONZÁLEZ S. 2007. **Participación de la insulina en el crecimiento testicular y en la regulación de la testosterona del ratón *Mus musculus***. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

SCHMAHL J., Kim Y., Colvin J. S., Ornitz D. M. y Capel B. 2004. ***Fgf9* induces proliferation and nuclear localization of FGFR2 in Sertoli precursors during male sex determination**. Development 131: 3627-3636.

SCHMID C., Steiner T. y Froesch E. R. 1983. **Preferential enhancement of myoblast differentiation by insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) in primary cultures of chicken embryonic cells**. FEBS Lett. 161: 117 – 121.

SÖDER O., Bang P., Wahab A. y Parvinen M. 1992. **Insulin-like growth factors selectively stimulate spermatogonial, but not meiotic, deoxyribonucleic acid synthesis during rat spermatogenesis**. Endocrinology. 131: 2344 – 2350.

SPRAUL C. W., Kaven C., Amann J., Lang G. K. y Lang G. E. 2000. **Effect of insulin-like growth factors 1 and 2, and glucose on the migration and proliferation of bovine retinal pigment epithelial cells in vitro**. Ophthalmic Res. 32: 244 – 248.

STORCKENFELDT L., Schofield P. N. y Engström W. 1991. **Stimulatory effect of insulin like growth factor II on DNA synthesis in the human embryonic cornea.** Cell Biol Int Rep. 1217 – 1223.

TILMANN C. y Capel B. 2002. **Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination.** Recent Prog Horm Res. 57: 1-18.

VAZQUEZ-RAMOS J. **El ciclo celular.** En: Biología celular y molecular. 1ra edición. Ed. Pearson Educación. 2003. pag. 595 – 611.

VIDAL V. P. I., Chaboissier M-Ch., de Rooij D. G. y Schedl A. 2001. **Sox9 induces testis development in XX transgenic mice.** Nature Genet 28: 216 – 217.

VILLALPANDO I. 2000, **Sinfonía de genes gonadales.** Ciencia y Desarrollo. 136: 32-41.

WILHELM D. y Englert C. 2002. **The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1.** Genes Dev 16: 1839 – 1851.

WILHELM D., Hiramatsu R., Mizusaki H., Widjaja L., Combes A. N., Kanai Y. y Koopman P. 2007a. **SOX9 Regulates Prostaglandin D Synthase Gene Transcription *in Vivo* to Ensure Testis Development.** J Biol Chem. 282: 14, 10553 – 10560.

WILHELM D., Palmer S. y Koopman P. 2007b. **Sex Determination and Gonadal Development in Mammals.** Physiol Rev 87:1-28

YAO H. H., Whoriskey W. y Capel B. 2002. **Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis.** Genes Dev. 16: 1433-1440.

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

X. Apéndice

Reactivos y soluciones de trabajo

Péptido recombinante

rmIGF-II

insulin-Like Growth Factor Two
recombinant mouse (*E.coli*-derived)

Catalogo Number 792-MG

50µg Lot DFK076041

>97% Purity Store at -20°C

FOR RESEARCH USE ONLY

R&D SYSTEMS Minneapolis, MN55413

Medio de cultivo

Medio Eagle Modificado Dulbecco (D MEM) de IN VITRO Lab México.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 1X

Para preparar 100 mL de solución:

Solución salina de fosfatos	
Dulbecco 10X de IN Vitro Lab México	10 mL
Agua desionizada	90 mL

Solución Glutaraldehído al 0.3% en PBS (solución fijadora)

Para preparar 10 mL de solución:

Glutaraldehído al 25 % Merck	125 µL
PBS 1X	10 mL

Solución de albúmina/gelatina (solución de bloqueo)

Para preparar 10 mL de solución:

BSA	0.5 g
Gelatina	0.1 mL
PBS 1X	9.87 mL

Estuche para inmunodetección de BrdU incorporado en el DNA celular

5 -Bromo -2´-deoxy -uridine Labeling and Detection Kit I de Roche

Solución de PBS – Tween al 0.05 %

Para preparar 100 mL de solución:

Tween 20 de sigma	50 µL
PBS 1X	99.95 mL