

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



---

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“EXPRESIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO  
SIMILAR A INSULINA TIPO I (IGF-I), EL RECEPTOR  
(IGF-IR $\alpha$ ) Y LA PROTEÍNA C- Raf EN LAS CÉLULAS  
DE LEYDIG Y SERTOLI EN EL TESTÍCULO FETAL  
DEL RATÓN *Mus musculus*”

## T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

**EVA CRISTINA RAMÍREZ AGUILAR**

Directora de Tesis:  
Dra. María Irma Villalpando Fierro



MÉXICO, D. F.

ABRIL 2007



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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**EXPRESIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A  
INSULINA TIPO I (IGF-I), EL RECEPTOR (IGF-IR $\alpha$ ) Y LA  
PROTEÍNA C- Raf EN LAS CÉLULAS DE LEYDIG Y  
SERTOLI EN EL TESTÍCULO FETAL DEL RATÓN  
*Mus musculus***

Tesis para obtener el título de Biólogo presenta:

EVA CRISTINA RAMÍREZ AGUILAR

Directora de Tesis:

Dra. María Irma Villalpando Fierro

Asesor Interno:

Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Tesis realizada en el Departamento de Biología Celular y Fisiología.  
Laboratorio de Embriología Molecular del Instituto de Investigaciones  
Biomédicas, U.N.A.M.

Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo financiero de  
DGAPA con el proyecto No. IN206205

## AGRADECIMIENTOS

*A la Dra. María Irma Villalpando Fierro, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por el apoyo, la orientación y el tiempo compartido.*

*A la M. en C. Esmeralda Lira, por todo el apoyo y los momentos agradables que me brindo.*

*A los miembros del jurado:*

*Dr. Edelmiro Santiago Osorio*

*M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez*

*Dra. María Esther Cruz Beltrán*

*Biól. Carlos Martínez Montoya.*

*Les reitero mi más profundo agradecimiento por su fina atención y tiempo otorgado.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, por el lugar concedido para mi desarrollo profesional.*

*A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por ser la formadora de mis conocimientos y mi segundo hogar.*

*A la DGAPA proyecto IN206205, por el apoyo para la realización de esta investigación.*

A Cristina mi Madre, que hizo posible la vida  
y luego me enseñó a vivirla.

Alberto mi Padre, que con sus sueños  
ilumina mi existir.

A mi Manís, por contemplar el silencio  
a mi lado.

A Eva mi Abu, que ha sido  
siempre mi eslabón a la  
realidad.

En el tren de la vida soy un viajero  
y de ustedes compañera de viaje,  
para todos mis amigos.

# ÍNDICE

Pág.

<b>I.</b>	<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>Introducción</b> .....	<b>2</b>
1)	<b>Antecedentes</b> .....	<b>2</b>
2)	<b>Desarrollo testicular en roedores</b> .....	<b>3</b>
a.	<i>Cresta genital</i> .....	<b>3</b>
b.	<i>Gónada indiferenciada</i> .....	<b>5</b>
c.	<i>Diferenciación testicular</i> .....	<b>6</b>
d.	<i>Gen determinante de la diferenciación testicular</i> .....	<b>9</b>
3)	<b>Factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-1)</b> .....	<b>11</b>
a.	<i>Organización del gen</i> .....	<b>11</b>
b.	<i>Características de la proteína</i> .....	<b>12</b>
c.	<i>Función en la regulación endocrina testicular</i> .....	<b>12</b>
d.	<i>Efectos en la diferenciación y proliferación celular</i> .....	<b>12</b>
4)	<b>Receptor del IGF-1</b> .....	<b>14</b>
a.	<i>Organización molecular</i> .....	<b>14</b>
b.	<i>Ubicación en tejido testicular</i> .....	<b>15</b>
c.	<i>Regulación</i> .....	<b>15</b>
5)	<b>Mecanismos de señales</b> .....	<b>17</b>
a.	<i>Proteínas intercambiadoras de nucleótidos</i> .....	<b>17</b>
b.	<i>Descripción de las proteínas cinasas</i> .....	<b>17</b>
c.	<i>MAP Proteínas cinasas cinasas (MEK)</i> .....	<b>18</b>
d.	<i>MAP Proteínas cinasas (ERK)</i> .....	<b>18</b>
e.	<i>Factores de transcripción</i> .....	<b>20</b>
f.	<i>Proteínas de la familia Raf-1</i> .....	<b>21</b>
<b>III.</b>	<b>Planteamiento del problema e Hipótesis</b> .....	<b>23</b>
<b>IV.</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>25</b>
<b>V.</b>	<b>Material y métodos</b> .....	<b>26</b>
a.	<i>Material biológico</i> .....	<b>26</b>
b.	<i>Producción de embriones de ratón</i> .....	<b>26</b>

	c. <i>Disgregación celular</i> .....	26
	• <i>Obtención de Cultivos Heterogéneos</i> .....	26
	• <i>Obtención de Células de Leydig y Sertoli purificadas</i> .....	27
	d. <i>Cálculo del número de células</i> .....	27
	e. <i>Sembrado de las células</i> .....	28
	f. <i>Fijación de células</i> .....	28
	g. <i>Inmunocitoquímica</i> .....	29
<b>VI.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>30</b>
	a. <i>Expresión del IGF-I, IGF-IR<math>\alpha</math> y C-Raf</i> .....	<b>32</b>
	• <i>En Células de Leydig</i> .....	<b>32</b>
	• <i>En Células Sertoli</i> .....	<b>36</b>
<b>VII.</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>34</b>
<b>VIII.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>39</b>
<b>IX.</b>	<b>Bibliografía</b> .....	<b>40</b>
<b>X.</b>	<b>Apéndice</b> .....	<b>45</b>

## I. Resumen

La familia de proteínas relacionadas a la insulina como el Factor de Crecimiento Similar a la Insulina tipo I (IGF-I) y su receptor participan en la regulación de la función en testicular adulta de algunos mamíferos. Sin embargo, en la etapa prenatal la función del IGF-I, IGF-IR y la vía de señalización no se conoce en el ratón. El objetivo de la presente investigación fue observar la expresión del IGF-I, IGF-IR y la proteína C-Raf en cultivos de células de Sertoli y Leydig provenientes del ratón *Mus musculus* en la etapa fetal de 16 días de gestación (d.g.) y perinatal 18 d.g., lo cual nos permitirá proponer las bases para entender la función de estas proteínas en el testículo. Para ello, se emplearon ratonas preñadas de 16 y 18 d.g., de la cepa CD1, se aislaron los testículos de los embriones y se disgregaron con tripsina para obtener las células de Leydig y Sertoli. Se sembraron  $1 \times 10^4$  células con 1 ml de medio de cultivo D'MEM suplementado 24 hrs en cajas de Nunclon<sup>R</sup>. Las células se fijaron con glutaraldehído 0.3 % en PBS 0.1 M, 10 min a temperatura ambiente, se lavaron con PBS 0.1 M y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las células se incubaron con anticuerpo primario anti-IGF-I, anti-IGF-IR $\alpha$  y anti- C-Raf, 24 hrs. Se usó un método de revelado indirecto, se incubó con un anticuerpo secundario una hora de la siguiente manera: IGF-I con un anticuerpo anti-cabra biotilinado, el IGF-I IR $\alpha$  con un anti-conejo biotilinado y la proteína C-Raf con un anti-ratón biotilinado. Las células se revelaron utilizando el sistema biotina-avidina-peroxidasa con diaminobencidina tetraclorhídrica. La inmunodetección reveló que el IGF-I y su receptor  $\alpha$  se expresan tanto en las células de Leydig como en las de Sertoli a los 16 y 18 d.g. La proteína C-Raf también se encontró en los mismos cultivos celulares. Estos hallazgos demuestran que ambos siguen la misma vía de señalización. Se propone que ambos tipos celulares regulan de manera autocrina la función testicular del ratón *Mus musculus*.





## II. Introducción

### 1) Antecedentes

Durante la fecundación del ovocito por un espermatozoide se establece el sexo cromosómico en los mamíferos, en la mayoría de los casos la hembra es XX y el macho XY. Como resultado del sexo genético se determina el sexo gonadal, de tal manera que los individuos XX desarrollan ovarios y los XY testículos (1).

Debido a que la gónada puede diferenciarse como un testículo o un ovario; este proceso representa la primera manifestación fenotípica de la diferenciación sexual durante el desarrollo embrionario y se denomina diferenciación sexual primaria, mientras que la diferenciación secundaria se asocia con la diferenciación de genitales internos y externos (2). Así la diferenciación de la gónada masculina en los roedores ocurre en la etapa embrionaria debido a la presencia del gen *Sry*, considerado el gen primario de la diferenciación sexual. Éste se ubica en el brazo corto del cromosoma “Y” y se expresa de los 10.5 a los 12.5 d.g. en las células somáticas de Sertoli del ratón (3-5). Clásicamente durante la diferenciación sexual de los invertebrados se han distinguido tres etapas o niveles de diferenciación sexual: el sexo genético, el sexo gonadal y el sexo fenotípico (Fig. 1).

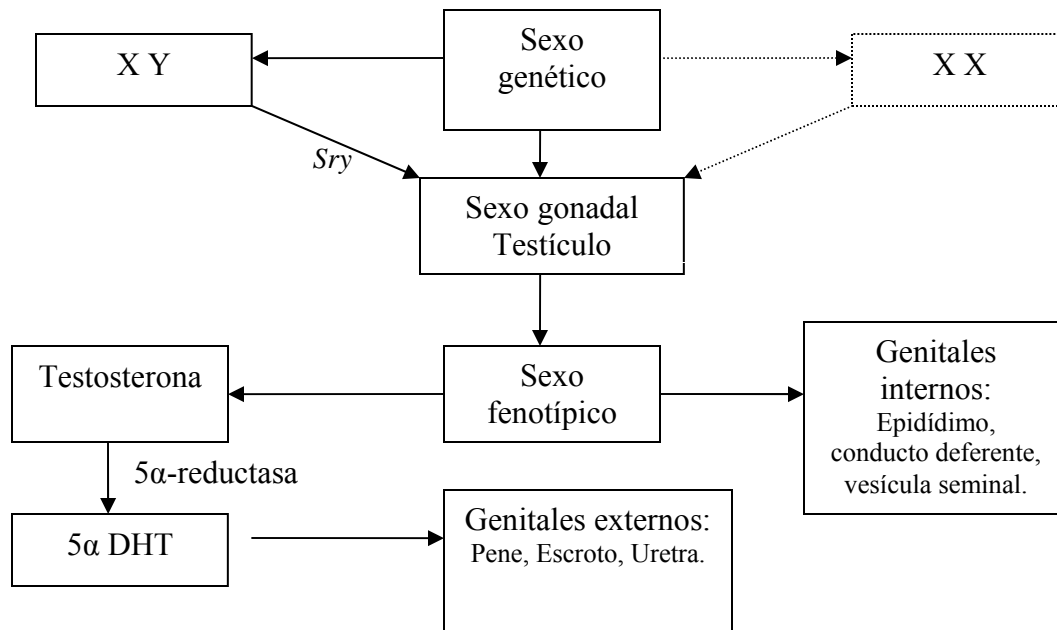


Fig.1 Esquema de la diferenciación sexual. Gen determinante de la diferenciación testicular (*Sry*); 5 alfa dihidrotestosterona (5α -DHT).

Determinado el sexo del embrión, ocurren una serie de segmentaciones que procederán a la formación de los órganos, entre estos las gónadas. Desde ese momento se diferencian dos tipos de células: las células somáticas (encargadas de elaborar diversos factores hormonales, proteínas y genes que están involucrados en la diferenciación sexual durante el desarrollo y el mantenimiento del adulto) y las células germinales (que proliferan, se diferencian y dan origen a los gametos).

## 2) Desarrollo testicular en roedores

### a. Cresta genital

La primera manifestación del desarrollo gonadal se aprecia por un par de engrosamientos longitudinales que van de la región dorsal a la caudal, llamadas crestas genitales (Fig. 2). Estas se forman por la proliferación del epitelio celómico y concentración del mesénquima subyacente (6). En la formación de esta área participan las células germinales primordiales (CGPs) que tienen un origen extraembrionario, debido a que provienen del endodermo del saco vitelino y se ubican por primera vez a los 5 d.g. (Fig. 3 A). En el ratón la fase de cresta genital se puede observar por primera vez a los 9.5 – 10.5 d.g. (7).

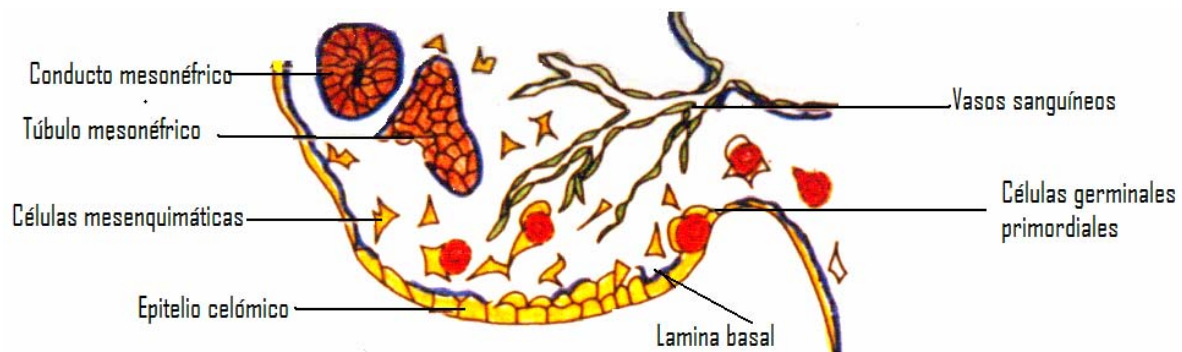


Fig.2 Esquema de la cresta genital de un embrión de ratón de 10.5 d.g. (Tomado de Merchant-Larios, 1993).

Las CGPs se trasladan desde el saco vitelino a través del intestino posterior recién formado y luego hacia arriba por el mesenterio dorsal al interior de la cresta genital derecha

e

izquierda (Fig. 3B). La porción somática de la gónada está formada por células del mesodermo intermedio y del mesodermo lateral esplácnico (6-7).

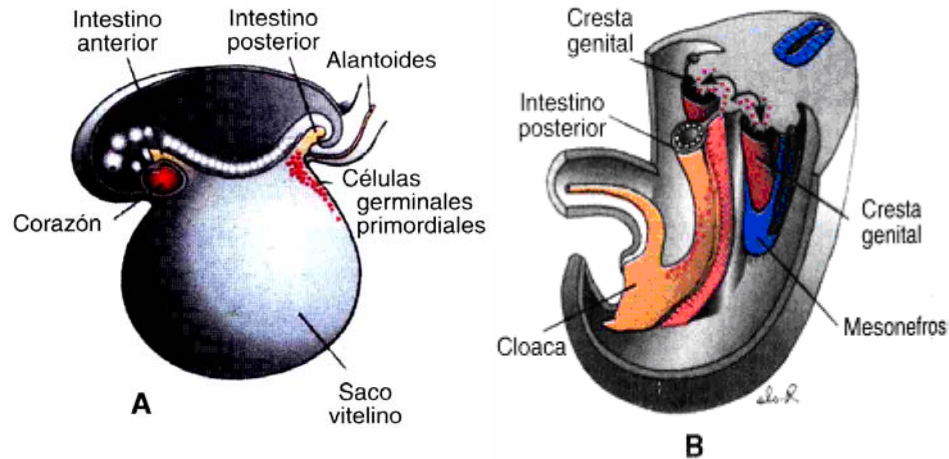


Fig. 3. A. Se muestran la CGPs en la pared del saco vitelino, cerca de la región del alantoides. B. Camino que siguen en su migración las CGPs a lo largo de la pared del intestino posterior y el mesenterio dorsal hacia la cresta genital (Tomado de Lagman, 2004).

La migración de las CGPs ocurre desde su sitio de origen hasta la región urogenital del embrión donde se formarán las gónadas, estas se desplazarán pasiva y activamente.

Para explicar la direccionalidad de las CGPs se han propuesto tres mecanismos: el primero consiste en un gradiente de concentración de algún factor secretado por las células del epitelio celómico situado en la región urogenital, ahora se sabe que puede ser el factor de crecimiento transformante beta ( $TGF-\beta$ ) (9). En el segundo modelo las CGPs se guiarían por un proceso de quimiotaxis. Este mecanismo posiblemente ocurre a través de una guía por contacto, lo cual implica la existencia de receptores en la superficie de las CGPs para adherirse a las moléculas de la superficie. El tercer mecanismo consiste en una organización topográfica de las células somáticas del embrión (Fig. 4) (7).

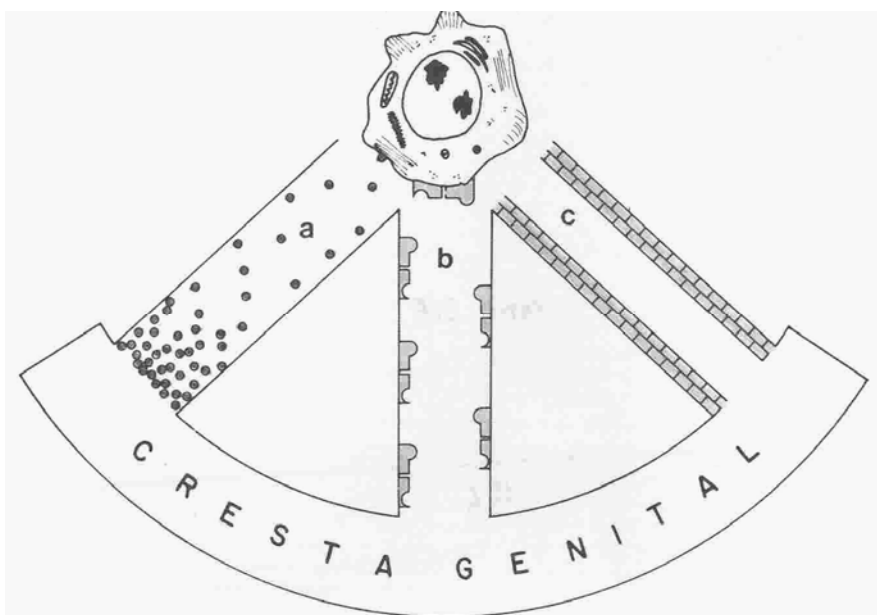


Fig.4. Mecanismos que guían a las CGPs hacia la cresta genital. a) Gradiente de concentración; b) Guía por contacto; c) Arreglo topográfico (Tomado de Merchant-Larios, 1993).

Las células germinales primitivas que invaden la cresta genital tienen una función inductora que resulta después de la activación del cromosoma “Y” de las células del mesodermo intermedio que se diferencian en tejido intersticial con células de Leydig y del mesodermo lateral esplácnico en células de Sertoli (7).

#### **b. Gónada indiferenciada**

La etapa subsecuente en la diferenciación gonadal es la gónada indiferenciada. Esta es un órgano bilateral localizado en la región ventral del mesonefros, a la cual podemos definir como una región anátomo-funcional de la cual se diferencia las gónadas femeninas y masculinas (7). La gónada indiferenciada se origina a partir del reborde epitelial celómico de la cresta urogenital y del mesodermo intermedio ventral al mesonefros. Este proceso se inicia con la condensación de las células de origen mesotelial y mesenquimático (Fig. 5). La gónada indiferenciada en los ratones se forma alrededor de los 11 y 11.5 d.g. Los cordones sexuales primarios crecen a partir del epitelio celómico y se dirigen en dirección dorsal para penetrar en la gónada, con la llegada de las CGPs a la gónada favorece su desarrollo y diferenciación (7).

Una vez que llegaron las CGPs a la cresta genital, en donde ya las células somáticas han proliferado, se comienza a observar una condensación de células de origen mesotelial y mesenquimático que gradualmente conducirán a la formación del blastema gonadal (aquí se encuentran la CGPs). En este primordio embrionario se pueden observar dos tipos de tejidos: los cordones sexuales; en este arreglo celular se encuentran la mayoría de las CGPs, y el estroma; que tiene células de tipo mesenquimático y vasos sanguíneos que van a irrigar a la gónada indiferenciada (10).

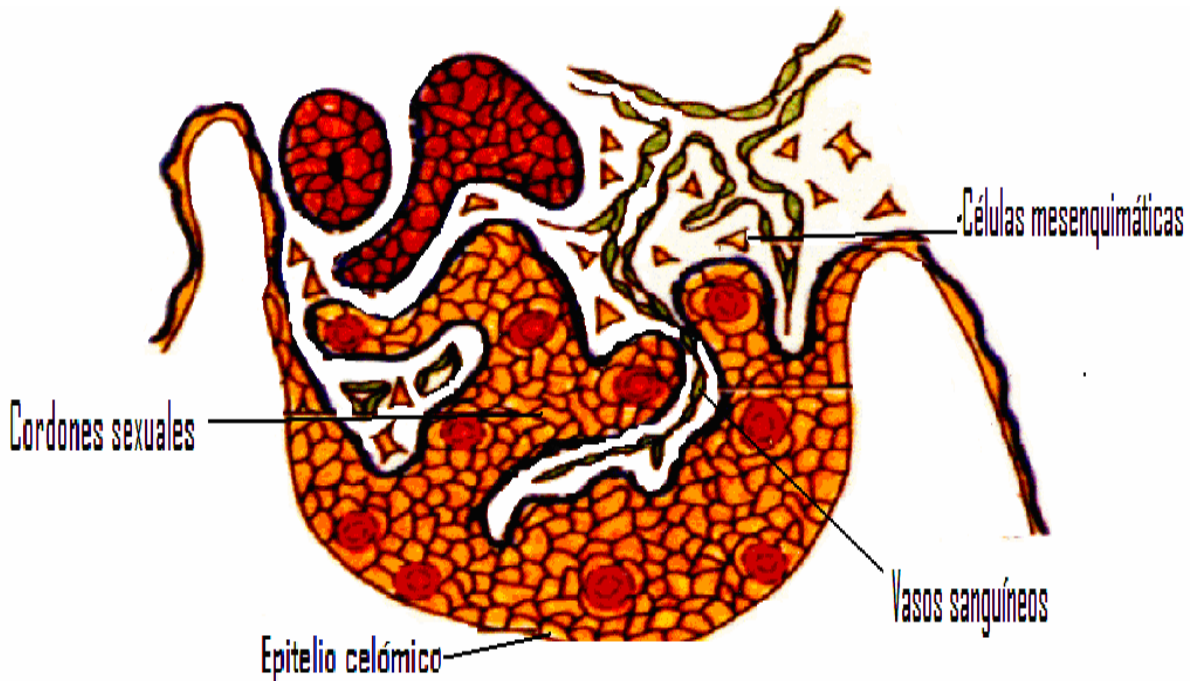


Fig. 5. Gónada indiferenciada de ratón 11.5 d.g. (Tomado de Merchant-Larios, 1993).

### *c. Diferenciación testicular*

Los individuos genéticamente machos de 12 d.g. sufren cambios morfológicos y funcionales. Primero los cordones sexuales se separan gradualmente del epitelio celómico. Segundo ocurre el compactamiento de los cordones, así como a la activa invasión y proliferación del tejido mesenquimatoso y de vasos sanguíneos provenientes de la región mesonéfrica (7).

En la médula del testículo los cordones sexuales son denominados “cordones seminíferos” en la etapa embrionaria y subsecuentemente a la formación del lumen se

nombran “tubos seminíferos” en la vida adulta (11). Dentro de los cordones se encuentran las células somáticas epiteliales o pre-Sertoli rodeadas por la lámina basal (11). El tejido estromático que se encuentra entre los túbulos seminíferos contiene a las células mioides, vasos sanguíneos, fibroblastos y células de Leydig (7). (Fig. 6).

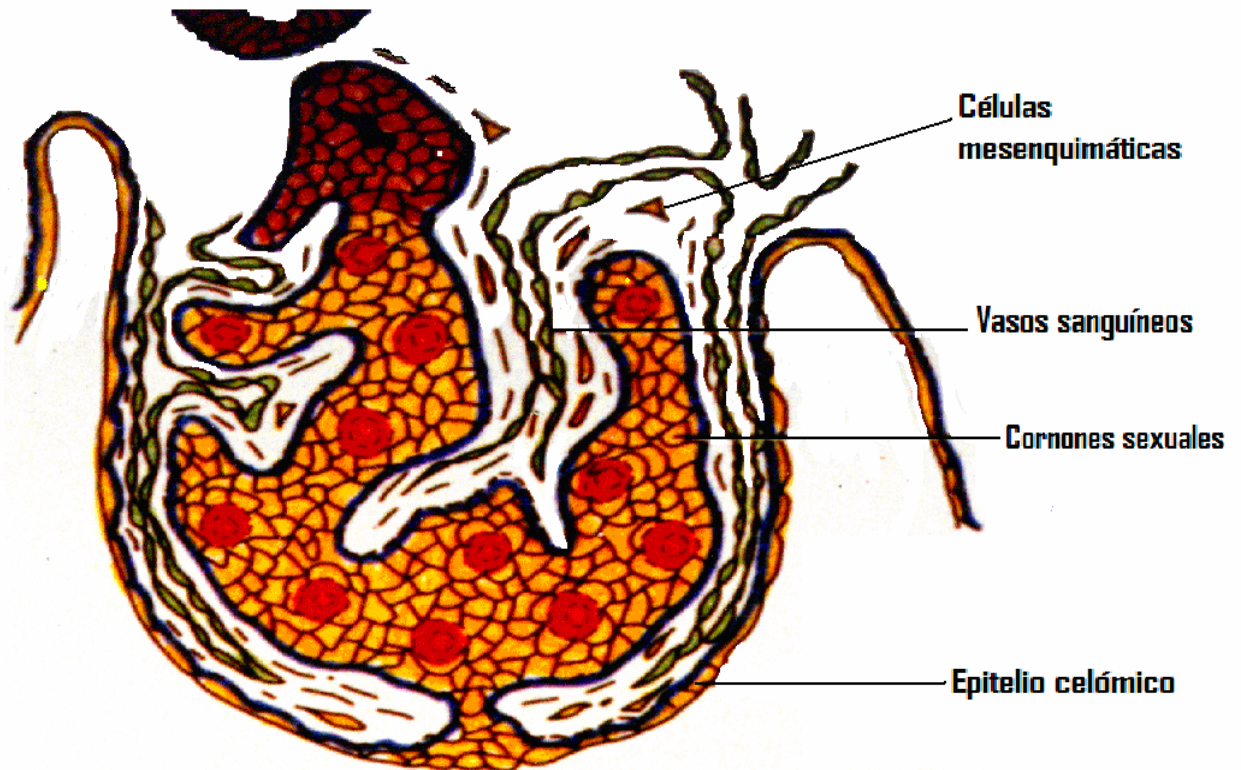
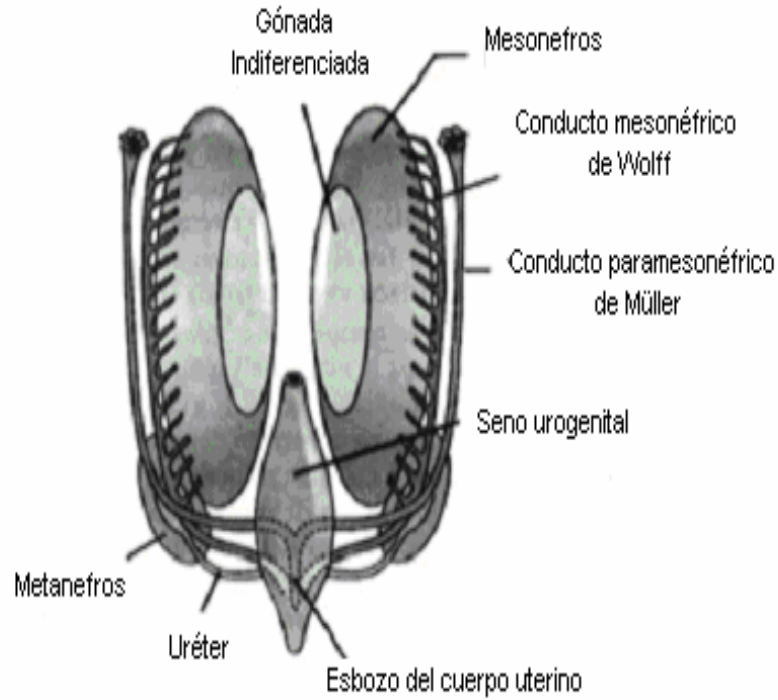


Fig. 6. Diferenciación del testículo. Se nota la invasión de mesénquima y vasos sanguíneos que separan a los cordones sexuales (Tomado de Merchant-Larios, 1993).

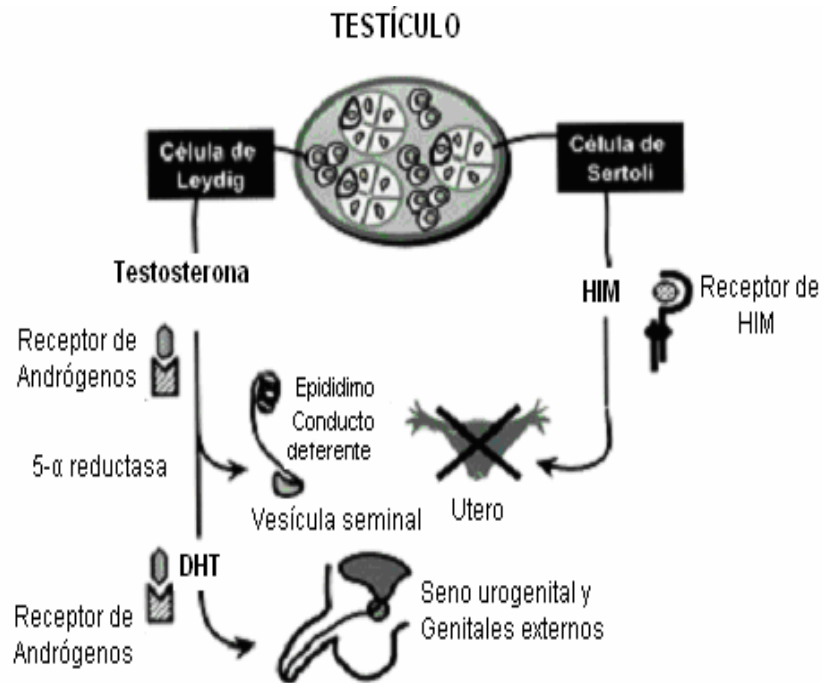
Con la diferenciación del testículo se comienza la producción de tres hormonas importantes para el establecimiento del fenotipo masculino. La primera es la hormona inhibidora de los conductos de Müller (HIM), que es secretada por las células de Sertoli, la cual provoca la regresión de los conductos de Müller y reprime la formación de los genitales internos femeninos (Fig. 7A). La segunda es la testosterona producida por las células de Leydig, para la virilización de los conductos de Wolf los cuales se diferencian en epidídimo, vesícula seminal y conductos deferentes (6). Y la tercera es la 5 alfa



dihidrotestosterona ( $5\alpha$ -DHT), que es la responsable de la diferenciación de los genitales externos; como el pene, escroto y uretra (1,2,11,12) (Fig.7B).



A



B

Fig.7A. Conductos de Müller y de Wolff, (Tomada de Moore, 1999). 7B. Regulación hormonal de la diferenciación sexual fetal fenotípica (Tomada de Rey, 2001).

**d. Gen determinante de la diferenciación testicular**

En las etapas tempranas del ratón a los 11 d.g. las gónadas de ambos sexos son morfológicamente idénticas. Sin embargo, en el caso de los machos genéticos existe ya una diferenciación a nivel molecular partir de los 10.5 d.g. debido a la expresión del factor determinante de la diferenciación testicular denominado *Sry* en el ratón (Fig. 8). La máxima expresión ocurre a los 12.5 d.g. momento en el cual se inicia la diferenciación morfológica del testículo (7).

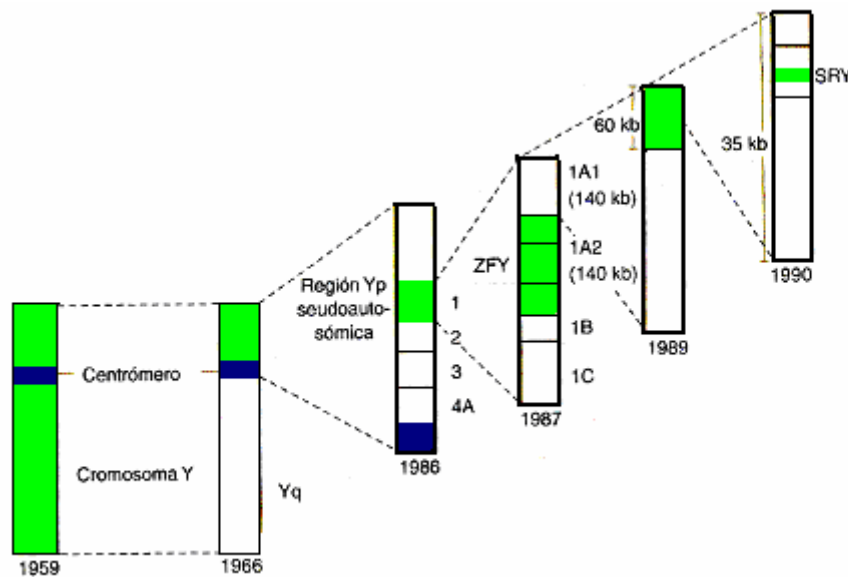


Fig. 8, Cronograma del avance de la localización del gen de la determinación sexual en el cromosoma "Y" (Tomado de Carlson, 2000).

El gen *Sry* se localiza en la región llamada pseudoautosomal, arriba del centrómero (brazo p) situado en el brazo corto del cromosoma "Y" en los mamíferos (13). El *SRY* esta formado por un exon, constituido de 35 kilo bases (kb) en el humano; un fragmento de solo 14 kb del *Sry* del ratón puede conducir al desarrollo de los caracteres sexuales masculinos en hembras (14-16).

La diferenciación sexual es un proceso poligenético, regulado por múltiples genes; se han identificado algunos genes autosomales que participan en este proceso. La tabla describe los nombres de los genes mas importantes para la diferenciación gonadal (Tabla 1).



Tabla 1. Genes que se expresan al inicio del desarrollo gonadal del ratón.

GEN	FUNCIÓN	SEXO
<i>Sf1</i>	Temprano establecimiento de las gónadas; regulador de genes para la producción de esteroides	M
<i>Wt1</i>	Temprano establecimiento de las gónadas e hígado; posible regulador de la expresión de <i>Sry</i>	M/F
<i>Sox9</i>	Diferenciación de células de Sertoli y desarrollo del testículo.	M
<i>Mis</i>	Regresión de los conductos de Müller	M
<i>Dhh</i>	Desarrollo de las células germinales	M
<i>Fgf9</i>	Proliferación en testículo	M
<i>DmRt-1</i>	Mantiene a los túbulos seminíferos después del nacimiento	M

M= Masculino F= Femenino (Tomado de Tilman y Capel, 2002).

### 3) Factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-1)

#### a. Organización del gen

El factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) es un péptido que tiene un peso molecular de 7.5 kilodaltones (kD). El gen del IGF-I se ubica en el cromosoma 10 en el ratón, está formado por 6 exones, cinco intrones, dos promotores y tiene una longitud de 80 kb (17).

El IGF-I está relacionado por su homología estructural con la proinsulina, la cual está constituida por los dominios BCAD y E. Los dominios A y B son análogos a la cadena A y B de la proinsulina con 35 aminoácidos (a.a.), ambas secuencias forman el dominio E que podrían codificar variantes de la región amino terminal para el péptido señal pre-pro IGF-I (18), lo que depende del codón de iniciación y de transcripción que es empleado *in vivo*. Además, el IGF-I posee regiones 5' alternativas sin traducir que se han identificado en el ratón (Fig. 9).

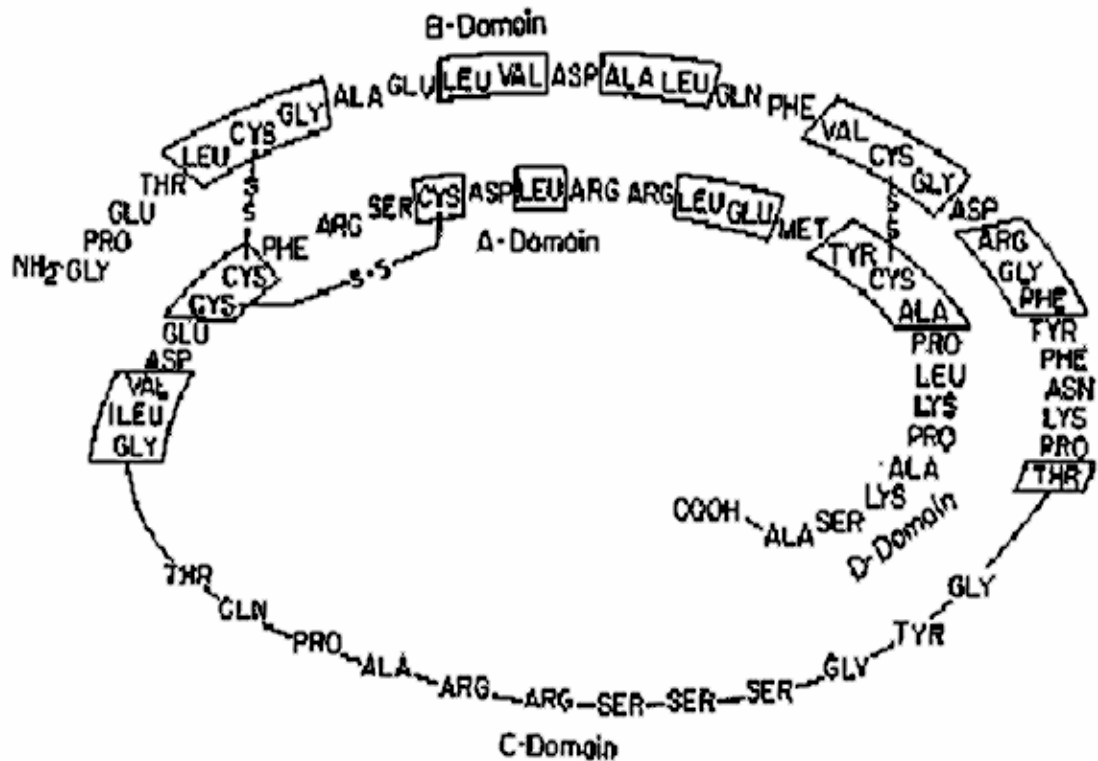


Figura. 9. Secuencia de la proteína del IGF-I (Tomado de Clemmons, 2003).

**b. Características de la proteína**

Los factores de crecimiento similares a la insulina comprenden una familia de péptidos con funciones de proliferación y diferenciación celular y algunos efectos metabólicos similares a la insulina (19).

Rinderknecht & Humbel (1978), aislaron y describieron la secuencia de las dos formas de IGFs denominados IGF-I e IGF-II, estos fueron definidos como factores de sulfatación, anormal o sin actividad similar a la insulina. El IGF-I parece ser un de los reguladores primarios del crecimiento posnatal (20).

**c. Función en la regulación endocrina testicular**

Los transcritos del IGF-I se han detectado en etapas tempranas antes de la implantación del embrión de ratón a los 7.5 días de desarrollo (26). De igual forma la expresión del IGF-I se ha demostrado en una variedad de tejidos, tales como hígado, útero, riñón y cerebro en diferentes especies de mamíferos (21-23), en el ovario posnatal y testículo embrionario del ratón (24-26). Recientemente se publicó que el ARNm del IGF-I se detecta durante el desarrollo testicular del ratón en etapas prenatales desde los 11 a los 18 d.g. En estos estudios se demostró que el IGF-I *in vitro* en células de Leydig aumenta 30% de la producción de testosterona y  $17\alpha$  hidroxiprogesterona del testículo fetal (26). Estos datos plantean que el IGF-I es un regulador importante de la función secretora del testículo fetal. Falta por establecer el mecanismo a través del cual se regula la actividad endocrina de este órgano prenatalmente por IGF-I.

**d. Efectos en la diferenciación y proliferación celular**

El IGF-I es de gran importancia para el crecimiento y desarrollo normal del organismo. El IGF-I participa en muchos procesos fisiológicos normales, que van desde el crecimiento durante etapas tempranas del período embrionario, hasta la regulación de funciones específicas de varios tejidos y órganos en etapas posteriores del desarrollo. Las funciones biológicas atribuidas al IGF-I sólo pueden llevarse a cabo cuando éste se une a su receptor celular específico (IGF-IR). Este se expresa en la superficie de la membrana celular y pertenece a la familia de los receptores tirosina-kinasa. En el ratón el IGF-I regula el desarrollo de estadios fetales posteriores. La expresión RNAm del IGF-I se ha

demostrado en una variedad de tejidos, como hígado, útero y ovario posnatal en diferentes especies de mamíferos como la rata, puerco, ratón, entre otros (21-23). Investigaciones realizadas en el ratón por Villalpando y López Olmos (2003), demostraron que el IGF-I se expresa muy temprano durante el desarrollo gonadal masculino de los 10.5 a 17 d.g. en la cresta urogenital, hasta etapas previas al nacimiento (17 d.g.) (26). Así mismo, se sabe que el IGF-I participa en la regulación de la producción de hormonas sexuales en el testículo embrionario y adulto de la rata y ratón (26-28). El IGF-I es uno de los factores que regulan la proliferación en la etapa posnatal de los mamíferos (21). Sin embargo, uno de los aspectos menos estudiados es su papel en la proliferación y la diferenciación de las células de Leydig y Sertoli en el testículo embrionario del ratón.

#### 4) Receptor del IGF-1

##### a. Organización molecular

El receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-IR) es una proteína que pertenece a la familia de receptores tirosina-cinasa transmembranales. El gen de IGF-IR contiene 4989 nucleótidos y codifica para 1367 a.a. (Fig.10) (29). Además contiene un péptido señal de 30 residuos (residuos 1-30) y una proteasa que rompe en un sitio de unión a los residuos 708-711 (30). Esto provoca el origen de dos subunidades  $\alpha$  (alfa) y dos subunidades  $\beta$  (beta) unidas por puentes disulfuro. Las subunidades  $\alpha$  están localizadas extracelularmente y median la unión al ligando, mientras que las subunidades  $\beta$ , se encuentran intracelularmente y son las que poseen la actividad tirosina-cinasa (31-33).

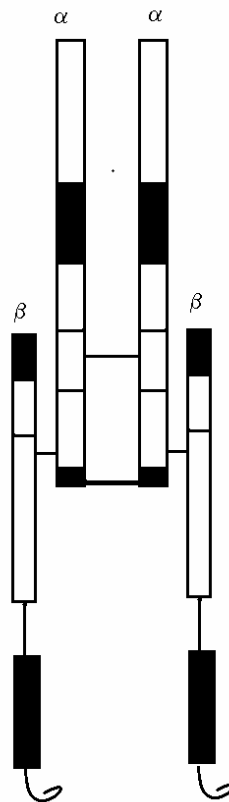


Fig. 10. Estructura del Receptor del IGF-I (Modificado de Adams, 2000).

Aunque los ligandos de esta familia de receptores (Insulina e IGF-I) comparten una estructura tridimensional común, la característica que separa al IGF-IR de los otros miembros de la familia del receptor de insulina, es que se encuentran en la superficie celular como una unión bisulfato dimerizado y requiere de una oligomerización del receptor para la señalización celular (34).

### **b. Ubicación en tejido testicular**

El IGF-IR es el encargado de efectos mitogénicos del IGF-I durante el desarrollo fetal de la proliferación de las células somáticas y protege a las células de apoptosis o muerte celular programada (29,33). El IGF-IR se expresa en varios tipos celulares como: tejido vascular, mioblastos, células del músculo liso, células endoteliales (35). Además se detecta en células del mesénquima, incluyendo células de la granulosa y células testiculares en donde se produce y almacena (36).

Este receptor se ha descrito en varias líneas celulares y en testículo adulto, pero su ubicación en el testículo del ratón en la fase embrionaria se desconoce.

### **c. Regulación**

La regulación del IGF-IR se lleva a cabo mediante la unión de este a su ligando (IGF-I), esto provoca una fosforilación del sustrato del receptor para la insulina I (IRS-I) (37). La especificidad de la unión al ligando es determinada por las regiones ricas en cisteína del dominio extracelular de las subunidades  $\alpha$ , mientras que la actividad de la tirosina cinasa reside en los dominios citoplasmáticos de las subunidades  $\beta$  (36,38-39). El IRS-I al ser fosforilado se une a una proteína que tiene dominios de homología 2 (SH2) con el src (sarcoma de Rous de las aves) (40). Este sitio le permite al IRS-I unirse a dos proteínas que activan diferentes vías. La primera es el receptor de la proteína de unión 2 (Grb-2) que se encuentra unida a IGF-IR la cual activa al gen RAS (miembro de la familia de GTPasas, que a su vez estimula la cascada de fosforilación de las células) (40). Se ha propuesto que este gen está implicado en la diferenciación celular (39). La segunda es la P85 de la quinasa fosfatidil inositol, esta forma el complejo p85/p110 que induce la producción de inositol trisfosfato que participa como regulador de la mitosis y el crecimiento celular (Fig. 11).

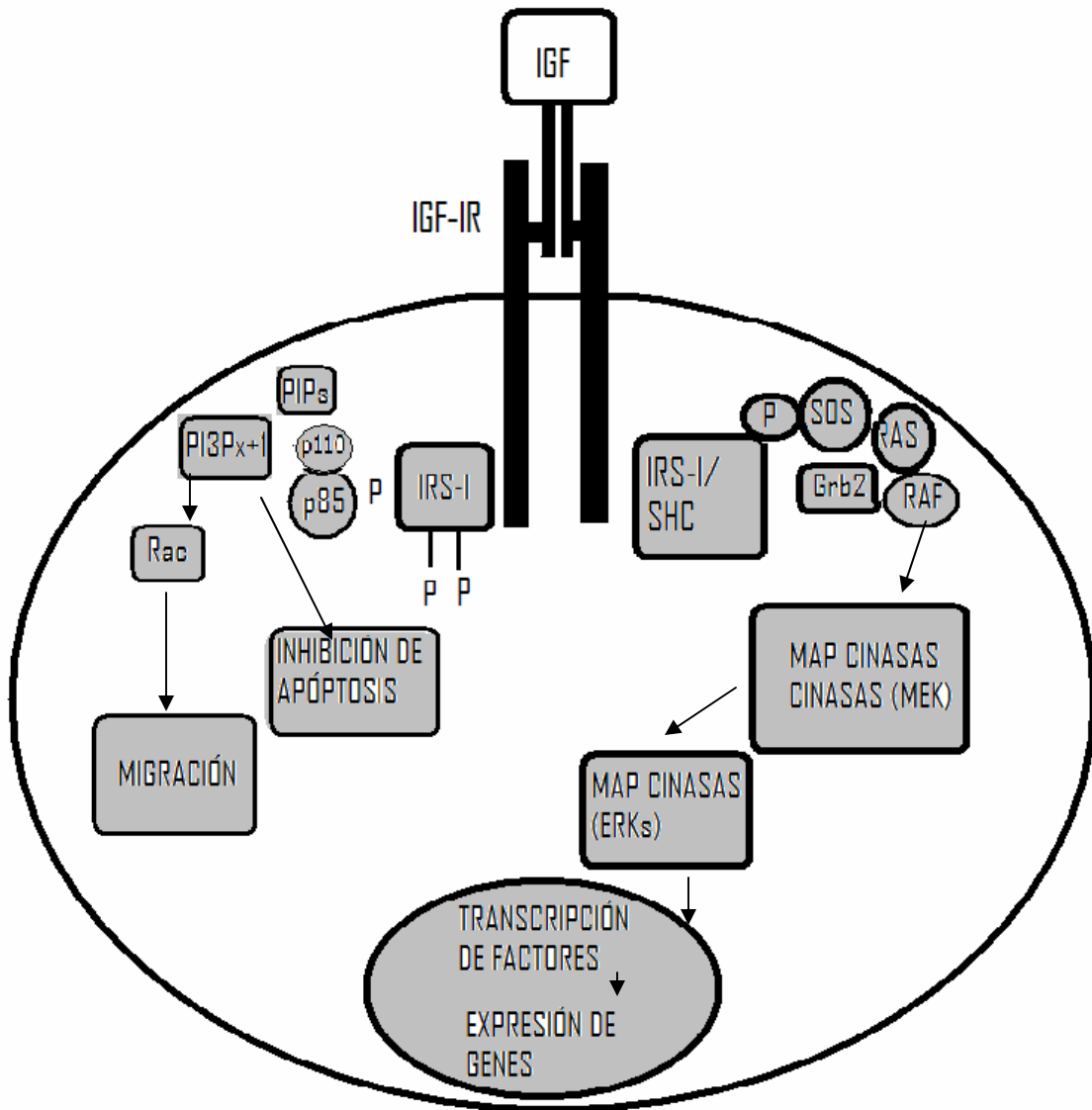


Fig. 11. Cascada de Señalización vía IGF-I/IGFIR (Modificado de Clemmons, Maile, 2003).

**5) Mecanismos de señales**

**a. Proteínas intercambiadoras de nucleótidos**

Las proteínas intercambiadoras de nucleótidos o también llamadas proteínas G se encargan de traducir las señales de una gran variedad de receptores y órganos blanco. Una de sus características es que tienen la capacidad de unir nucleótidos de guanina, se encuentran en forma inactiva en el citoplasma, se activan cuando interactúan con el receptor activado y estimulan el intercambio de su guanosina difosfato (GDP) unido por guanosina trifosfato (GTP). La activación de estas proteínas puede hacer que éstas regulen en forma estimulante o inhibitoria un efector en particular; lo que causa la activación de numerosas vías (41). Las proteínas G pertenecen a la superfamilia de proteínas con actividad de GTPasas; esta familia incluye dos grandes grupos de proteínas que participan en distintas vías de transducción:

1. Las proteínas heterotriméricas: cuya función depende de la capacidad de disociarse en un monómero  $\alpha$  y un dímero  $\beta\gamma$ . Las subunidades  $\alpha$  son GTPasas, y cada una hidroliza su GTP; cuando éste hidroliza a GDP la subunidad  $\alpha$  se reasocia con el dímero  $\beta\gamma$ . La disociación se dispara por la activación de un receptor asociado.
2. Las proteínas G de bajo peso molecular monoméricas son: *Ras* que participa en las vías de transducción que conducen a la proliferación celular, *Rho* que regula la arquitectura celular y *Rab* que participa en la movilización intracelular de vesículas (41).

Cada tipo de proteínas G al ser activada por sus receptores conecta a una o varias moléculas blanco incluyendo:

- La fosfolipasa C  $\beta$  (la enzima que libera inositol a partir de los lípidos de la membrana).
- La fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos.
- Activación de cinasas como *Ras*.

**b. Descripción de las proteínas cinasas**

Estas proteínas tienen la capacidad de añadir un grupo fosfato a un aminoácido en la proteína diana. El fosfato lo proporciona la hidrólisis de ATP a ADP. Una proteína



cinasa tiene un sitio de unión a ATP y un centro catalítico que se puede unir al aminoácido diana (42).

Existen dos grupos de proteínas cinasas de acuerdo a su localización: las que residen en la membrana y las libres en el citoplasma. Cada grupo incluye dos tipos principales de cinasas, definidos por los aminoácidos que fosforilan en la proteína diana:

1. Las proteínas tirosina cinasas (Ser/ Tyr)
2. Las proteínas serina/treonina (Ser/Thr) cinasas. Son el tipo más común de cinasas citosólicas y son responsables de la gran mayoría de los fenómenos de fosforilación en la célula.
3. Las proteínas cinasas de especificidad dual como las MEK (42).

**c. MAP proteínas cinasas cinasas (MEK)**

Las MAP cinasas cinasas (MEK) son cinasas duales que fosforilan una treonina y una tirosina, para fosforilar a las MAP cinasa (ERK) (Fig. 12). Esta doble fosforilación provoca un cambio conformacional en MAP cinasa que favorece la unión de ATP a las proteínas sustrato. A su vez las MEK son activadas por fosforilación en Ser/Thr por MEKKs (típicamente raf es activado por ras) (43).

**d. MAP proteínas cinasas (ERK)**

Cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK del inglés **Ex**tracelular **signal-regulated kinase**). Sea trata de dos quinasas efectoras de la familia de las [MAPKs](#). Son MAPK1 y MAPK2, también conocidas como p42 y p44. Son activadas por fosforilación doble por [MEK](#). Entre sus sustratos están el factor de transcripción Elk-1 y las quinasas [p90rsk](#) y [Mnk](#) (43).

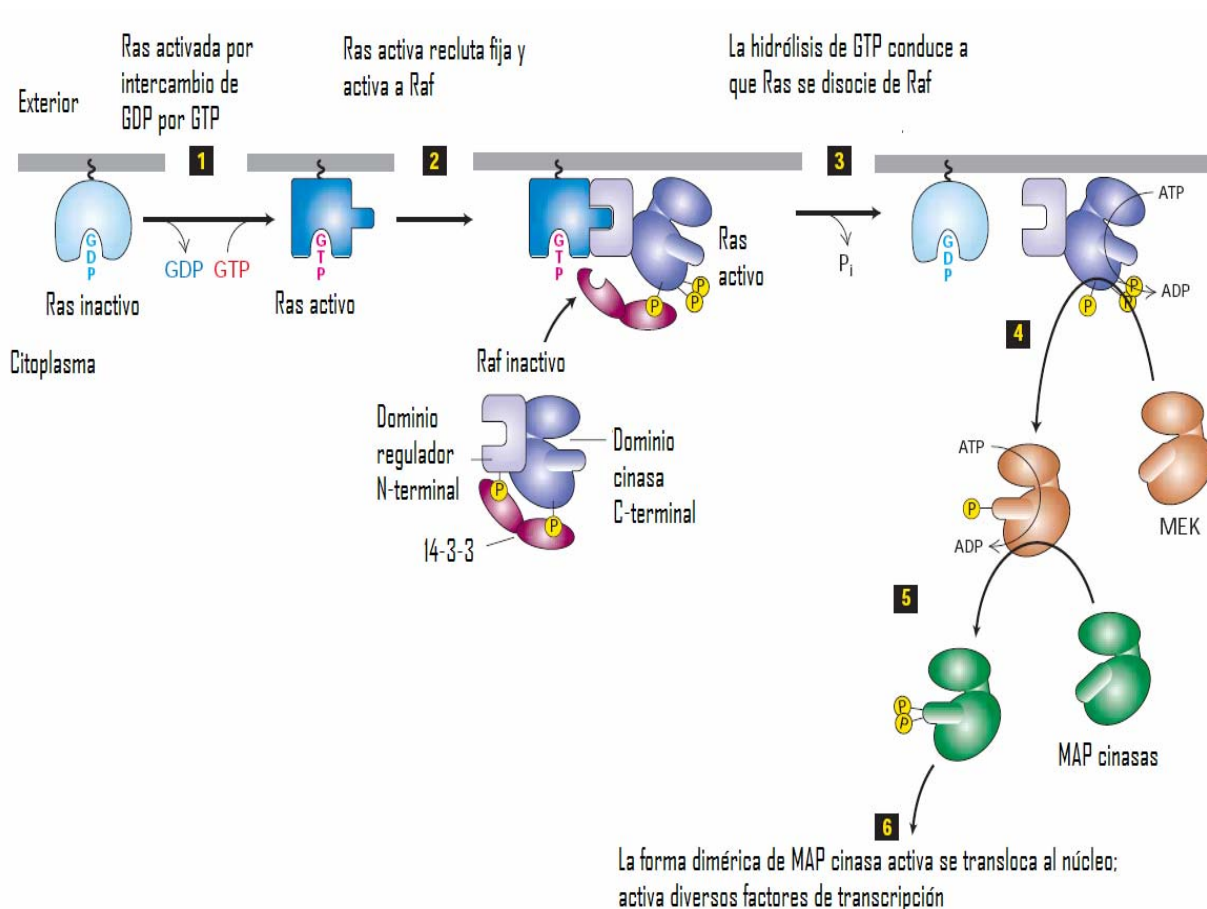


Fig. 12. Cascada de señalización de las MAP cinasas (Tomado de Lodish, 2004).

En células no estimuladas, la mayor parte de Ras está en forma inactiva unida a GDP; la unión de un ligando a su receptor (IGF-I-IGF-IR) conduce a la formación del complejo Ras-GTP activo. La Ras activada induce la cascada de cinasas corriente abajo que culmina con la activación de MAP cinasas.

*e. Factores de transcripción*

Los factores de crecimiento regulan la proliferación celular a través de una compleja red de cascadas intracelulares de señalización que finalmente inducen la transcripción de una serie de genes que van a ser vitales para la activación del ciclo celular. Dentro de los genes regulados se encuentran los genes de respuesta temprana cuya transcripción se activa rápidamente. La inducción de estos genes en respuesta a factores de crecimiento se debe a modificaciones postraduccionales (fosforilaciones) de factores específicos, implicados en la transcripción de estos genes, preexistentes en la célula de forma inactiva. Estas fosforilaciones son responsables de la activación transcripcional de los factores. Las fosforilaciones son llevadas a cabo por una o más cinasas intracelulares (MAPKs), las cuales resultan activadas tras la exposición a diferentes factores de crecimiento u otros estímulos proliferativos (42-43).

Los productos de los genes tempranos activados son factores de transcripción que pueden por tanto activar a otros genes que contengan sitios específicos de reconocimiento para ellos. Los productos de algunos de estos genes son reguladores del ciclo celular, como las ciclinas y la proteína p53 (43).

Por consiguiente, la regulación de la expresión de los genes implicados en el control del ciclo celular está estrechamente coordinada con las señales extracelulares del medio. En ausencia de factores estimuladores de la transcripción, la célula permanece en G0 impidiendo la producción de componentes del ciclo celular. En respuesta a factores de crecimiento la cascada de señales generada da lugar a la activación de una serie de genes de forma secuencial que tendrá como respuesta biológica la inhibición del bloqueo del ciclo, la entrada en G1/S y la proliferación celular (43).

f. Proteínas de la familia Raf-1

El Factor Activado por Ras (Raf) fué identificado en un oncogén derivado de tumores inducidos por el virus del sarcoma murino (v-Raf); posee actividad serina/treonina cinasas (44,45). Comprende una familia con tres isoformas, A-Raf, B-Raf y C-Raf (Fig. 13). Todos las Raf cinasas están compuestas de tres regiones, CR1, CR2 y CR3 (46). Para la activación de Raf se requiere la interacción GTP-Ras con la región CR1 de Raf. El papel de CR2 aun no es definido pero se cree que la región CR1 y CR2 regulan negativamente a Raf pues se han detectado en células de neoplásicas de humano (46).

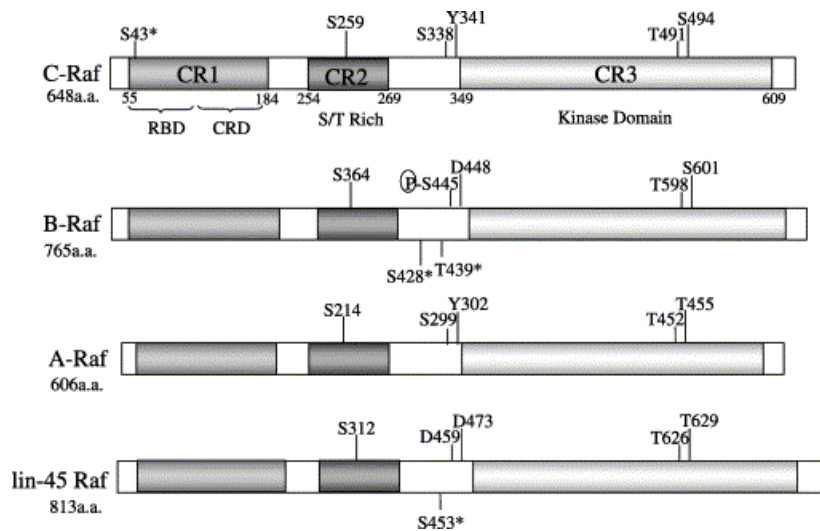


Fig. 13. Estructura de la Familia Raf cinasas, en donde se muestra las tres regiones (Tomado de Chong Huiru, 2003).

Las proteínas Raf cinasas pueden suplantar sus funciones, de tal forma que en ausencia de C-Raf puede B-Raf hacer su función. Sin embargo, se ha visto que la proteína A-Raf solo puede inducir a MEK1 pero C-Raf puede activar tanto a MEK-1 como a MEK-2 lo cual hace a la proteína C-Raf tener una amplia actividad en lo que a respuesta se refiere. También se ha descrito que las distintas isoformas también varían en su expresión y en su localización. Por ejemplo B-Raf y C-Raf se expresan en el cerebro mientras A-Raf no. C y A-Raf se expresan fuertemente en el músculo mientras que B-Raf es detectable pero en bajos niveles (47). En estudios de inhibición de la expresión de los genes de origen materno y paterno en ratón se demostró que A-Raf y B-Raf son más susceptibles a la activación de caspasas que la proteína C-Raf (48).

Raf es la cinasa inicial de la cascada de proteínas cinasas que conduce a la activación de la MAP cinasa (ERK). Raf activado fosforila y activa a la MAP cinasa cinasas (MEK), la cual fosforila y activa a la MAP cinasas (ERK). ERK fosforila a varias proteínas intracelulares (47).

### **III. Planteamiento del problema e Hipótesis**

En los últimos 10 años los factores de crecimiento han captado la atención de los investigadores dada su participación en diferentes mecanismos de regulación este es el caso del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I).

El IGF-I se expresa muy temprano (10.5 y 17 d.g) durante el desarrollo gonadal masculino desde la cresta urogenital cuando aun las células germinales se localizan y sigue estando presente hasta etapas previas al nacimiento (26). El IGF-I participa en la regulación de la producción de hormonas sexuales en el testículo embrionario y adulto de la rata y ratón (25-27); es uno de los factores que regulan la proliferación en la etapa posnatal de los mamíferos (21). Sin embargo, uno de los aspectos menos estudiados es su papel en la proliferación, la diferenciación y el tipo celular que produce el IGF-I en las células somáticas del testículo fetal del ratón (células de Leydig y Sertoli). El IGF-I ejerce su función biológica a través de un receptor, denominado IGF-IR (30-31). Este se ha descrito en varias líneas celulares y en testículo adulto, pero su ubicación en el testículo del ratón en la fase embrionaria se desconoce. Por otra parte, la unión del ligando (IGF-I) con el receptor activa una serie de proteínas, implicadas en la cascada de señales así como la regulación de las proteínas cinasas-cinasas denominadas MERK (30-31). Dentro de éstas se encuentran la familia Raf cinasas la cual agrupa a la proteína C-Raf. Esta puede activar tanto a MEK-1 como a MEK-2 ya que los otros dos miembros de la familia Raf (A-Raf y B-Raf) solo inducen a uno de los MEK; esto hace a la proteína C-Raf más eficaz en su comportamiento en la transducción de señales de las MAPK. Estudios realizados en el ratón por medio de la inhibición de la expresión de los genes de origen materno y paterno demostraron que A-Raf y B-Raf son más susceptibles a la activación de caspasas que la proteína C-Raf (47). La cascada de señales del IGF-I en las células testiculares de Leydig y Sertoli no se ha estudiado en la etapa embrionaria. Con base en ello en el presente trabajo nos propusimos identificar el tipo de células somáticas (Leydig y Sertoli) que producen el IGF-I, IGF-IR $\alpha$  y la proteína C-Raf en las etapas fetal (16 d.g.) y perinatal (18d.g.) del testículo del ratón macho. Los resultados que se obtengan nos permitirán proponer las bases para entender la función testicular embrionaria.

*Hipótesis*

- Si las células de Leydig y Sertoli de 16 y 18 d.g. sintetizan el IGF-I y el receptor (IGF-I $\alpha$ ), entonces, ambos tipos celulares expresarán la proteína C-Raf.

#### **IV. Objetivos**

1. Investigar si las células somáticas de Leydig y Sertoli expresan el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I, a los 16 y 18 d.g. durante el desarrollo testicular.
2. Determinar si las células de Leydig y Sertoli expresan el receptor del factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-IR  $\alpha$ ) a los 16 y 18 d.g.
3. Identificar el tipo celular que expresa la proteína C-Raf en el testículo fetal del ratón en las edades mencionadas.



## **V. Material y métodos**

### **a. Material biológico**

Se emplearon ratones y ratonas adultas de la cepa CD1 de 7-9 semanas de edad, que fueron mantenidas en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas: a una temperatura 18 a 22°C, ciclo de luz y oscuridad de 12/12, 80% de humedad relativa, alimento esterilizable Harlan Tekland México LM-485, con agua estéril acidificada a pH de 2.5 y en cajas de acrílico estéril; cuatro hembras adultas y un macho. El día que se detectó el tapón de copulación se denominó día cero de la gestación,

### **b. Producción de embriones de ratón**

Se utilizaron ratones hembras gestantes de 16 y 18 d.g. las cuales fueron sacrificadas por dislocación cervical. Posteriormente se les practicó en la región abdominal una incisión en forma de “V”; de esta manera se obtuvieron los embriones que se manipularon con pinzas estériles y se transfirieron a una caja de Petri estéril. Para obtener los testículos se les cortó la cabeza, se expuso la parte dorsal interna del embrión; las gónadas se aislaron en medio de cultivo M199 en un ambiente estéril de acuerdo al método descrito por Villalpando y López-Olmos (2003). Posteriormente se transfirieron a un tubo Eppendorf estéril.

### **c. Disgregación celular**

- *Obtención de Cultivos Heterogéneos*

Para los cultivos denominados “cultivos Heterogéneos” (ya que contenían células de Leydig, Sertoli y mioides) se limpió el material con alcohol al 70% y manipuló con guantes. Se hicieron grupos de 10 a 20 testículos embrionarios para 16 y 18 d.g y se transfirieron a un tubo Eppendorf con medio de cultivo M199 estéril. El tejido se colocó con un poco de medio de cultivo, se lavó con 500 µL de una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M (PBS consultar apéndice) libre de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> agitando levemente. Se enjuagó agitando suavemente y con una pipeta Pasteur siliconizada se quitó el PBS. Se prepararon 300 µL de verseno 0.1 mM en un tubo Eppendorf y se hicieron 3 lavados de 100 µL con esta solución. Se quitó el verseno con una pipeta Pasteur, y se agregó una solución de Tripsina 0.1% y se agitó 5 min a 90 rpm a 37°C en una incubadora 624 Environmental Incubator Shaker y después se disgregó manualmente el tejido con una pipeta Pasteur siliconizada por 3 min.

Se agregaron 110 µl de inhibidor de Tripsina 0.2% (almacenado a -20°C), y se agitó ligeramente con la mano. Se centrifugó 10 min a 1800 rpm en una centrífuga Eppendorf 5415C, procurando mantener el tubo en una sola dirección. El sobrenadante se decantó de un solo golpe para no resuspender el botón celular. Éste se resuspendió en 500 µl de Medio Eagle Modificado Dulbecco suplementado (D'MEM consultar apéndice). A estos cultivos se les practicó una inmunocitoquímica (descrita en la pág. 29) en donde se evaluó el IGF-I, su receptor alfa y la proteína C-Raf, los resultados no se muestran pero se aprecia la expresión en base a esto se decidió hacer cultivos individuales de células de Leydig y Sertoli.

- *Obtención de células de Leydig y Sertoli purificadas*

Para la identificación del tipo celular que produce el IGF-I, el Receptor y la proteína C-Raf en la gónada masculina del ratón se hicieron cultivos por separado de cada uno de los tipos celulares de acuerdo a la técnica descrita por Fabre y colaboradores (27).

Brevemente, una vez obtenidas las gónadas, estas se colocaron en medio D'MEM suplementado y después se adicionó una mezcla enzimática: de Colagenasa Dispasa (0.2mg/ml) y DNasa (0.1mg/ml) resuspendidas en PBS. El tejido se incubó a 37°C y se disgregó manualmente. Después de este tiempo la actividad enzimática se inhibió adicionando inhibidor de tripsina al 0.2%.

Una vez disgregado el tejido, se centrifugó y se separó el sobrenadante; al centrifugar, las células de Sertoli se precipitan en el fondo del tubo y las células de Leydig se mantienen en la superficie. Las células de Leydig así obtenidas se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron en medio D'MEM para posteriormente sembrarse.

El tejido sedimentado por gravedad (que contenía a las células de Sertoli) se disgregó nuevamente con tripsina al 0.12% y se centrifugó. La actividad enzimática igualmente se inhibió con inhibidor de tripsina al 0.2% y se centrifugó. Finalmente se resuspendió en medio de cultivo D'MEM para después sembrarlas.

**d. Cálculo del número de células**

Se hizo un conteo previo a la siembra, se tomaron 10 µl de la muestra y se colocó en un tubo Eppendorf, se adicionaron 10 µl de azul de Evans al 0.9% y se resuspendió ligeramente. Se limpió la cámara de Newbahuer y el cubreobjetos con alcohol 70%, se tomaron 10 µl de la solución muestra Azul de Evans se colocó en la cámara por

una orilla del cubre objetos; lentamente hasta cubrir la superficie de la cámara, se observaron en un microscopio óptico modelo Galen<sup>™</sup> III se contaron las células de los cuatro cuadrantes externos y se hicieron los cálculos para determinar la cantidad de células que se encuentran en un mililitro.

El número resultante será el contenido de células por 1ml y se procedió a calcular el número de células presentes en la muestra restante.

Formula para calcular el número de células en 1 ml

Número de células en 1 ml = (# de células observadas en los 4 cuadrantes) x 2500  
x Fd

Donde Fd=1

Se calculó el volumen necesario para sembrar 30,000 células por cada pozo de cultivo, este procedimiento se hizo para los cultivos a los que llamamos cultivos Heterogéneos, Leydig y Sertoli purificadas.

#### *e. Sembrado de las células*

Las células fueron sembradas en un ambiente estéril en cajas de plástico de 96 (Nunclon<sup>®</sup>) pozos, 30,000 células/pozo en 1 ml de medio de cultivo D'MEM suplementado. Se adicionó el volumen calculado del concentrado de células. Se agitó ligeramente y se verificó en el microscopio Galen<sup>™</sup> III si había células en cada pozo. Se incubó toda la noche a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### *f. Fijación de células*

A las células sembradas se les retiró el medio de cultivo y se le hicieron dos lavados con 50 µl de PBS libre de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>. Posteriormente se fijaron en los pozos con glutaraldehído 0.3 % durante 10 min (consultar apéndice). Se retiró el fijador, se hicieron otros dos lavados con PBS libre de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> y se almacenaron a -20°C.

**g. Inmunocitoquímica**

Los cultivos fijados con glutaraldehído se dividieron en grupos controles y experimentales, después se lavaron con PBS y se incubaron en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3 % por 10 min para inhibir la acción de la peroxidasa endógena de las células. Se lavaron nuevamente con PBS. Inmediatamente se incubaron con una solución de bloqueo (Tween 20, PBS 0.1M, BSA, consultar apéndice) por una hora para permeabilizar el tejido y bloquear las uniones inespecíficas. Se lavaron 2 veces con PBS por 10 min, se incubaron con el anticuerpo primario: anti-IGF-I 1:10 (R&D Systems Inc.), anti-IGF-IR $\alpha$  1:10 (Santa Cruz) y anti- C-Raf 2  $\mu$ g (BD Biosciences) diluido en solución de bloqueo toda la noche a temperatura ambiente. Se lavaron 2 veces con PBS+Tween 20 5 min cada vez, se incubaron con el anticuerpo secundario de la siguiente manera: para el IGF-I con un anticuerpo anti-cabra biotilado 1:100 (Vector Laboratories), para el IGF-I IR $\alpha$  un anti-conejo biotilado 1:100 (Vector Laboratories) y para la proteína C-Raf un anti-ratón biotilado 1:150 (Vector Laboratories) una hora. Se enjuagaron 3 veces con PBS 5 min cada uno. Se agregó la solución ABC (Vector laboratorios) por una hora, este contenía una solución de avidina-biotina peroxidasa 200:1. Se realizaron 3 lavados con PBS por 5 min. Se adicionó la diaminobenzidina tetraclorhidrica como cromógeno y sustrato DAB 200:1 (DaKo Cytomation), por 30 minutos. Se detuvo la reacción con agua biodestillada se retiró todo el exceso de agua de los pozos sacudiéndolo vigorosamente para almacenarlos a -20°C hasta el momento de fotografiar. Para los grupos control se siguió la misma inmunocitoquímica solo que no se agregó el anticuerpo primario.

Para la comprobación de que nuestros cultivos contenían realmente células de Leydig y Sertoli se hicieron una inmunohistoquímica para las células de Leydig donde se evaluó el 3 $\beta$  hidroxisteroide dehidrogenasa y una inmunocitoquímica para las células de Sertoli donde se detectó la expresión de la hormona inhibidora de los conductos de Muller (MIS) su expresión es independiente de las células germinales primordiales. Para la pureza de los cultivos también se detectó a la Alfa actina que es una proteína de tipo muscular, esto nos permitió ver la contaminación de nuestros cultivos por células mioideas.

**VI. Resultados**

Los primeros resultados que se obtuvieron fueron cuando se evaluó el IGF-I, su receptor alfa y la proteína C-Raf, en cultivos Heterogéneos. A estos cultivos se les practicó una inmunocitoquímica en donde se apreció la expresión de los proteínas (los resultados no se muestran); en base a esto se decidió hacer cultivos individuales de células de Leydig y Sertoli. Para comprobar si nuestros cultivos contenían únicamente las células mencionadas se llevó a cabo una reacción inmunohistoquímica, donde se hizo reaccionar al  $3\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa ( $3\beta$  -HSD) en células de Leydig en cultivo y para la caracterización de las células de Sertoli se realizó una inmunocitoquímica, donde se adicionó un anticuerpo anti-HIM, porque las células de Sertoli producen esta hormona (Fig.14)

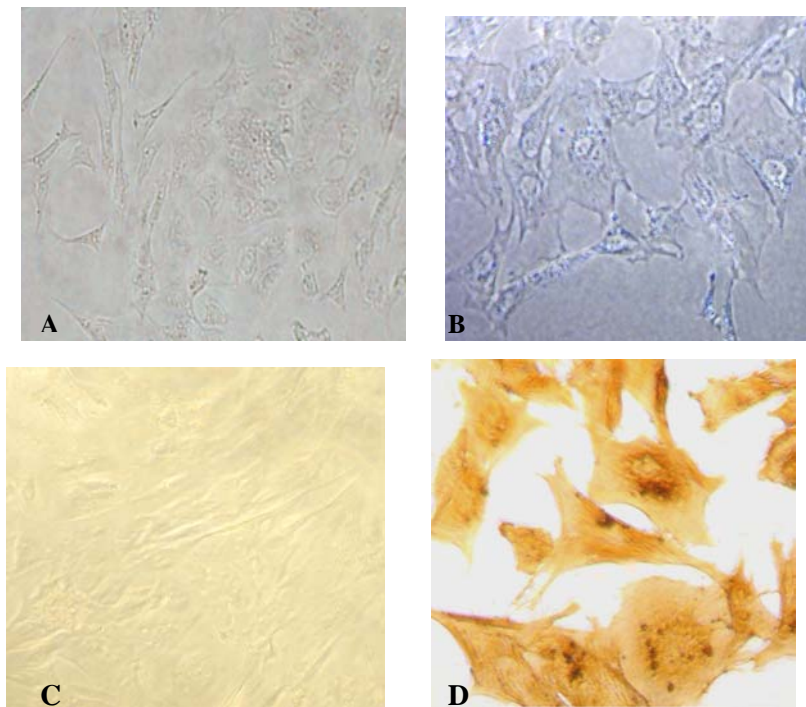


Fig.14. Células de Leydig a los 16 d.g. A) Cultivo control sin anticuerpo primario no se observo ninguna reacción 10X; B), Experimental para la identificación de  $3\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa, se observan precipitados de color morado como resultado de la reducción del nitroblue tetrazolium 20X; C), Control de células de Sertoli de 16 d.g. para la expresión de la Hormona Inhibidora de los conductos de Müller 10X; D), Fotografía de la inmunocitoquímica de la HIM en células de Sertoli, las cuales expresan esta factor para que se de la regresión de los conductos de Muller 40X.

Para conocer si nuestros cultivos no se encontraban contaminados por células mioides se hizo una inmunocitoquímica para alfa actina (Fig. 15). Las células mioides rodean a los túbulos seminíferos.

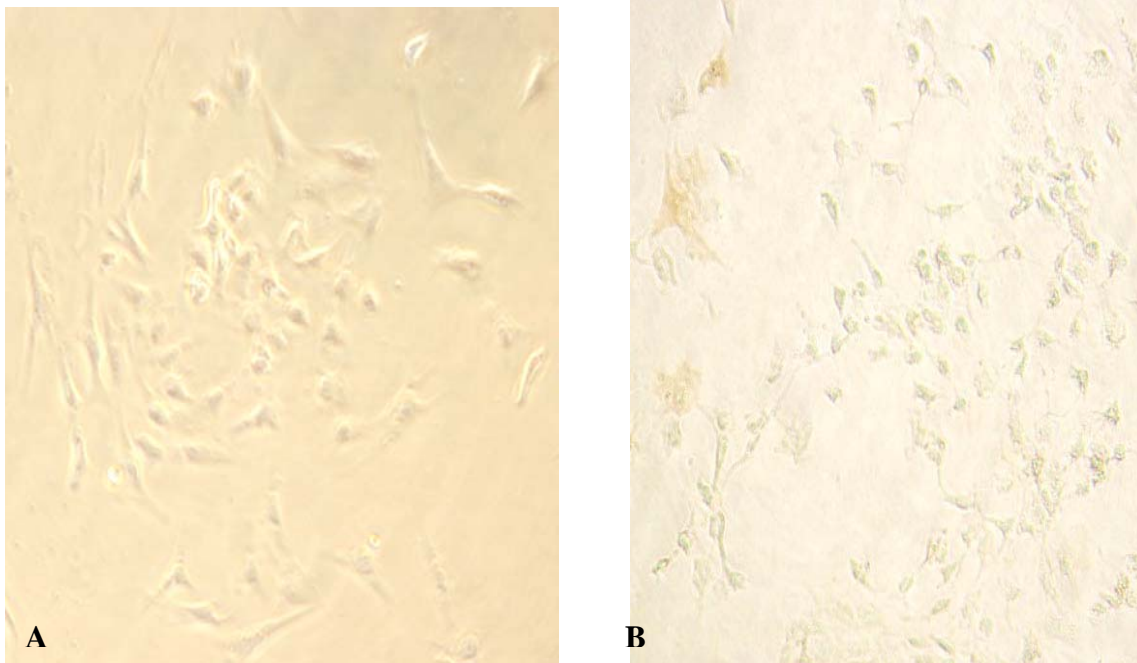


Fig. 15. Células de Sertoli de 16 d.g. A) Control para la detección de la alfa actina 10X; B), Cultivos incubados con un antierpo anti alfa actina, se utilizo un complejo peróxidasa revelado con DAB para detectar a las células mioides 10X.

En los resultados de la inmunocitoquímicas de las células aisladas de testículo, observamos que las células de Leydig a los 16 d.g. expresan el IGF-I, IGF-IR $\alpha$  y C-Raf (Fig. 16).



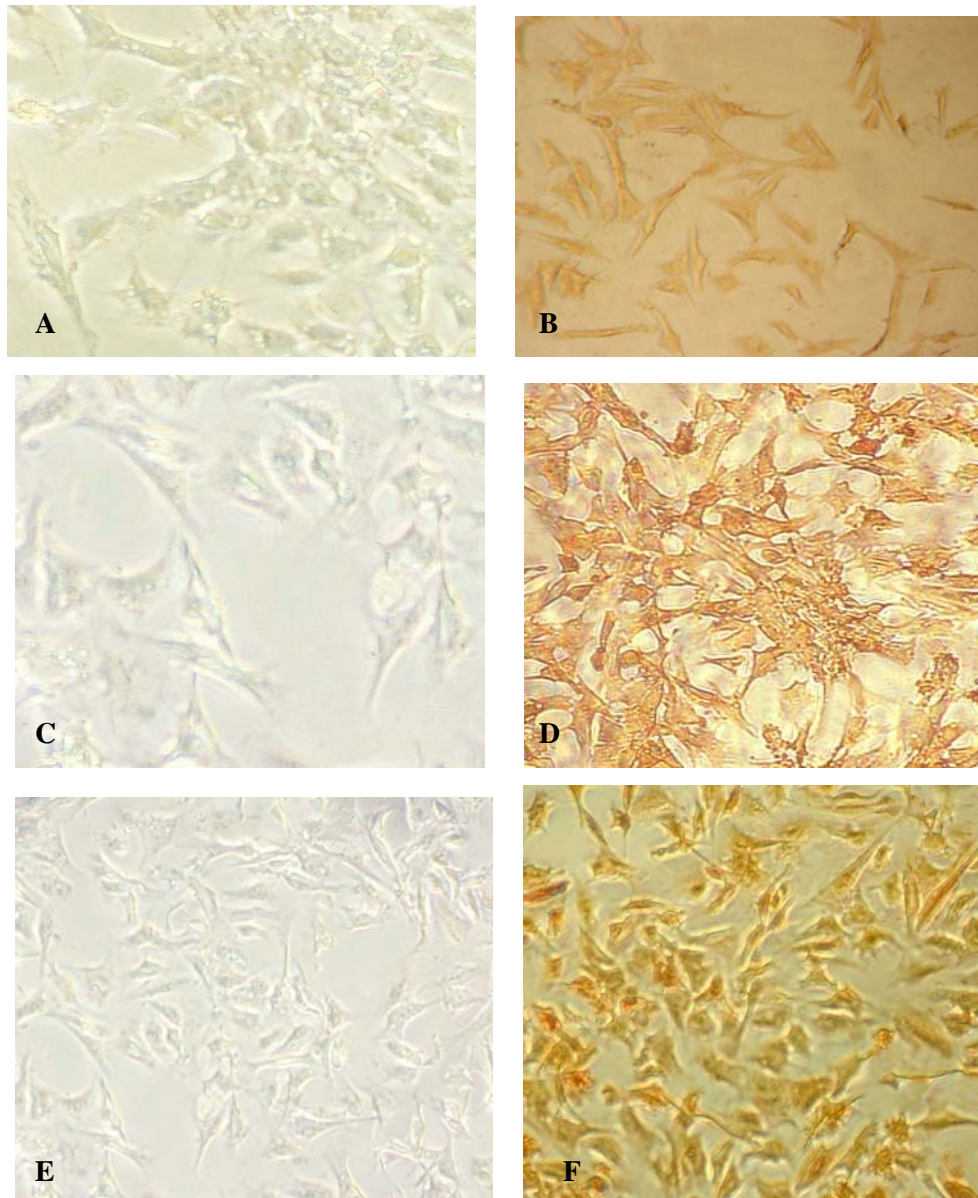


Fig. 16. A y 17 A) Cultivo control del IGF-I incubado en ausencia del anticuerpo primario, nos se observa ningún tipo de reacción en las células. 20X; 16 B y 17 B), Grupo de células de Leydig en donde se aprecia la expresión del IGF-I en el citoplasma de las células. 20X; 16 C y 17 C), Control de la tinción del IGF-IR $\alpha$  en donde no se detecta la presencia de la proteína. 20X; 16 D y 17 D), Note la coloración en las células de Leydig donde se aprecia el IGF-IR $\alpha$ . 20X; 16 E y 17E), Cultivo control aquí no se detecta la presencia de la proteína C-Raf. 20X, 40X; 16 F y 17 F), La inmunodetección en este cultivo expresó la proteína C-Raf en el citoplasma de la célula.

En la inmunodetección de las células de Leydig a los 18 días de gestación se observó la expresión de las proteínas evaluadas. (Fig. 17).

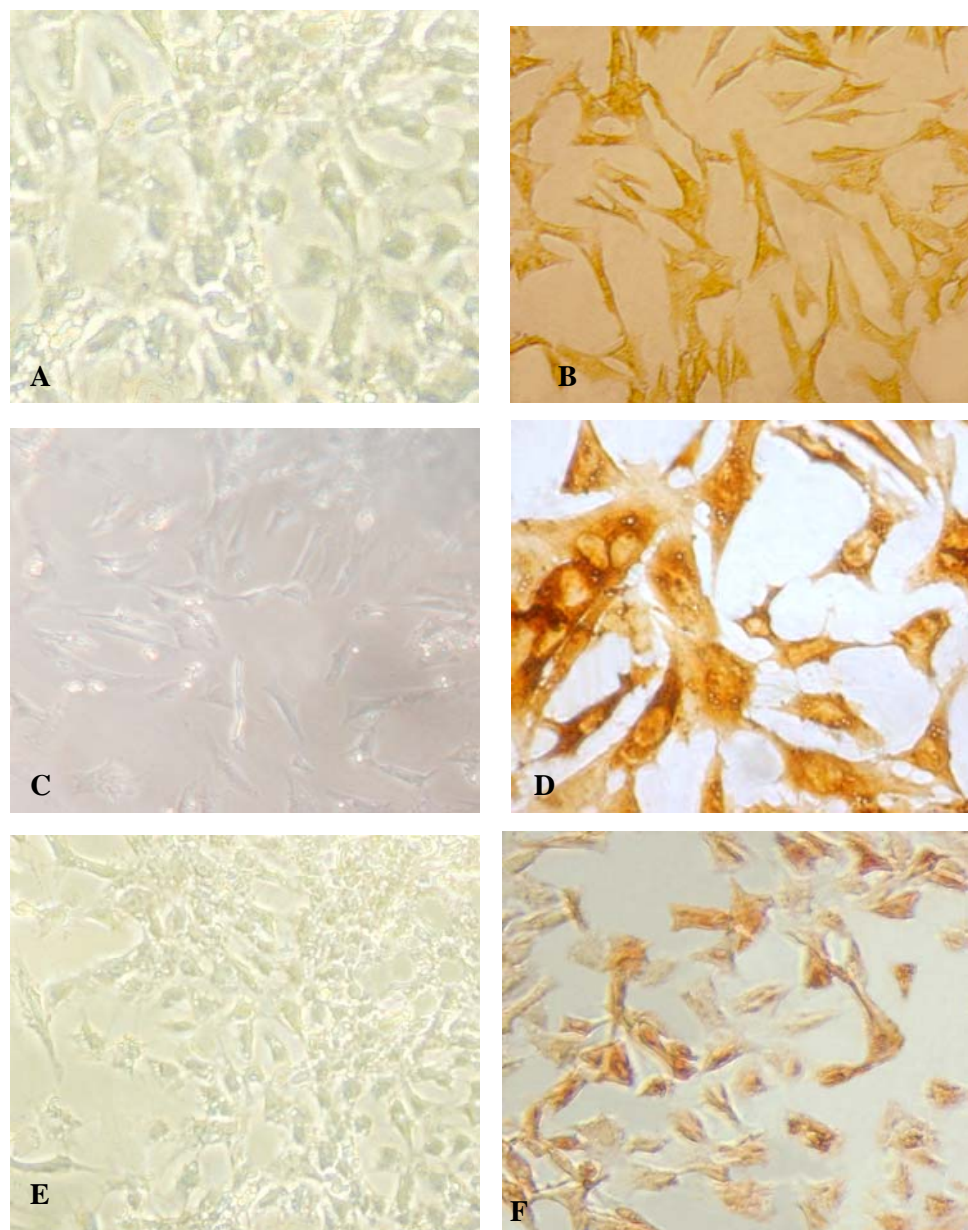


Fig. 17. Expresión del IGF-I (A, B), Receptor  $\alpha$  (C, D) y C-Raf (E, F) en las células perinatales de Leydig a los 18 d.g. Ver descripción en Fig. 16 Pág. 32.



A los 16 d.g. las células de Sertoli expresan el IGF-I, su receptor y la proteína C-Raf (Fig. 18).

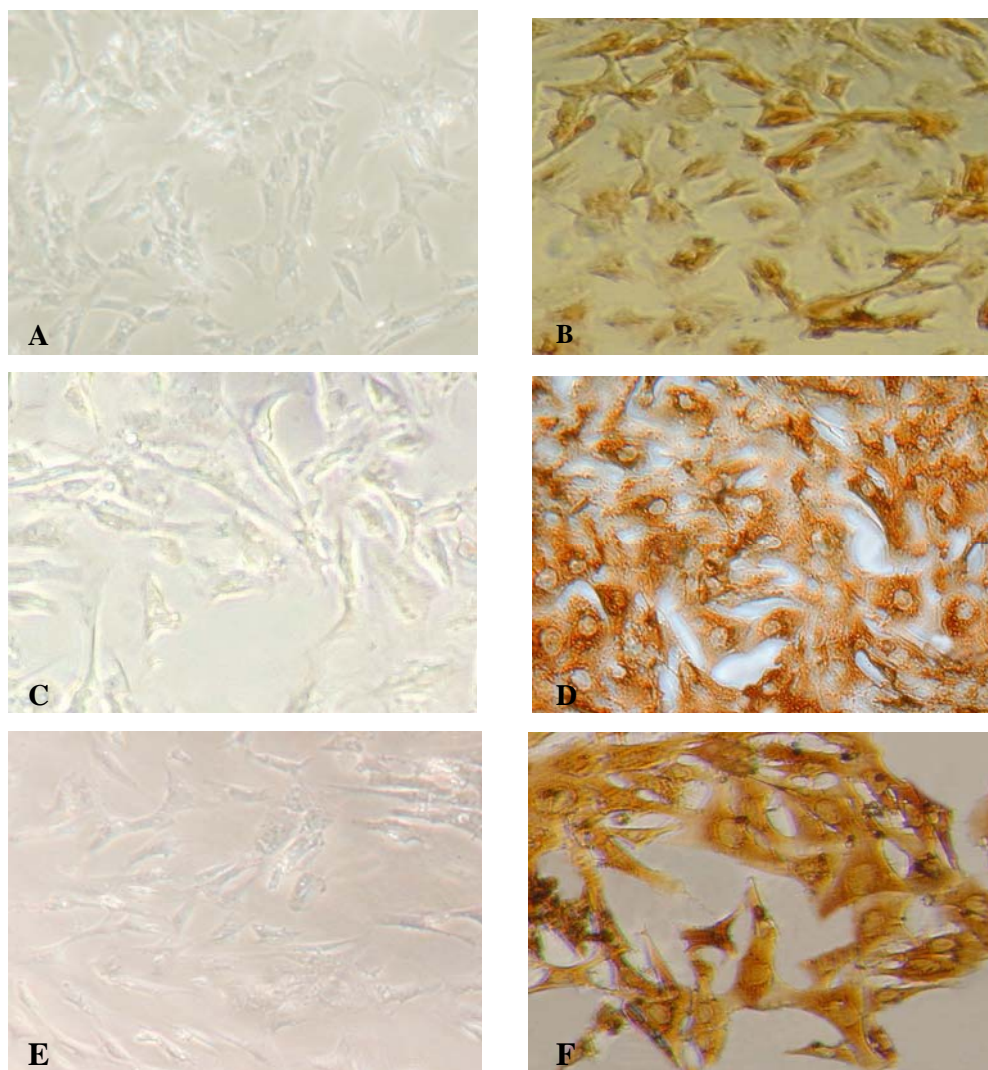


Fig. 18 A y 19 A) Se muestra un cultivo de células de Sertoli, note la ausencia del IGF-I. 10X; 18 B y 19 B), Expresión del IGF-I en células de Sertoli caracterizadas por sus extensiones citoplasmáticas, observe la reacción en el citoplasma. 20X; 18 C y 19 C), Cultivos incubados sin anticuerpo primario (anti IGF-IR $\alpha$ ) no se detecta ninguna reacción en las células. 10X; 18 D y 19 D), Expresión del IGF-IR $\alpha$ , en esta imagen las células de Sertoli presentan los núcleos que las caracterizan. 20X, 40X; 18 E y 19 E), Control de la expresión de la proteína C-Raf en donde se aprecia una gran confluencia celular. 20X; 18 F y 19 F), Fotografía en donde se manifiesta la proteína C-Raf, observe la tinción marrón en el citoplasma de las células. 20X.

Resultados en células de Sertoli a los 18 d.g. donde se puede observar la expresión del IGF-I, IGF-IR $\alpha$  y C-Raf (Fig. 20).

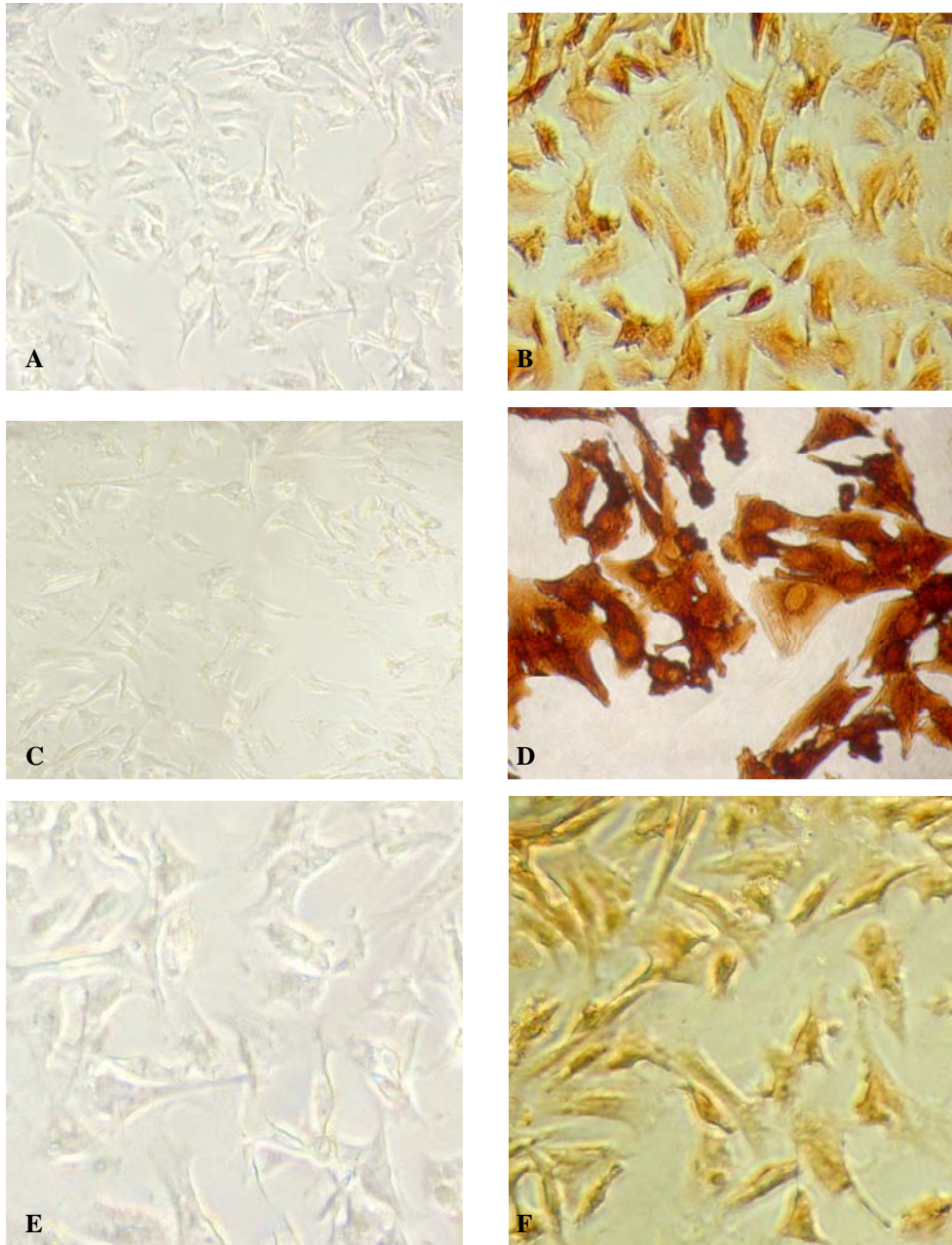


Fig. 19. Expresión del IGF-I (A, B), el Receptor  $\alpha$  (C, D) y C-Raf (E, F) en las células de Sertoli a los 18 d.g. Ver explicación en Fig.18 Pág. 34.

## **VII. Discusión**

La presencia o ausencia del gen *Sry* determina el sexo gonadal (3-4), a edades tempranas del desarrollo las gónadas de un individuo XX o XY son idénticas morfológicamente. Sin embargo, entre los 10.5 y 12.5 d.g. el *Sry* inicia la transformación de la gónada indiferenciada a un testículo. Además de éste, recientemente se publicó que los factores de crecimiento como el IGF-I participan en la inducción del desarrollo testicular en la ratón (26). En la presente investigación se determinó la expresión proteica del Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I, su receptor  $\alpha$  del IGF-I y la proteína C-Raf en cultivos primarios de células de Leydig y Sertoli provenientes del testículo del ratón *Mus musculus* de 16 y 18 días de gestación.

Nuestros resultados apoyan estudios previos realizados por Villalpando y López Olmos en 2003, en los cuales demostraron que el RNAm del IGF-I se expresa muy temprano durante el desarrollo gonadal masculino entre los 10.5 y 17 d.g. desde la etapa de cresta urogenital, hasta etapas previas al nacimiento. Así mismo, estudios realizados por Rouiller-Fabre (1998) en células de Leydig de la rata Wistar de 16.5 y 20.5 d.g., se encontró que la producción de IGF-I es de 18.7 y 78.8 pg/testículo, respectivamente. En nuestro laboratorio se encontró que el ratón produce el IGF-I a una concentración de 11 a 17 pg/testículo durante el desarrollo testicular (48).

En esta investigación se hicieron cultivos heterogéneos disgregados de testículos embrionarios de 16 y 18 d.g., los experimentos revelaron la expresión de las proteínas evaluadas, así que se decidió hacer cultivos individuales de células de Leydig y de Sertoli, de las etapa fetal y perinatal (16 y 18 d.g.) las inmunocitoquímicas practicadas a estos cultivos muestran la expresión del IGF-I y su receptor alfa, esto nos sugiere que estos factores podría estar regulando la proliferación de las células. Hernández-Zimbrón demostró que el IGF-I regula la proliferación de las células de Sertoli a los 16 y 18 d.g (49). Los datos obtenidos no apoyan los resultados obtenidos por el grupo de Rouiller-Fabre, quienes observaron que en la etapa fetal de la rata (18 d.g.) 50 ng del IGF-I no inducen la proliferación de las células somáticas del testículo. Sin embargo, otros estudios hechos en ratón, muestran que esta proteína si tiene efecto en la proliferación de las células testiculares (22,48,50).

La presencia del IGF-I y el receptor  $\alpha$  tanto en las células de Leydig como Sertoli demuestran que estas células tienen una regulación autocrina, al menos en cultivos individuales, pues solo se evaluó los factores producidos localmente, aunque no se descarta la posibilidad de que sea de manera parácrina, faltaría evaluar está por medio de un cocultivo.

En el caso del testículo de humano neoplásico al ser comparado con testículos normales, se encontró que el IGF-IR también desempeña un papel importante en la proliferación de la células tumorales (52), mientras que el IGF-I está relacionado en la espermatogénesis normal del testículo humano (53). De acuerdo con nuestros resultados es posible que ambas proteínas sean mediadoras de la regulación de la esteroidogénesis del testículo en etapa fetal (26).

En experimentos realizados en ratones Knock-out para el IGF-I, se demostró la importancia de este factor en la función testicular, pues en machos adultos disminuye producción de testosterona, hay un menor número de espermatozoides y el testículo es de menor tamaño, comparado con los animales normales (54). Trabajos previos en el grupo de la Dra. Villalpando demostraron la importancia del IGF-I en el testículo fetal, ya que el IGF-I *in vitro* en células de Leydig aumenta 30% la producción de testosterona y  $17\alpha$  hidroxiprogesterona (26). Con base en esta información podemos suponer la importancia que tiene el IGF-I y su receptor al mediar gran parte de las funciones de los órganos reproductores. Sin embargo, la mayoría solo consideran etapas después del nacimiento nuestro reporte es de gran importancia ya que se evaluó etapas en donde existe mayor proliferación.

Por otro lado, un estudio reciente de Colon y col. (2007) demostró al evaluar la vía PI3K/Akt, que las células de Leydig aisladas del testículo de rata son protegidas por el IGF-I al impedir se de la apoptosis. En sus resultados muestran también que en ratones nulos para la expresión del IGF-I tenían un patrón anormal en la proliferación y diferenciación de las células de Leydig al igual que una disminución en la producción del andrógeno en respuesta a la LH. Es posible que la presencia de este factor en nuestros cultivos proteja a las células de Leydig y Sertoli de apoptosis en las etapas que evaluamos, pues en este momento se da la mayor proliferación para aumentar el tamaño



del testículo. Para corroborar esta idea habría que medir apoptosis en cultivos con y sin IGF-I.

Los experimentos de inmunocitoquímica de las células de Leydig y Sertoli a los 16 y 18 d.g., demostraron la presencia de la proteína C-Raf, se sabe que esta proteína participa en la vía de las MAP cinasas en donde se activan diversos factores de transcripción los cuales regulan la esteroidogénesis y procesos de proliferación. Esta observación es corroborada por una publicación reciente de Pulak (2006), su grupo de trabajo evaluó el potencial esteroidogénico y proliferativo del IGF-I, en cultivos primarios de células de Leydig de ratón 2-3 meses de edad, este factor aumento la fosforilación del ERK  $\frac{1}{2}$  también lo inhibieron con UO126 (51).

En trabajos realizados por Matsuyama y col. 2005, se encontró que una isoforma de la Vinexina  $\gamma$  proveniente de gónadas fetales de ratón ayudan a la expresión del gen *Sox9*, esto se examinó en el fenotipo de ratones con genes interrumpidos para esta proteína, además del análisis *in vitro*. Los resultados fueron que la isoforma está implicada en la regulación de la transcripción del gen *Sox9*, pues aumenta los niveles de RNAm, en la gónada masculina del ratón y modula la cascada de MAP cinasas, participando como una proteína de andamio. Morris y Davis en el 2003, demostraron que son necesarias estas proteínas de andamio pues aseguran la eficacia y fidelidad de la transducción de señales. La Vinexina  $\gamma$  refuerza la transducción de las MAP cinasas en el nivel de C-Raf esta aseveración fue afirmada por un estudio con un inhibidor MEK UO126 específico para el macho. En experimentos preliminares con el mismo inhibidor (MEK UO126) obtuvimos que el IGF-I sigue la misma vía de las MAP cinasas (estos datos están por publicarse).

Resumiendo, observamos que usando cultivos celulares primarios de Leydig y Sertoli aisladas de embriones de ratones de diversas edades, el IGF-I está presente en el testículo fetal y posnatal; la presencia del receptor desempeñaría un papel al ser activado y se iniciaría la vía de transducción de las MAP cinasas.

Estas proteínas activarían al Factor Activado por Ras (C-Raf), que también se expresó en las células de Leydig y Sertoli. De tal forma que estas proteínas en conjunto regulan de manera autocrina la función testicular en el ratón.

**VII. Conclusiones**

1. La expresión del IGF-I se detectó en las células de Leydig y Sertoli en la etapa fetal a los 16 y 18 d.g.
2. El IGF-IR $\alpha$  se expresa en las células de Leydig y Sertoli en las etapas mencionadas.
3. La presencia de la proteína C-Raf en las células de Leydig y Sertoli indica que ambos tipos celulares siguen la misma vía de señalización.
4. La presencia del IGF-I, IGF-IR $\alpha$  en las células de Leydig y Sertoli plantean que estos regulan de manera autocrina la función testicular en la etapa fetal y perinatal del ratón *Mus musculus*.
5. Los datos presentes apoyan la hipótesis planteada.

**IX Bibliografía**

1. Kofman S, Merchant-Larios H, Pérez G. **1982**. Diferenciación sexual. Bases biológicas del dimorfismo sexual. Invest Clín 34:349-359.
2. Rey R. **2001**. Diferenciación sexual embrio-fetal: de las moléculas a la anatomía. Rev Chil Anat 19:75-82.
3. Sinclair AH. **1998**. Human sex determination. J Exp Zool. 281(5): 501–505.
4. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge, R. **1991**. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. Nature 351:117–121.
5. Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R. **1990**. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. Nature 348: 450-452.
6. Merchant-Larios H. **1993**. El sexo gonadal. En: Memorias del Congreso Conmemorativo del Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Tomo I. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Pág. 451-461.
7. Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N. **2001**. Inicio de la diferenciación sexual: diálogo entre genes y células. Arch Med Res 32:553-558.
8. Langman. **2004**. Embriología Médica con orientación clínica. Editorial Panamericana. 9ª Edición. Pág. 359-365.
9. Godin I, Wylie CC. **1991**. TGF beta 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. Development 113:1451-1457.
10. Merchant-Larios H. **1979**. Origin of the somatic cells in the rat gonad: An autoradiographic approach. Ann Anim Bioch Biophys 19:1219-1229.
11. Jimenez-Jimenez LF, Merchant-Larios H. **2003**. Biología celular y molecular. Prentice Hall. México. Pág. 595-616.
12. Carlson BM. **2000**. Embriología Humana y Biología del Desarrollo. Editorial Hartcourt S.A. Pág. 376-391.
13. Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R. **1990**. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. Nature 348: 450-452.

14. Koopman P, Bullejos M. **2001**. Spatially dynamic expression of Sry in Mouse genital ridges. *Dev Dyn* 221:201-205.
15. Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M. **1990**. Genetic evidence equating SRY and the testis determining factor. *Nature* 348:448-50.
16. Tilman C, Capel B. **2002**. Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. In: *The Endocrine society. Recent Progr. Horm Res* 51:1-18.
17. Bell GI, Stempien MM, fong MN, Rall BL. **1986**. Sequences of liver cDNA encoding two different mouse insulin-like growth factor I precursors. *Nucl Acid Res* 14:7873-7882.
18. Rutanen EM, Pokenen F. **1990**. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Acta Endocrinol* 123:7-13.
19. Clemmons D, Maile L. **2003**. Minireview: Integral membrane proteins that function coordinately with insulin-like growth factor I receptor to regulate intracellular signaling. *Endocr* 144:1664-1670.
20. Rinderknecht E, Humbel RE. **1978**. The amino acid sequence of insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 235:2769-2776.
21. Bernier M, Chatelain P, Mather JP, Saez JM. **1986**. Regulation of gonadotropin receptors, gonadotropin responsiveness and cell multiplication by somatomedin-C and insulin in cultured pig Leydig cells. *J Cell Physiol* 129:257-263.
22. D'ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE. **1984**. Tissue concentrations of somatomedin-C: Further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci. USA* 81:935-939.
23. Tres LL, Smith EP, Van Wyk JJ, Kierszen Baum AL. **1986**. Immunoreactive sites and accumulation of somatomedin-C in rat Sertoli-spermatogenic cell cultures. *Exp Cell Res* 162:33-50.
24. Van Wyk JJ. **1984**. The somatomedins: Biological actions and physiologic control mechanisms. In *Hormonal Proteins and peptides*. C H Li Ed (Academic Press, New York) Pág. 81-125.



25. Rutanen EM, Pokenen F. **1990**. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Acta Endocrinol* 123:7-13.
26. Villalpando Fierro I, López-Olmos V. **2003**. Insulin-like growth factor I (IGF-I) regulates endocrine activity of the embryonic testis in the mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86:151-158.
27. Rouiller-Fabre V, Lecerf L, Gautier C, Saenz J, Habert R. **1998**. Expression and effect of insulin-like growth factor I on rat fetal Leydig cell function and differentiation. *Endocr* 139:2926-2934.
28. Villalpando Fierro I, Villafan-Monroy H, Pacheco P. **1996**. Delayed expression of the insulin-like growth factor I (IGF-I) gene in the XY sex reversed female mouse ovary. *Int J Dev Biol* 40:477-482.
29. Adams TE, Epa VC, Garrett TPJ, Ward CW. **2000**. Structure and function of the type I insulin like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci* 51:1050-193.
30. Ullrich A, Gray A, Tama W, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C. **1986**. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggest structural determinants that define functional specificity. *Emb J* 5:2503-2512.
31. Giorgetti S, Ballotti R, Kowalski-Chauvel A, Tartare S, Van Obberghent E. **1993**. The insulin and insulin-like growth factor-I receptor substrate IRS-1 associates with and activates phosphatidylinositol 3-kinase *in vitro*. *J Biol Chem* 268:7358-7364.
32. Khan SA, Ndjountche L, Pratchard L, Spicer LJ, Davis JS. **2002**. Follicle-Stimulating hormone amplifies insulin-like growth factor I-mediated activation of AKT/protein kinase B signaling in immature rat Sertoli cell. *Endocr* 143:2259-2267.
33. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. **1993**. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75:73-82.
34. Le Roith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT. **1995**. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr. Rev* 16:143-163.

35. Galvin CD, Hardiman O, Nolan CM. **2003**. IGF-I receptor mediates differentiation of primary cultures of mouse skeletal myoblasts. *Mol Cell End* 200:19-29.
36. Vanneli BG, Barni T, Orlando C, Natali A, Serio M, Balboni G. **1998**. Insulin-like growth factor (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis: an immunohistochemical study. *Fertil Steril* 49:666-669.
37. Clemmons DR, Maile LA. **2003**. Minireview: Integral membrane proteins that function coordinately with insuli-like growth factor I receptor to regulate intracellular signaling. *Endocr* 144:1664-1670.
38. Czech MP. **1989**. Signal transmittion by the insulin-like growth factors. *Cell* 59: 235-238.
39. Warner H, Woloschak M. **1995**. The insulin-like growth factor I receptor: molecular biology, heterogeneity and regulation. In: insulin-like growth factor: molecular and cellular aspects. Le Roith (Ed). CRC Prees Boca Raton Pág. 17-47.
40. Villalpando F I. **2001**. Péptidos en la biología de la reproducción de los mamíferos. En: biología de la reproducción II de Javier Velásquez Moctezuma. UNAM. Pág. 121-143.
41. Lewin B. **2000**. Genes VII. Oxford University Press. Pág. 801-827.
42. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter JD. **2002**. Molecular Biology of the Cell. Ed. Garland Science. 4<sup>a</sup> ed. New York. Pág. 868-892.
43. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Zipursky SL, Darnell J. **2004**. Mollecular Cell Biology. 5<sup>a</sup> ed. New York. Pág. 571-610.
44. Moelling K, Heimann B, Beimling P, Rapp UR, Sander T. **1984**. Serine and threonine- specific protein kinase activities of purified gag-mil an gag-raf proteins. *Nature* 312: 558-561.
45. Rapp UR, Goldsborough MD, Mark GE, Bonner TI, Groffen J. **1983**. Structure and biological activity of v-raf, a Unique Oncogene Transduced by a Retrovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:4218-4222.
46. Morrison DK, Cutler RE. **1997**. The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9:174-179.

47. Chong H, Vikis HG, Guan KL. **2003**. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Sign* 15:463-469.
48. Guerra-Davalos G. **2005**. Papel del IGF-I de la IGFBP-I en la actividad endocrina del testículo embrionario. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM.
49. Hernandez-Zimbrón LF. **2007**. Efecto del factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-I) y del factor de crecimiento epidermal (EGF) en las células de sertoli embrionarias de ratón *Mus musculus*. Tesis de Licenciatura. Fac. Ciencias. UNAM.
50. Colón E, Farasat Z, Magnus A, Ollen L, Christine CS, Konstantin V, Ollen S. **2007**. Insulin-like growth factor-I is an important antiapoptotic factor for rat Leydig Cells during posnatal development. *Endocrinol* 148:128-139.
51. Pulak RM, Syam PC, Steven RK, Youngah J, Raymond C, Ilpo TH, Douglas MS. **2006**. Molecular mechanisms of insulin-like growth factor-I mediated regulation of the steroidogenic acute regulatory protein in mouse Leydig cells. *Endocrinol* 20:362-378.
52. Neuvians TP, Gashaw I, Hasenfus A, Hacherhacker A, Winterhager E, Grobholz R. **2005**. Differential expression of IGF components and insulin receptor isoforms in human seminoma versus normal testicular tissue. *Neoplasia* 7:446–456.
53. Zhou J, Bondy C. **1993**. Anatomy of the insulin-like growth factor system in the human testis. *Fertil Steril* 60:897–904.
54. Beker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellelve AR, Efstratiadis A. **1996**. Effects of an IGF-I null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* 10:903-910.
55. Matsuyama M, Mizusaki H, Shimono A, Mukai T, Okumura K, Abe K, Shimada K, Morohashi K. **2005**. A novel isoform of vinexin, vinexin  $\gamma$ , regulates *Sox9* gene expression through activation of MAPK cascade in mouse fetal gonad. *Genes to Cells* 10:421–434.
56. Morrison DK, Davis RJ. **2003**. Regulation of Map kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Ann Rev Cell Dev Biol* 19:91-118.

**X. Apéndice**

1) Solución de PBS (1:10)

Para 100 mL

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

2) Medio D'MEM suplementado

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

3) Glutaraldehido al 0.3% (Fijador)

Para 10 mL

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

4) Solución bloqueadora de albúmina al 5%

Para 10 mL

- 9870  $\mu$ L de PBS
- 0.5 g de Albúmina Sérica Bovina
- 100  $\mu$ L de Twen 20°

## ABREVIATURAS

IGF-I	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I
IGF-IR	Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I
C-Raf	Factor activado por <i>Ras</i> isoforma C
d.g.	Días de gestación
<i>Sry</i>	Gen determinante de la diferenciación testicular
5 $\alpha$ -DHT	5 alfa dihidrotestosterona
CGPs	Células germinales primordiales
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
HIM	Hormona inhibidora de los conductos de Müller
kD	Kilodaltones
kb	Kilobases
a.a.	Aminoácidos
IRS-I	Sustrato del receptor para la insulina I
SH2	Dominio de homología 2
Grb-2	Receptor de la proteína de unión 2
Ras	Del inglés rats sarcoma
PI3P	Fosfatidil inositol trifosfato
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
ATP	Adenosin trifosfato
MAPK ó MEK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ hidroxisteroide deshidrogenasa