



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

“EFECTO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A
INSULINA TIPO I (IGF – I) Y DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGF) EN LAS CÉLULAS DE
SERTOLI DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO
DEL RATÓN *Mus musculus*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

HERNÁNDEZ ZIMBRÓN LUIS FERNANDO

T U T O R

Dra. IRMA VILLALPANDO FIERRO

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e .

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

"Efecto del Factor de Crecimiento Similar a Insulina Tipo I (IGF - I) y del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) en las Células de Sertoli Durante el Desarrollo Embrionario del Ratón Mus musculus"

realizado por **Hernández Zimbrón Luis Fernando**, con número de cuenta **402077390** quien opta por titularse en la opción de **Tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dra.	María del Carmen Uribe Aranzábal	<i>Ma del Carmen Uribe</i>
Propietario	Dra.	Maricela Villagrán Santacruz	<i>Maricela Villagrán</i>
Tutor(a) Propietario	Dra.	Irma Villalpando Fierro	<i>Irma Villalpando</i>
Suplente	Dra.	Marcela Esperanza Aguilar Morales	<i>Marcela Esperanza</i>
Suplente	Biól.	Esmeralda Lira Romero	<i>Esmeralda Lira</i>

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Univeritaria, D. F., a 31 de mayo del 2007
COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

Zenon Cano
DR. ZENON CANO SANTANA



Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

Hoja de Datos del Jurado

1. **Datos del alumno**
Hernández
Zimbrón
Luis Fernando
54-21-52-22
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
No. de cuenta: 402077390
2. **Datos del tutor**
Dra.
Irma
Villalpando
Fierro
3. **Sinodal**
Dra.
María del Carmen
Uribe
Aranzabal
4. **Sinodal**
Dra. Maricela
Villagrán
Santacruz
5. **Sinodal**
Dra.
Marcela Esperanza
Aguilar
Morales
6. **Sinodal**
Biol.
Esmeralda
Lira
Romero
7. **Trabajo escrito**
“Efecto del Factor de Crecimiento Similar a Insulina Tipo I (IGF-I) y del Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) en las Células de Sertoli Durante el Desarrollo Embrionario del Ratón *Mus musculus*”

Agradezco a la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO y a la FACULTAD DE CIENCIAS por haberme dado la oportunidad de estudiar una licenciatura dentro de sus instalaciones.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas por brindarme las facilidades para la realización de esta tesis.

A la DGAPA por el apoyo económico otorgado durante la elaboración de este proyecto.

A la Dra. Irma Villalpando Fierro por las enseñanzas técnicas, metodológicas, de síntesis, autocrítica y sus valiosos conocimientos que me ha otorgado.

A la Técnica académica Esmeralda Lira Romero, por su apoyo técnico indispensable durante el desarrollo de las metodologías utilizadas para la realización de esta investigación (Inmunocitoquímica, Cultivo celular, Radioinmunoensayo, manejo de anticuerpos acoplados a fluoresceína).

Al jurado integrado por:

Dra. María del Carmen Uribe Aranzabal

Dra. Irma Villalpando Fierro

Dra. Maricela Villagrán Santacruz

Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales

Por sus valiosos comentarios, opiniones y críticas realizadas que sin duda enriquecieron y mejoraron esta investigación.

Agradecimientos

Agradezco a toda mi familia por haberme apoyado en todo momento, especialmente a mi Padre, a mi Madre, a mi Abue y a mis hermanas, GRACIAS por estar siempre conmigo y apoyarme en todos mis proyectos, en las buenas y en las malas siempre han estado conmigo, LOS AMO.

Any: Te agradezco muchísimo todo el apoyo que me has dado, siempre has estado conmigo y me has hecho muy feliz durante el tiempo que hemos estado juntos, fuiste la primera persona que conocí en la facultad y mira en donde estamos, gracias por todo y recuerda que te amo.

A todos mis buenos amigos de la vida, porque siempre hemos estado juntos en malos y sobre todo buenos momentos. Gracias a Erick, Pepe, Goyo y sus papas que también son mi familia, Miguel y Gabyli, Frodo, Ramiro, Pinky, Omar, Rayo, Adrián, Michelle, Pau y Mirna por esas pláticas, reuniones, fiestas, abrazos, su apoyo incondicional, y sobre todo porque de alguna manera han influenciado para bien mi vida, los quiero arto y gracias por todo, echenle ganas.

A toda la banda superchida y especial que conocí en la facultad que de alguna manera fueron importantes para mí durante el desarrollo de la carrera y pasamos uno que otro momento juntos, especialmente a: Pablo, Alberto, Tania, Quetzal, Dalia, Congo, Haku, Yojo, Lorena, Marichu, Alicia y Brenda.

A los integrantes del laboratorio de Embriología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por su apoyo, opiniones y críticas durante la realización de esta tesis; Abigail, Salomón, Alfredo, Cristian, Esme, Cristina, y también a la señora Esther.

A mis maestras y maestros que tuve y me ayudaron siempre durante mi paso en el Instituto de Geofísica; Faby, M. Rita, Lala y al Dr. Jorge Gamma, Dr. Fernando Aceves, Dra. Elizabeth Solleiro, los recuerdo con gran cariño.

Nuevamente agradezco a la Dra. Irma Villapando Fierro, por su apoyo para la realización de nuevos proyectos, su constante apoyo, impulso y paciencia conmigo que me brindó durante la realización de esta tesis, he aprendido muchas cosas de usted por las cuales le estoy muy agradecido.

*Universidad Universidad
Por mi raza el espíritu hablará
Por mi raza el espíritu hablará*

*En el lema que adoptamos
Para nuestro laborar
El afán así expresamos:
Estudiar para enseñar*

*Somos los educadores
Nos anima el ideal
De encender los resplandores
Del camino sin fanal*

*Ser para los demás
Lo suyo a todos dar
Sabiendo para prever
Previniendo para obrar*

*En nosotros reside el anhelo
De alcanzar la verdad y el saber
Nuestras alas presienten el vuelo
De la ciencia, el amor y el deber*

*Que nos guíe la voz del maestro
A alcanzar el sublime ideal
Y un mañana de luz será nuestro
De la patria diadema triunfal*

*Universidad Universidad
Por mi raza el espíritu hablará
Por mi raza el espíritu hablará*

Himno Oficial de la Universidad, escrito por Romeo Manrique de Lara

Orgullosamente UNAM.

Índice

Resumen	1
I. Introducción	3
1. Desarrollo morfológico del testículo	3
a) Formación de la cresta genital	3
b) Etapa de gónada indiferenciada	6
c) Diferenciación sexual del testículo	9
2. Genes que regulan la diferenciación sexual masculina	12
a) El <i>Sry</i> , gen determinante del sexo masculino	13
b) Expresión gonadal del <i>Sry</i>	14
c) La proteína <i>Sry</i>	15
d) Genes autosomales	15
3. El Factor de Crecimiento Similar a Insulina Tipo I (IGF-I)	20
a) Organización molecular del y de la proteína del IGF-I	21
b) Expresión en diferentes tejidos	22
c) Participación en las gónadas	23
d) Organización del receptor para el IGF-I	25
e) Proteínas de unión del IGF-I (IGFBP's)	26
f) Vías de señalización	28
4. El Factor de Crecimiento Epidermal (EGF)	29
a) Aspectos estructurales de la proteína	29
b) Organización del gen del EGF	30
c) Expresión en tejidos y acciones del EGF	31
d) Receptor del EGF	32
e) Cascada de señales	33
5. Ciclo celular	34
a) Fases del ciclo celular	34
b) Función y tipo de ciclinas	36
c) Papel de las cinasas	37
6. Biosíntesis de esteroides gonadales	39
a) Origen de esteroides gonadales	40

II. Planteamiento del problema	41
III. Hipótesis	42
IV. Objetivos	43
V. Material y Métodos	44
VI. Resultados	49
VII. Discusión	66
VIII. Conclusiones	73
IX. Bibliografía	74

Resumen

La diferenciación testicular es un proceso organizado espacio – temporalmente que ocurre en la etapa embrionaria por la presencia del gen *SRY*, ubicado en el cromosoma “Y”. Estudios anteriores demostraron que la insulina y el factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-1) participan en la producción de hormonas sexuales, pero su papel en la proliferación en las células de Sertoli no se ha establecido en el ratón. Asimismo, se ha descrito que el factor de crecimiento epidermal (EGF) regula la proliferación de las células del testículo adulto aunque se desconoce su efecto en las células de Sertoli embrionarias del ratón. El objetivo de la presente tesis, fué evaluar el efecto del IGF -1, del EGF, y la combinación de ambos en las células de Sertoli de ratón *Mus musculus* a los 14, 16 y 18 d.g. En grupos de testículos de cada edad, se disgregaron con tripsina al 0.12 %, se sembraron 25, 000 células en cajas con suero bovino fetal (SBF) al 10 %, durante 24 horas, a 37 °C. Después se incubaron con SBF se estimularon con el IGF -1, el EGF y la combinación de estos a una concentración de 100 ng/ml durante 24 horas, a 37 °C. Las células de Sertoli se marcaron con Bromodeoxyuridina al 1 % (BrdU) y se reveló con un anticuerpo acoplado a fluorescencia para posteriormente realizar un conteo en un microscopio de fluorescencia.

Los resultados muestran que a los 14 d.g. el IGF-1 no tuvo efecto significativo en la proliferación de las células de Sertoli con respecto al grupo control, mientras que a los 16 y 18 d.g. actúa como un inductor de la proliferación de la célula de Sertoli durante el desarrollo testicular del ratón *Mus musculus*. Tampoco se observó efecto con el EGF a los 14 d.g. Este factor regula la proliferación de las células de Sertoli en las etapas fetal (16 d.g.), y prenatal (18 d.g.). El efecto sinérgico de estos factores de crecimiento sobre la células de Sertoli sólo se observó en la etapa fetal y perinatal y no en la etapa de crecimiento. La proliferación de las células de Sertoli en las etapas fetal y perinatal es regulada por el IGF-I, EGF y por ambos. Lo que provocaría el crecimiento de la población de las células de Sertoli en el testículo.

I. Introducción

1. Diferenciación sexual

La reproducción es fundamental para la perpetuación de las especies. Este proceso está concatenado en el tiempo y el espacio y se inicia con la diferenciación de las glándulas reproductoras (ovario y testículo), en la etapa embrionaria. La diferenciación sexual se ha dividido en dos grandes fases, la diferenciación sexual primaria y la diferenciación sexual secundaria. La primera, se refiere a la determinación del sexo cromosómico, el cual se lleva a cabo en el momento en que un ovocito (gameto femenino) que posee un cromosoma “X” es fertilizado por un espermatozoide (gameto masculino) producido en el testículo, el cual puede poseer un cromosoma “X” o un cromosoma “Y”. Si el ovocito es fecundado por un espermatozoide “X”, el cigoto se diferenciará como hembra, por el contrario, si el gameto femenino es fecundado por un espermatozoide con un cromosoma “Y”, el cigoto se diferenciará como macho (Gilbert, 2000). Mientras que la diferenciación sexual secundaria puede ser definida como la proliferación, migración y, diferenciación de las células precursoras de las células de Sertoli (Harley, et al., 2003). Además, esta diferenciación, está determinada por hormonas secretadas por las gónadas, ya sea de hembra o de macho, que van a determinar los caracteres sexuales secundarios. Es decir, están relacionados con la diferenciación de los genitales internos y externos, lo cual se asocia a la determinación del sexo fenotípico de un individuo (Gilbert, 2000).

1. Desarrollo morfológico del testículo

Durante la morfogénesis gonadal existen interacciones entre las dos líneas celulares que conforman a la gónada: las células germinales primordiales o CGP's (precursoras de los ovocitos y espermatozoides) de origen extraembrionario y las células somáticas, que son el resto de las células que conforman a la gónada (células mesenquimáticas, mioides, de Leydig y de Sertoli). Estos dos últimos tipos celulares difieren tanto en su aparición como en su lugar de origen (Ruíz, 1988).

En el transcurso del desarrollo gonadal se distinguen tres etapas: a) la formación de la cresta urogenital, b) el establecimiento de la gónada indiferenciada y c) la diferenciación sexual gonadal fenotípica. Las primeras dos fases las desarrollan, tanto machos como en hembras independientemente del sexo cromosómico que posea cada uno de ellos (Merchant, 1984).

a) Formación de la cresta urogenital

El desarrollo gonadal y la diferenciación sexual del testículo y ovario del ratón es un proceso que se inicia con el establecimiento de la región urogenital, ésta se inicia con la formación de la cresta genital que se localiza en la región ventral de la cavidad corporal, la cual alberga órganos del aparato digestivo y reproductor (Villalpando, 2001). La cresta genital está formada por la migración de las células germinales primordiales (CGPs), las cuales en ratón son observadas inicialmente a los 7.5 días de gestación en la región del alantoides y el endodermo del saco vitelino. Estas células migran por medio de un sustrato de fibronectina extendiendo filopodios (Merchant, 1984). También se han observado evidencias que muestran que las crestas genitales secretan una proteína perteneciente a la familia del Factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β) que es capaz de atraer a las CGP's (Godin y Wylie, 1991). Estas células migran entre las diferentes capas celulares hacia el intestino posterior (Villalpando,

2001) por un transporte pasivo del intestino posterior. Posteriormente pasan por el mesenterio dorsal, por medio de un transporte activo, mediante la emisión de filopodios y actividad proteolítica que rompe la membrana basal y finalmente llegan a la cresta genital entre los 9.5 – 10.5 d.g. (French – Constant, 1991). Los principales productos proteicos para la migración de las CGP's son: la interacción de moléculas de fibronectina y proteínas en la matriz extracelular, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, laminina, colágena tipo IV, sulfato condroitino y hialurona, que son expresados en la lámina basal (Skinner y Griswold, 2004).

Durante esta migración el número de CGP's se incrementa de 100 a 4000 aproximadamente (Godin *et al.*, 1990). Este primordio gonadal está inicialmente constituido por una capa de células del epitelio celómico, CGP's y células mesenquimáticas y endoteliales [(Villalpando, 2001 (a)]. Las células epiteliales y mesenquimáticas son las que participan directamente en la formación de la gónada indiferenciada como células precursoras. Las células mesonefricas y endoteliales son parte de tejido que ya está diferenciado (el mesonefros y sistema circulatorio respectivamente) que participan indirectamente en la morfogénesis de la gónada (Merchant-Larios, 1984). La etapa de cresta genital comprende de los 9.5 a los 10.5 días d. g. en ratones de tal forma que cada uno de los tipos celulares mencionados da origen a los cordones sexuales que caracterizan a la gónada indiferenciada, ocupan la parte central de ésta y permanecen unidos al epitelio celómico, tanto en hembras como en machos (Villalpando, 2001), como se observa en la figura 1.

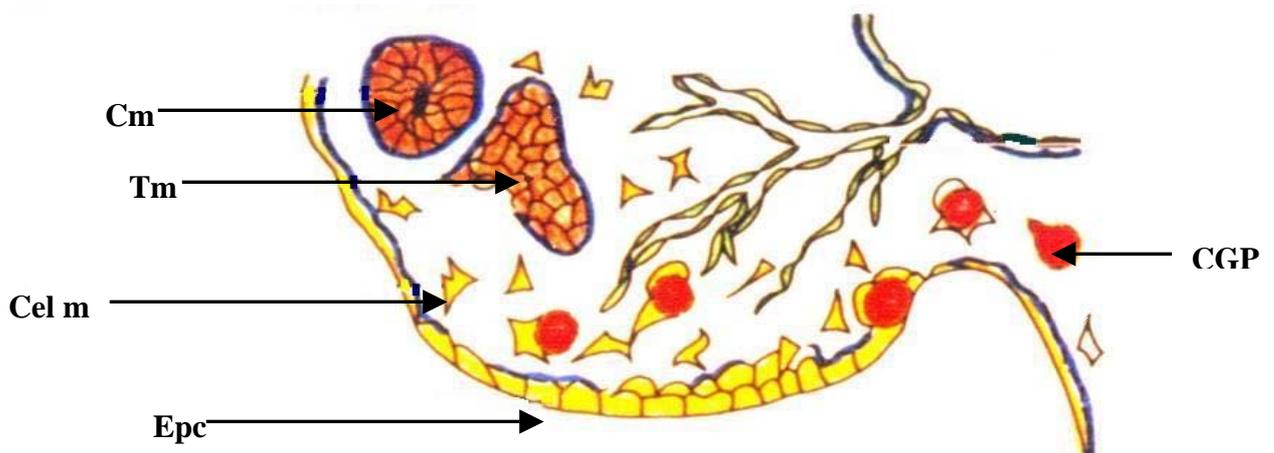


Fig. 1. Esquema de la cresta genital de un embrión de 9.5 d. g. Se indican los diferentes tipos celulares que participan en el desarrollo de la gónada indiferenciada. Estas células son: Células germinales primordiales (CGP), células del epitelio celómico (Epc), células mesenquimáticas (Cel m), conductos mesonéfricos (Cm) y los túbulos mesonéfricos (Tm) formados a partir de la condensación del mesenquima urogenital (Tomado de Merchant-Larios, 1984).

Además, en la fase de cresta genital participan genes autosomales que se expresan y regulan funciones de gran importancia para el correcto desarrollo del testículo durante esta fase (Tabla 1).

Tabla 1.- Genes expresados en la cresta genital

Genes	Función y ubicación
Lhx1 (Lim1)	Conducto mesonéfrico, en los riñones y la gónada a los 9 d. p. c.
Wt1	Células de Sertoli, participa en la proliferación y engrosamiento del epitelio celómico, activa el precursor de Sox 9. Sf1 y DAX-1 participan en la formación del Riñón a los 9.5 d. p. c.
Sf1	Epitelio celómico, células del mesénquima del mesonefros entre los túbulos seminíferos. Regula la expresión de genes del desarrollo gonadal y la esteroidogénesis.
Emx2	Cresta genital junto al conducto de wolff, tiene efectos en la proliferación del epitelio celómico. 9.5 d. p. c
Lhx9	Cresta genital Junto con Wt1 se une a promotor de Sf1 y tiene una efecto aditivo en la inducción de la expresión de SF1 9.5 d. p. c

b) Etapa de gónada indiferenciada

La gónada indiferenciada es un órgano bilateral localizada en la región ventral del mesonefros y está formada por tejido epitelial, mesenquimático y las CGP's. La etapa de gónada indiferenciada se observa en el ratón de la cepa CD1 a los 11 d. g. [Villalpando, 2001 (b)]. Durante esta etapa indiferenciada, el epitelio de la cresta genital prolifera extendiéndose profundamente dentro del tejido conectivo mesenquimático (Gilbert, 2005) formando una red de cordones sexuales internos (medulares), y en la región final más distal la delgada *rete testis* que comunica al testículo con el epidídimo. La diferenciación sexual testicular ocurre a los 12 d. g. [Villalpando, 2001 (b)]. A los 12 d. g., las diferencias sexuales específicas son evidentes, es en este momento cuando las gónadas masculinas toman un aspecto diferente, probablemente debido a las células precursoras de las células de Sertoli, originadas del epitelio celómico (Karl J, Capel B, 1998), que se alinearán dentro de los cordones testiculares, es decir, los primitivos túbulos seminíferos (Harley et al., 2003). Durante la etapa de gónada indiferenciada ocurre una proliferación de células somáticas precursoras, células foliculares y células intersticiales, las cuales originan los cordones sexuales y el tejido estromático que posteriormente darán lugar al ovario y al testículo (Merchant-Larios, 1984). En esta etapa las CGP's y las células somáticas de la cresta genital se encuentran fuertemente compactadas y adheridas a la superficie del epitelio formando un primordio gonadal. En general, esta etapa se caracteriza por tres eventos morfogenéticos: la condensación de las células somáticas a lo largo de las cresta genitales, la deposición gradual de los componentes de la lámina basal alrededor de las células epiteliales, así como, una actividad mitótica disminuida de las células epiteliales. Conforme llegan las CGP's las células somáticas proliferan formando, en conjunto, el blastema gonadal (Merchant-Larios, 1984). Estos movimientos morfogenéticos coordinados conllevan a la formación de los

cordones gonadales antes mencionados (Merchant-Larios1984). Al finalizar esta etapa se aprecia en la gónada indiferenciada un componente epitelial que contiene a la mayoría de las células germinales y un componente estromático a partir del cual se integrarán posteriormente los vasos sanguíneos, las células precursoras del tejido conectivo de las gónadas y las células intersticiales esteroideogénicas (Merchant-Larios, 1984), como se puede observar en la figura 2. En esta etapa, es necesario remarcar que también participan genes que regulan la expresión de ciertas proteínas (Ver Tabla 2).

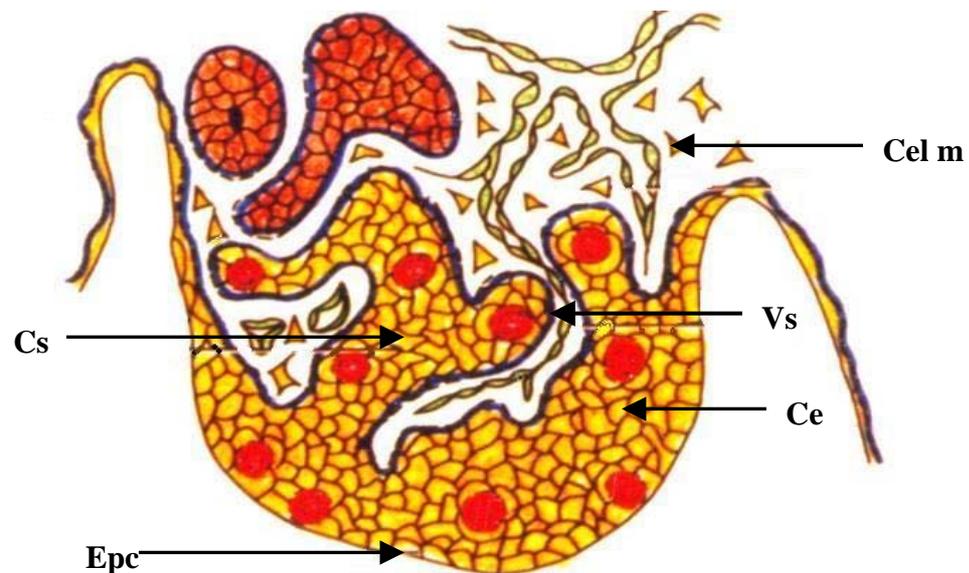


Fig.2 Establecimiento de la gónada indiferenciada. Formación de los cordones sexuales (Cs) que se continúan con el epitelio celómico, células epiteliales (Ce) limitadas por una lamina basal, células mesenquimatosas (Cel m) y vasos sanguíneos (Vs), epitelio celómico (Epc). (Modificada de Merchant-Larios, 1984).

A continuación se muestra una tabla con los genes expresados en la etapa de gónada indiferenciada, así como su regulación, sus principales productos y los resultados debido a las fallas en la expresión de estos genes.

Tabla 2.- Genes reguladores de la gónada indiferenciada

Genes expresados	Expresión
<i>Sry</i> (Factor determinante del testículo)	Regula y activa <i>Wt1</i> y activa la transcripción.
DAX 1	Expresión en células somáticas, después de la determinación sexual la expresión se restringe a las células de Leydig. Antagonista de <i>Sry</i> Regula y activa a <i>Sf1</i> produciendo desarrollo de glándula adrenal, gónada, hipotálamo, Pituitaria.
Dmrt1	Gen determinante del sexo altamente conservado Su malfuncionamiento deriva en Infertilidad por defectos en Producción de Células Germinales (CG) y desarrollo de testiculos 10.5 dpc, a 12.5 dpc es localizado en Sertoli y CG
Wnt4	Regula enzimas esteroideogénicas necesarias para producir Testosterona (T), 3B-HSD y 17 ^a -hidroxilasa. Antagonista con MIS,

c) Diferenciación sexual en testículo

La diferenciación sexual morfológica del testículo ocurre por la invasión de vasos sanguíneos y mesénquima que proviene de la región mesonéfrica que separa a los cordones sexuales. En el ratón la diferenciación sexual se inicia a los 12 d.g. Eventualmente los cordones sexuales, ahora llamados cordones testiculares, pierden contacto con la superficie del epitelio celómico. Además, se da una invasión de vasos sanguíneos y células mesenquimáticas, así como una relocalización de dichos cordones en la parte central del futuro testículo [Villalpando, 2001 (b)]. Posteriormente los cordones son separados de este epitelio por medio de una gruesa matriz extracelular, la llamada túnica albugínea (Gilbert, 2005). Este fenómeno es resultado del control de la expresión de genes que participan en la diferenciación sexual de este órgano (Villalpando, 2001 (b)). Cuando las CGP's entran a la gónada masculina, se desarrollan en cordones sexuales testiculares dentro del órgano. Se ha propuesto que existe un inhibidor de la meiosis sintetizado por las células del cordón y en consecuencia, las células germinales no inician la meiosis, sino hasta el periodo conocido como "Pubertad" (McLaren y Southee, 1997).

Cuando las CGP's localizadas dentro de los cordones sexuales son inhibidas para que efectúen la meiosis, estas células se empiezan a desarrollar como células germinales masculinas, y secretan prostaglandinas lo que causa que las células somáticas de los cordones testiculares se diferencien en células de Sertoli (Adams y McLaren 2002).

Este tipo celular se encuentra ubicado dentro de los cordones sexuales del feto, y además secretan la hormona inhibidora de los conductos de Müller (AMH, Anti-Müllerian Hormona) por sus siglas en inglés. En la pubertad, las células de Sertoli comienzan a proliferar y es cuando en su membrana plasmática se diferencian los complejos de unión

intersertolianos que forman la barrera hematotesticular (Villalpando, 2001). Esta barrera tiene una gran importancia para el funcionamiento del testículo, ya que servirá como soporte, también se encarga de nutrir las células reproductoras y funciona como filtro selectivo de moléculas que pasarán al túbulo seminífero. Los cordones se invaginan para formar los túbulos seminíferos y las CGP's migran a la periferia de estos túbulos en donde comenzará la espermatogénesis (Gilbert, 2003).

Posteriormente, en los túbulos seminíferos maduros, el espermatozoide es transportado del interior de los testículos a través de la *rete testis* la cual se une con los conductos eferentes. Estos túbulos eferentes son los remanentes de los riñones mesonéfricos, y unen a su vez, a los testículos con el conducto de Wolff, el cual es usado como tubo colector del riñón mesonéfrico. Después el conducto de Wolff se diferenciará para llegar a formar el epidídimo (adyacente a los testículos) y formará el conducto deferente que es el tubo por el que pasan los espermatozoides dentro de la uretra hacia el exterior del cuerpo. Durante el desarrollo fetal, las células intersticiales mesenquimatosas de las crestas (Gilbert, 2005) localizadas por fuera de los cordones sexuales se van a diferenciar en las células mioides, fibroblastos y células de Leydig (Villalpando, 2001). Estas últimas son las responsables de la formación de la hormona testosterona (Ver Fig.3)

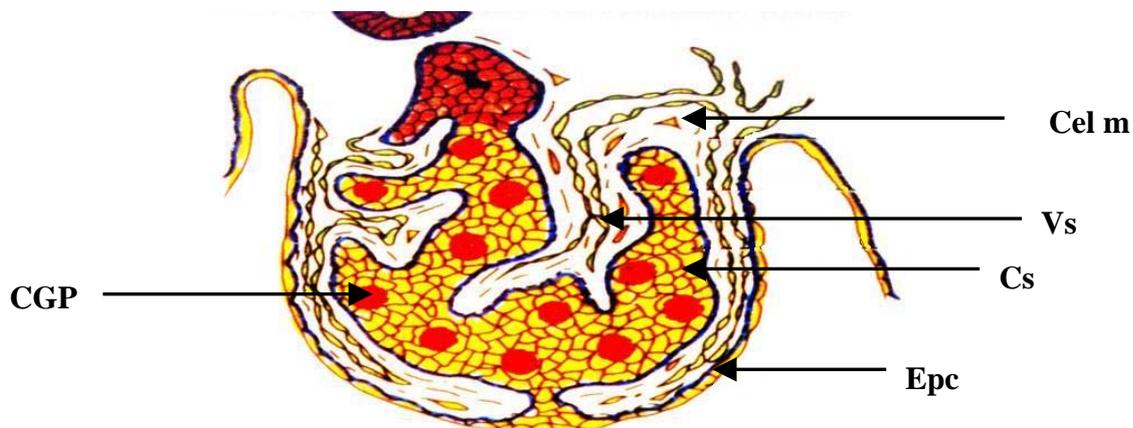


Fig. 3 Diferenciación sexual del testículo. En esta etapa hay una invasión activa del mesénquima (Cel m) y vasos sanguíneos (Vs) que separa a los cordones sexuales (Cs) del epitelio celómico (Epc), Célula germinal primordial (CGP) (Tomada de Merchant- Larios,1984).

Como ya se mencionó anteriormente, muchos genes son los que están involucrados en el proceso de desarrollo de la gónada indiferenciada que posteriormente dará origen a los sistemas adrenales, genitales y renales. A continuación se presenta un esquema (Fig. 4) que muestra la determinación sexual en los mamíferos.

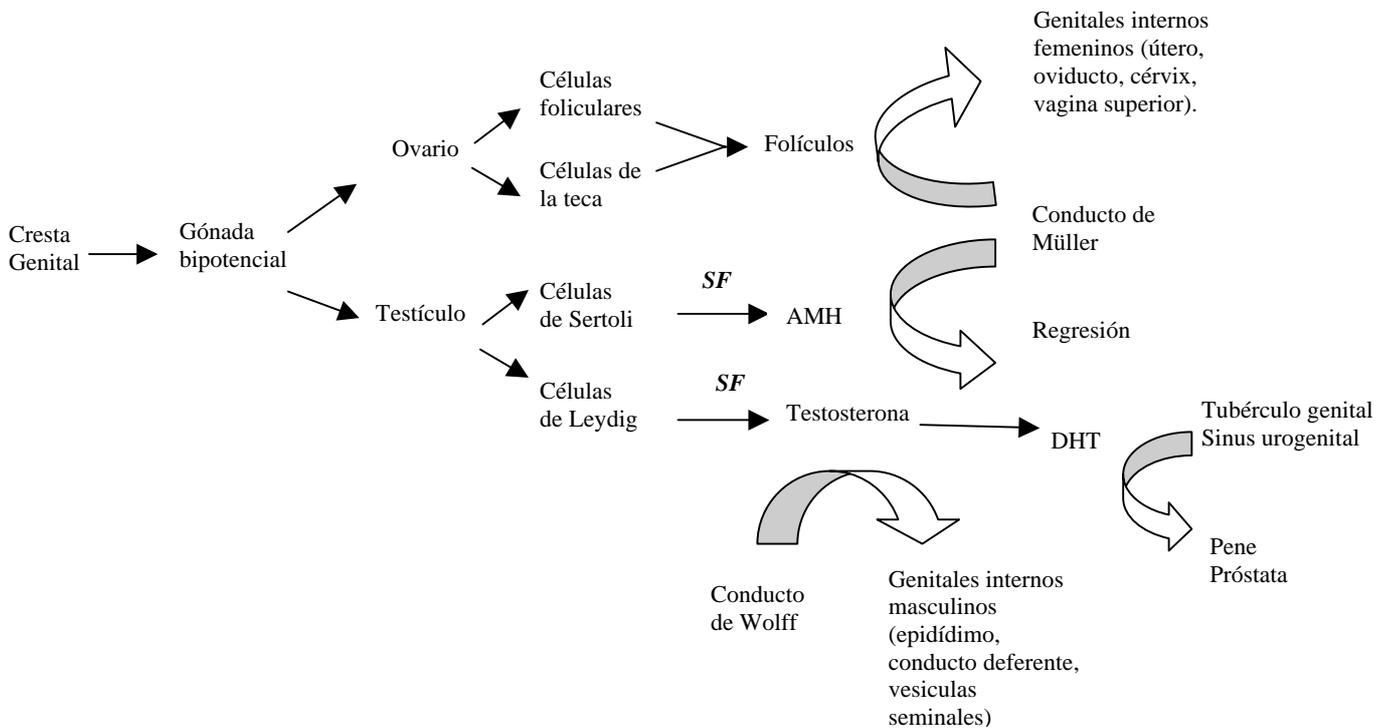


Fig. 4 Cascada de expresión de genes sexuales que lleva a la formación de los fenotipos sexuales en mamíferos (Modificada de Gilbert, 2000).

Si el cromosoma “Y” está ausente se forman ovarios, los cuales producirán hormonas estrogénicas principalmente 17-Beta-Estradiol y estrona capaces de desarrollar el conducto de Müller en el útero, oviductos y la porción cefálica de la vagina. Si el cromosoma “Y” está presente se formarán los testículos que secretarán tres hormonas de gran importancia. La primera de ellas es la MIS, sustancia inhibidora de los conductos de Müller (Müllerian Inhibiting substance) y, como su nombre indica, induce apoptosis en los conductos de Müller. La segunda hormona es la testosterona, la cual, masculiniza al feto estimulando la formación del resto del sistema reproductor como el pene y escroto. La tercera hormona es la 5- α -Dihidrotestosterona la cual se encarga de virilizar los genitales externos (Gilbert, 2005).

2. Genes que regulan la diferenciación sexual masculina.

El progreso del desarrollo de la gónada bipotencial hacia la diferenciación testicular está mediado por genes gonadales y autosomales (Fig. 5).

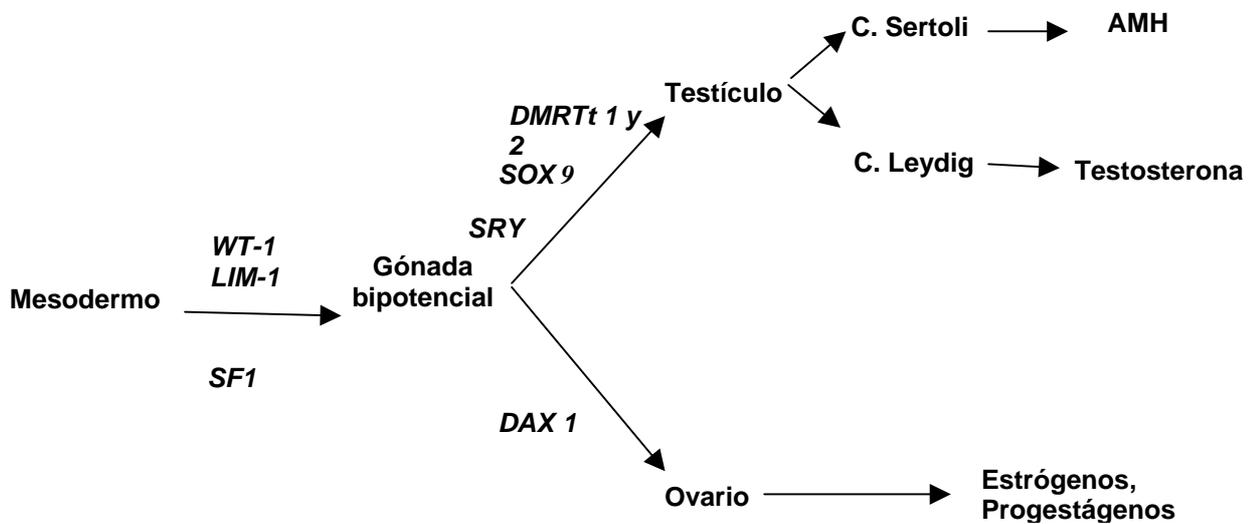


Fig. 5 Cascada de señalización genética involucrada en el proceso de diferenciación celular de la gónada bipotencial en mamíferos (Tomada de Hiort, 2000).

a) El *Sry*, gen determinante del sexo masculino

La presencia del cromosoma “Y” da por resultado el desarrollo de un macho. Este cromosoma contiene una variedad de genes que codifican factores de transcripción determinantes para la formación del testículo en fase embrionaria y postnatal. Uno de los genes más importantes, por ser el factor determinante de la diferenciación gonadal masculina, es el gen denominado *SRY* en humanos y *Sry* en ratón. Este pertenece a la superfamilia de proteínas caracterizadas por tener un motivo de unión de DNA conocido como HMG (High mobility group) que comprende aproximadamente 70 aminoácidos (Rimini, et al., 1995), (Ver Fig. 6). Esta región es crítica para la determinación testicular, se encuentra clasificado dentro de un grupo de factores de transcripción denominados proteínas *SOX* que poseen una homología de más del 60 % con el *Sry* (Whitfield et al, 1993). Estudios de homología demostraron que el gen *Sox 3*, que se localiza en el cromosoma “X”, es evolutivamente más cercano al *Sry* (Lim et al., 1998). Este gen se encuentra localizado en una región denominada pseudoautosomal de 35,000 pares de bases en el brazo corto del cromosoma “Y”. Se denomina región determinante del sexo del cromosoma “Y” (*SRY*). Es un exón sencillo del gen que codifica una proteína con un motivo de unión de DNA que actúa como un factor de transcripción y el cual, además, regula la expresión de otros genes (Capel B, 1998).

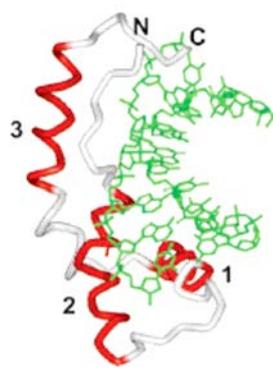


Fig.6 Modelo de la estructura de la caja SRYHMG unida al DNA. La resonancia magnética nuclear del dominio HMG del SRY muestra las tres hélices X, la conformación L y la unión en menor grado al ADN causando la unión (Tomada de Harley, et al., 2003)

b) Expresión gonadal del *Sry*

Estudios realizados en el ratón (Koopman, 1990) demostraron que el *Sry* es expresado en las células somáticas justo antes de la diferenciación de la gónada bipotencial (gónada indiferenciada) y durante un breve periodo para iniciar la diferenciación de las células de Sertoli. La distribución de la expresión del *Sry* en el ratón es enteramente consistente con su papel en la determinación sexual. Este gen es detectado en un principio a los 10.5 d. g., posteriormente en la fase de cresta genital, a los 11.5 d. g., y alrededor del día 12.5 se detecta un máximo pico de expresión y, posteriormente, solamente en bajos niveles (Koopman, 1990). La expresión del *Sry* se correlaciona con la proliferación de las células precursoras bipotenciales, algunas de las cuales son las precursoras de las células de Sertoli en la gónada XY (Schmahl, 2000). Este gen induce la migración de las células dentro de la gónada XY desde el mesonefros que se encuentra adyacente (Karl, 1995). La expresión progresiva del *Sry*, se inicia desde la parte anterior hacia el final posterior del testículo alrededor del día 11, con alguna célula expresando el gen *Sry* por unas pocas horas (Swain, 1998). La transitoria expresión del *Sry* en el ratón, sugiere que mientras el *Sry* es responsable de determinar el destino de las células de Sertoli, el *Sry* no está implicado en el mantenimiento del fenotipo de las

células de Sertoli (Swain, 1999). Las células de Sertoli, actúan como organizadores, causando que las células circundantes se diferencien en células de Leydig, o en células mioideas (Harley et al., 2003). Adicionalmente, las células de Sertoli inducen un arresto mitótico en las células germinales, confiriéndoles un destino espermatogénico sobre las células germinales (Harley et al, 2003).

Existe evidencia sugiere que el *SRY* se une al promotor del gen *AMH* y también controla la expresión de enzimas esteroidogénicas (Haqq et al, 1994). De esta manera, el *SRY* induce la expresión de *AMH* que evita la formación de los conductos de Müller y, por lo tanto, la formación de órganos reproductores femeninos (Hiort, 2000).

c) La proteína *SRY*

La secuencia abierta de lectura del *SRY* está contenida dentro de un solo exón y codifica una proteína de 204 aminoácidos (Harley, 2003). La proteína está dividida en tres regiones (Ver fig. 6).

El aminoácido central 79 codifica el dominio HMG, el cual funciona como un DNA de unión y como dominio de unión de DNA y también contiene dos señales de localización nuclear. En el dominio terminal-N la fosforilación de una secuencia dentro de este dominio potencia la actividad de unión al ADN. La proteína *Sry* del ratón contiene una región rica en glutamina que está ausente en otras especies de mamíferos y algunas subespecies de ratón (Harley, 2003).

d) Genes autosomales

El gen *SRY* y su correcta expresión necesita de la interacción con otros genes denominados autosomales para inducir la correcta diferenciación testicular completa (Fig. 7). A continuación se muestran los genes autosomales de mayor relevancia para la correcta formación del testículo.

Genes autosomales que también participan en el proceso de determinación sexual

AMH

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

Sfi

Otra proteína que puede ser activada directa o indirectamente por *Sry* es el factor de transcripción *Sfi* (factor esteroidogénico 1; *steroidogenic factor 1*) es un componente importante en el desarrollo gonadal y de la glándula adrenal además de regular la biosíntesis de esteroides masculinos (Koopman, 1999). *Sfi* es necesario para generar la gónada bipotencial pero mientras que los niveles de *Sfi* disminuyen en la cresta genital de los embriones de ratón XX, el gen *Sfi* permanece en el testículo en desarrollo. *Sfi* parece ser activo en la producción de andrógenos y testosterona en las células de Leydig y de las células de Sertoli. En estas últimas *Sfi* funciona en colaboración con *Sox9* y es necesario para elevar los niveles de transcripción de *Amh*. (Shen, 1994) En las células de Leydig, activa a los genes que codifican las enzimas que producen testosterona (Gilbert, 2005). La transcripción de *Sfi* está presente en la gónada de ambos sexos en ratones entre 9 y 12 d. g. *Sfi* juega tres importantes papeles en el desarrollo sexual, primero en el establecimiento temprano de la gónada previo a la expresión de *Sry*, más tarde en la diferenciación masculina regula a *Amh* y también regula de la síntesis de esteroides en las células de Leydig (Koopman, 1999).

WT1

El gen *WT1* inicialmente fue aislado analizando a pacientes con tumor de Wilms, un tumor de riñón embrionario producido por una proliferación anormal del blastema metanéfrico en el humano. La primera indicación del papel esencial de *Wt1* en el desarrollo urogenital del ratón, se obtuvo con el análisis de su expresión, el cuál mostró ser específico en el desarrollo de riñones y gónada. Se ha mostrado que mutaciones en diferentes puntos del gen *Wt1* produce leves anormalidades en el sistema genital, incluyendo hipospadias y criptorquidismos (Parker, 1999). *Wt1* juega un papel más importante en la maduración de la cresta genital, que en la determinación sexual *per se*, quizá por establecer un medio ambiente en el cual *Sry* pueda actuar sobre las células para destinarlas masculinas. Se ha sugerido que *Wt1* actúa como regulador de la expresión de *Sry* (Koopman, 1999).

LIM1

LIM1 es un gen que regula la producción de moléculas de organización en muchas especies estudiadas. En ratones con bloqueo en el sitio de unión del gen *Lim1* hubo una completa ausencia de estructuras de la cabeza y muerte temprana. Pero los fetos sobrevivientes mostraron falta de riñón y gónadas. Por esto se puede asumir que *LIM1*, así como *WT1* y *SF1*, están involucrados en la maduración de la cresta genital, pero su preciso papel en la inducción gonadal no ha sido analizado en detalle en parte por la letalidad de los embriones knockout para este gen (Koopman, 1999).

Aromatasa (P450)

La aromatasa es un miembro de la familia del citocromo P450 y es responsable de la conversión de testosterona a estradiol. En la determinación sexual masculina, el gen que codifica para la aromatasa este fuertemente reprimido durante el desarrollo testicular. Haqq et al (2001), han sugerido que *Sry* es directamente responsable de su represión (Koopman, 1999).

Sox9

Sry es solo uno de una familia de genes que se relacionan por la caja HMG. Estos son conocidos como genes *Sox* (Caja HMG-relacionada a *Sry*). Uno de estos genes especialmente relevante en la determinación sexual es el *Sox9*. Es uno de los pocos genes aparte de *Sry* en los cuales la mutación en este ha mostrado interferir en la determinación sexual masculina (Koopman, 1999). *Sox9* es un gen autosómico que también puede inducir la formación testicular. Parece ser que *Sox9* puede remplazar a *Sry* en la formación testicular. Mientras que *Sry* es hallado específicamente en mamíferos, *Sox9* se encuentra en todos los vertebrados. Por lo tanto, *Sry* puede actuar simplemente como un “interruptor” para activar a *Sox9* y la proteína *Sox9* iniciar la vía conservada para la formación testicular (Pask, 1999). En ratones la expresión de *Sox9* está regulada en gónadas XY inmediatamente después del inicio de la expresión de *Sry*. La inactivación de *Sox9* en embriones XY conducidos presentan una reversión sexual femenina. Además la expresión exógena de *Sox9* en gónadas XX puede inducir la formación testicular en ausencia de *Sry* (Yao and Capel, 2005). La proteína *Sox9* puede actuar como un factor de empalme y como un regulador transcripcional. *Sox9* migra hacia el núcleo en el momento de la determinación sexual. Aquí se une a un sitio promotor sobre el gen para el factor inhibidor de Müller proporcionando un enlace crítico para un fenotipo masculino (Arango, 1999; De Santa Barbara, 2000).

A continuación se muestra una tabla con los genes también expresados durante la etapa de gónada indiferenciada, así como su regulación, sus principales productos y los resultados debido a las fallas en estos genes en ratón.

Tabla 3.- Genes reguladores de la diferenciación sexual

Genes	Expresión
Sox9	Células de Sertoli, iniciación de desarrollo del testículo a los 10.5 d. p. c. Junto con Sf1 regula MIS
Sox8	Expresión sobrelapada con SOX9 Regula el gen MIS
GATA-1,4 y 6	Expresión en diferenciación gonadal Alta expresión en Sertoli Activa promotor de MIS por medio de un elemento gata 11.5 d. p. c.
Fog-2	Reduce la expresión de Sry, no expresión de SOX9, MIS y Dhh— no diferenciación de Sertoli, no expresión de P450scc, 3B-HSD y P450c17—no diferenciación de Leydig, 11.5 dpc

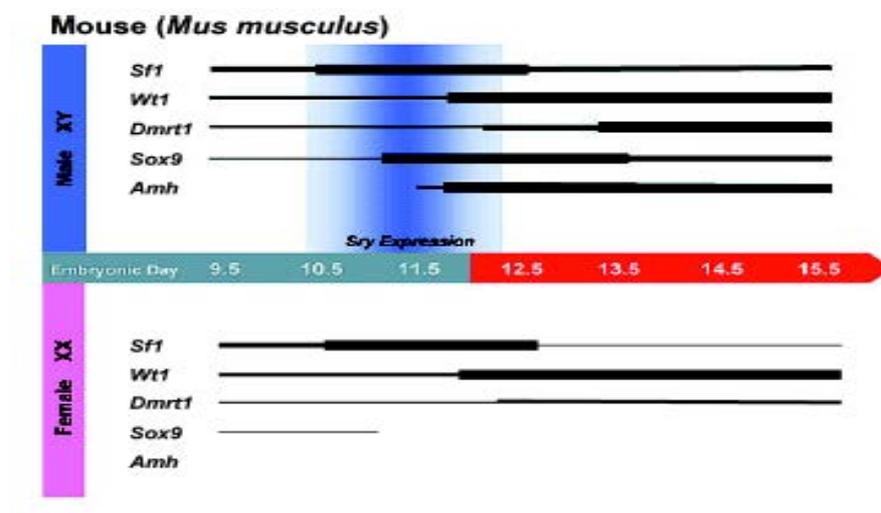


Fig. 7. Diagrama de los perfiles de expresión de los genes críticos para la determinación sexual durante la embriogénesis en ratón *Mus musculus* (Tomada de Yao and Capel, 2005).

3. El factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1)

El factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1) es una molécula mitogénica que participa en la diferenciación y en la proliferación celular (Froesch, 1985). Estos factores de crecimiento similares a la insulina fueron caracterizados bioquímicamente por Rinderknecht y Humble en 1979, a partir de plasma humano denominándolos IGF-I e IGF-II (Insulin-like growth factor I y II).

El IGF-1 es una molécula muy antigua, la cual se ha propuesto que tuvo un origen común junto con la insulina. Se ha planteado que esta molécula apareció aproximadamente hace 600 millones de años por una duplicación génica, a partir de la cual aparecieron las moléculas de proinsulina y una molécula primitiva del IGF. Posteriormente ocurrió una segunda duplicación aproximadamente hace 300 millones de años, precursora definitiva de las moléculas del IGF I y II [Villalpando, 2001(a)]. Estas moléculas son péptidos con capacidad mitogénica que tienen un bajo peso molecular. El IGF-I, es un polipéptido de 70 aminoácidos cuyo peso molecular es de 7650 daltons, forma parte de un grupo de factores de crecimiento parecidos a la insulina presentes en el cuerpo humano. Mientras que el IGF-II tiene un peso molecular de 7471 D. Ambos poseen una cadena sencilla con tres puentes disulfuro intracatenarios que se encuentran estructuralmente relacionados con la insulina (Sara y Hall, 1990). El IGF-I maduro contiene los dominios A, B, C, D, y E, los dos primeros son homólogos a las cadenas A y B de la insulina (Sara y Hall, 1990; Giudice, 1992). El hígado es la principal fuente de secreción en la edad adulta del IGF- 1 y durante la etapa fetal también se encuentran en órganos como riñón, hígado pulmón y en todo el sistema nervioso central, por lo que se consideran factores de secreción endócrina, parácrina y autócrina. La molécula presenta aproximadamente un 50 % de similitud en la secuencia de aminoácidos con la proinsulina, y tiene un número de funciones

biológicas similares a las de la insulina. Aunque el péptido presenta una elevada dependencia de la hormona de crecimiento (GH), un número cada vez mayor de estudios informan de una secreción independiente de la GH. A este factor se le ha denominado como mitogénico debido a que actúa como inductor en la síntesis de lípidos y ácidos nucleicos, además de actuar como estimulador de la captación de glucosa y glucógeno, es decir, incrementa la capacidad mitótica de las células de Sertoli.

a) Organización molecular del gen y de la proteína del IGF-I

El IGF-I está conformado por seis exones, cinco intrones y dos promotores, los exones 1 y 2, codifican para regiones alternas 5' no traducidas 5' (UTR) y para los codones que inician la traducción, localizados junto al marco de lectura abierto ubicado en los exones 3 y 4 que contienen parte de la información para los péptidos señal divergentes. El exón 3 también codifica para una región de éste y una zona del dominio B del IGF-I maduro. El exón 4 codifica para el resto del dominio B, los dominios C, A y D y la región amino terminal del péptido E, el 5 para una parte del péptido E y el 6 para el extremo carboxilo terminal del mismo y la región 3' no traducida 3' (UTR) (Williams, 1984). Estudios de biología molecular (Carpenter, 1986) en los que se analizó el DNA complementario del IGF-1 en el ratón, demostraron la presencia de dos precursores del IGF-I denominados A y B, que difieren en el tamaño y la secuencia del extremo carbonilo terminal. En ambos, la secuencia del péptido señal, la región codificante para el IGF-I y los primeros 16 aminoácidos (aa) del extremo carboxilo terminal del dominio E son iguales. La diferencia en la forma B del precursor se debe a una inserción de 52 bases, que inducen un fragmento de 17 aa. en el extremo carboxilo terminal y provoca un desplazamiento en el marco de lectura del RNA originando otro RNA mensajero. La estructura del gen del IGF-1 de ratón parece muy compleja, ya que se observan variaciones en las regiones 5' (UTR) y en los sitios de poliadenilación que no están presentes

en otras especies estudiadas. En el humano, la localización del gen del IGF-I se encuentra en el extremo distal del autosoma 12 (Powell, 1987). En el ratón, el IGF-1 es similar a la insulina en estructura y función, induce la síntesis de lípidos y de ácidos nucleicos y estimula la proliferación y captación de glucosa y glucógeno. Este factor de crecimiento pesa 7.5 KD y está formado por una cadena de 70 residuos de aa, constituida por los dominios B, C, A, D, y E. Los dominios A y B son homólogos estructurales de las cadenas A y B de la insulina y el C es análogo del péptido conector C de la protoinsulina. El dominio D y E son exclusivos de éste factor, este último es cortado durante el procesamiento del precursor y se ha detectado en la circulación (Schalch D, 1984). Sin embargo, se desconoce su función. Existen datos de la presencia de varias especies de IGF-I en el cerebro de embriones de humano, útero de porcinos y calostro de ovinos (Daughaday, 1989).

b) Expresión en diferentes tejidos

Los efectos biológicos desencadenados por el IGF-I *in vitro* en diferentes tipos celulares pueden ser muy rápidos, debido al catabolismo de proteínas y carbohidratos, y a largo plazo, en el que se involucran aspectos de diferenciación celular. El IGF-I, es también producido por las células de Sertoli durante el desarrollo embrionario (Skinner y Griswold, 2004). Este factor se conoció inicialmente como somatomedina-C, debido a que media la acción de la hormona de crecimiento y además, participa en funciones de proliferación, diferenciación y motilidad celular entre otras. El IGF-I también induce la expresión del protooncogen c-fos, que se asocia a procesos de diferenciación celular (Ong, 1987). Asimismo, se sabe que es un factor de progresión del ciclo celular, induce la síntesis de la ciclina D1 en células derivadas de osteoblastos, inhibe la apoptosis en células hematopoyéticas y estimula la proliferación de otros tipos celulares como: condrocitos, músculo liso, fibroblastos, adipocitos,

espermatogonias, oligodendrocitos, células de Sertoli y Leydig (Sara y Hall, 1990). La acción del IGF-I sobre estas dos últimas estirpes celulares plantea la posibilidad de que éste participe como un factor parácrino en la maduración y diferenciación de las células precursoras de los gametos. Investigaciones recientes demuestran que este factor de crecimiento puede además, participar en el crecimiento de la masa cefálica y en otras funciones del cerebro. Este factor predomina en la etapa posnatal siendo regulado en la rata por la hormona del crecimiento y por esteroides sexuales. Sin embargo, el mecanismo no se ha esclarecido hasta el presente (D'Ercole, 1996). El IGF-I es capaz de estimular el crecimiento del cartílago, la síntesis de ARN, de ADN y de proteínas y de procesos anabólicos. Durante el embarazo, estimula la división celular y el crecimiento de los tejidos maternos, a la vez que potencia los procesos anabólicos que dan como resultado el incremento del tejido graso, de las reservas de glucógeno hepático, así como el desarrollo de las glándulas mamarias entre otras modificaciones (Clemmons, 1995). En esencia el IGF-I tiene efectos similares a los de la insulina sobre el músculo y la placenta al estimular el transporte de aminoácidos y glucosa, así como inhibir la lipólisis en el tejido adiposo (Clemmons, 1995).

c) Participación en las gónadas

La expresión del IGF-I se ha asociado en el control de la producción hormonal en las gónadas. En la etapa embrionaria, el IGF-I administrado *in vitro* promueve la síntesis de testosterona y la diferenciación de cordones parecidos a los testiculares, después de siete días de cultivo (Taketo, 1991). La expresión del IGF- I se ha detectado en diferentes tipos celulares durante el desarrollo postnatal del ovario y del testículo (D'Ercole, 1996). Durante el desarrollo embrionario, este factor es producido por las células de Sertoli, actuando como factor parácrino en las CGP's, que son el principal sitio de acción del IGF-I, además, la Proteína de unión al

IGF-I (IGF-IBP) influencia las acciones del IGF-I y contribuye a la interacción CGP's – Sertoli y también influencia la función de las células de Leydig (Skinner y Griswold, 2004).

En la rata, el RNA mensajero del IGF-I se localiza en las dos primeras semanas después del nacimiento en las células de Sertoli, Leydig, peritubulares y ocasionalmente en las espermatogonias. Durante el desarrollo embrionario influye en la síntesis de DNA e incrementa la producción de lactato y transferrina de las células de Sertoli (Skinner y Griswold, 2004). En el testículo del adulto en esta especie se expresan diferentes transcritos de 7.5, 4.7, 1.7, Y 0.9 kb, sin embargo, se desconoce la relevancia biológica de estos hallazgos. En la rata adulta, únicamente se observa en los espermatoцитos en la etapa de paquiteno y en las espermátides, lo cual sugiere que este factor podría intervenir en la diferenciación y/o maduración de estas células. En el ratón, los transcritos para el IGF-I se localizan en el compartimento intersticial a los 14 d.p.p. y después de los 35 d.p.p. se observan sólo en las espermátides (Hansson, 1989). Estudios realizados en ovarios de las hembras XY en la cepa de ratón $\beta 6$. Y^{tir} se observó que el RNA mensajero del IGF-1 se produce desde el primer día en el ovario XX, mientras que en el ovario XY este mensajero se detectó hasta los 15 d.p.p. y la proteína de este factor se localiza en las células de la teca del ovario XX y XY (Villalpando, 2001). El IGF-I participa en la biosíntesis de esteroides sexuales. Existen evidencias experimentales de que el IGF-I potencia la expresión de enzimas clave para el metabolismo de esteroides, debido a que aumenta la velocidad de transcripción de estos genes en la célula de Leydig, teca y granulosa. En las células de Leydig de cerdo cultivadas en presencia del IGF-I se ve un incremento en la síntesis del receptor del RNA mensajero a LH (Chuzel, 1996). El análisis de la función del IGF-I realizados en cultivos de células foliculares aisladas a los 25 días d.p.p., y en experimentos en los que se cultiva el órgano completo en las primeras etapas de la foliculogénesis, mostraron que este factor inhibe la producción de 17- β -estradiol,

testosterona y progesterona, lo cual sugiere que, en la regulación de la función de este factor, probablemente están involucrados otros factores endócrinos, parácrinos y autócrinos. Posnatalmente la función del IGF-I parece ser mediada por diferentes hormonas que no se han establecido completamente. En testículos de ratas hipofisectomizadas la LH, FSH y GH aumentan la expresión del RNA mensajero del IGF-I (Werner, 1991). También promueve que en las gónadas indiferenciadas genótipicamente XY después de 7 días de cultivo en medio libre de suero, se diferencien en testículos e incrementen su producción de testosterona. Este factor no tiene el mismo efecto en gónadas diferenciadas (12 d.g.) y en cultivo (Taketo, 1991).

d) Organización de receptor

Receptor para el IGF-1

Los efectos biológicos de los IGF's dependen de la unión a glicoproteínas de membrana que funcionan como sus receptores. Hay dos receptores que reconocen específicamente a los IGF's. Estos receptores están presentes en todos los tipos de células. El receptor del IGF-I o receptor tipo 1 está localizado principalmente en fibroblastos, condrocitos, osteoblastos y células renales (Thissen, 1994). En el riñón normal, los receptores de IGF-I están localizados en el glomérulo y en algunos segmentos del túbulo distal y proximal así como en los conductos colectores (Wang, 1999). Estructuralmente el receptor tipo I del IGF-I es un complejo heterotetramérico que consiste de dos subunidades α y dos subunidades β con peso molecular de 300 a 350 KD, la especificidad de unión del ligando está conferida por las regiones ricas en cisteína del dominio extracelular de las subunidades α , mientras que la actividad de la tirosina reside en los dominios citoplásmicos de las cadenas β (Werner, 1991).

El receptor tipo 1 une a IGF-I e IGFII y une débilmente a la insulina cuando ésta se encuentra en altas concentraciones (Rechler y Nissley, 1985). El receptor tipo I presenta una afinidad de

unión mucho mayor por el IGF-I (Thissen, 1994). Este receptor es sintetizado como un simple polipéptido precursor (180 kD) que es subsecuentemente glicosilado y unido en las subunidades membranales α y β (Fig. 8). El complejo receptor de IGF-I traspasa la membrana plasmática vía las subunidades membranales β por dominios espaciados, porciones de residuos de 195 aa de las subunidades sobresalientes de la superficie celular asociados por uniones disulfuro (Daughaday, 1989).

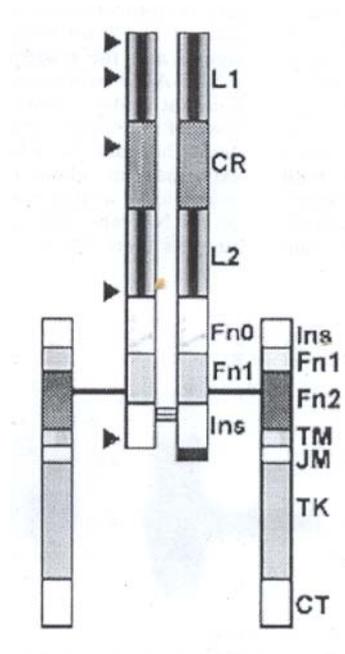


Figura 8. Estructura del receptor de IGF-I (IGF-1 R). El esquema muestra los sitios L 1 Y L2 (dominios largos ricos en leucina); CR (dominio rico en cisteína); Fn0, Fn1, Fn2 (dominios tipo III de fibronectina); Ins (dominio de inserto); TM (dominio transmembranal); JM (dominio yuxtamembranal); TK (tirosin cinasa) y CT dominio C-terminal. (Modificado de Denley, 2004).

e) Proteínas de unión del IGF-1

Las proteínas de unión de los IGF's (IGFBP's) son moléculas que presentan una alta afinidad por los IGF's y que se encuentran principalmente en, líquidos extracelulares, jugando importantes papeles en el control de las acciones de los IGF's (Clemons, 1995). Actualmente han sido descritas seis formas diferentes de IGFBP's (IGFBP-1 a IGFBP-6). Las IGFBP's

presentan afinidades muy altas por ambos IGF's, a menudo superiores a las que presentan los receptores de los IGF's por sus ligandos. Debido a que la insulina no se une a estas proteínas, las IGFBP's podrían estar implicadas en los mecanismos reguladores diferenciales y coordinados de las acciones de estas dos clases de hormonas (IGF's e insulina) (Ver Fig. 9). Las IGFBP-1, 2 y 3 presentan homologías estructurales entre sí, como son la presencia de regiones ricas en cisteínas. De estas tres IGFBP-1 y -2 contienen una secuencia de Arg-Gly-Asp cerca de su carboxilo terminal, lo cual podría mediar su fijación a proteínas de la matriz extracelular, denominadas integrinas (Rosenfeld *et al*, 1990; Clemons, 1995).

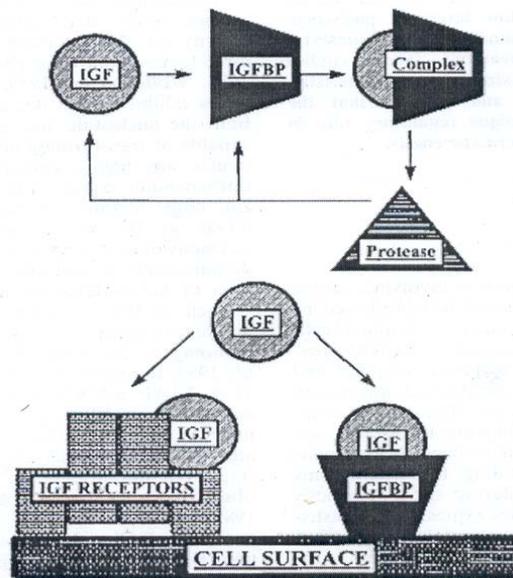


Fig. 9 Componentes del sistema IGF-1. El esquema muestra la interacción de las IGFBP's con el IGF y su presentación con el IGF-1R. (Modificado de Brett, *et al*. 1999).

Las IGFBP's pueden regular: 1) la cantidad y el transporte de los IGF's en los compartimientos vasculares, 11) el transporte de los IGF's en líquidos intersticiales hacia células y tejidos específicos, 111) la cantidad de IGF's disponible por interaccionar con sus receptores específicos, IV) el metabolismo de los IGF's en los

fluidos intersticiales y V) la acción de los IGF's en sus células blanco, potenciándola o inhibiéndolas (Clemons, 1995; Baxter, 1991).

f) Vías de señalización

La activación del receptor IGF-I ocurre después de la unión con el ligando e involucra la autofosforilación de la subunidad β del receptor. La fosforilación ocurre inicialmente en los residuos de tirosina 1131, 1135 Y 1136, también se puede dar en residuos de serina y treonina. La autofosforilación de la subunidad beta produce la actividad tirosina cinasa. Varias proteínas más son fosforiladas después de la estimulación con IGF-I (Werner, 1994). La autofosforilación produce la iniciación de, por lo menos, dos cascadas de señalización. La primera es la activación de la cinasa PI-3 y la formación de fosfatidilinositol-trisfosfato (PIP3) que puede servir como marcador de crecimiento celular. La segunda vía involucra a las proteínas cinasas activadoras de la mitosis (MAPK) (Werner, 1994).

4. Factor de Crecimiento Epidermal (EGF)

Uno de los primeros factores de crecimiento polipeptídicos descritos, es el factor de crecimiento epidermal (EGF). En los años 60s, Cohen describió una proteína aislada de glándulas submaxilares de ratón macho que causaba que abrieran prematuramente los párpados y erupción de dientes en ratones neonatales (Boonstra *et al*, 1995). El EGF es considerado como una hormona porque circula en la sangre y puede actuar en sitios a larga distancia. Los niveles normales de EGF en suero de ratón son de aproximadamente 1 ng/mL (1.7×10^{-10} M). Estos niveles están regulados por hormonas como la tiroxina y la testosterona además, pueden variar por el sexo y el estado de desarrollo. Además de estar en la sangre, el EGF está en varios fluidos del cuerpo, como orina, leche, saliva y fluido seminal. El EGF urinario no deriva de la sangre pero quizás se origina del riñón (Pimentel, 1994).

a) Aspectos estructurales de la proteína

El EGF del ratón es un polipéptido de cadena simple de 6045 Da de peso, compuestos por 53 aa con tres enlaces disulfuro (Fig. 10).

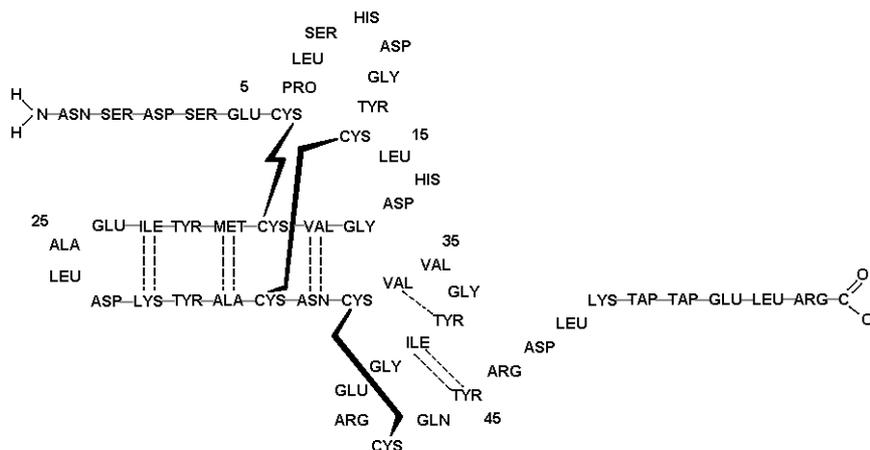


Fig. 10. Secuencia de aminoácidos del EGF. Se muestran los tres enlaces disulfuro en líneas sólidas. Las líneas punteadas muestran los sitios en los que es posible ocurran enlaces de hidrógeno (Boonstra *et al*, 1995).

El EGF del ratón y del humano son biológicamente igual de potentes. La estructura tridimensional del EGF del ratón y la rata son diferentes. Se han detectado dos formas de EGF en el ratón por cromatografía líquida, α EGF y β EGF y ambas formas son iguales en potencia como mitógenos (Pimentel, 1994). Los tres enlaces intracelulares disulfuro son característicos del EGF, se relacionan con péptidos semejantes como el factor de crecimiento transformante α (TGF α) y son esenciales para que se realice la actividad biológica (Taylor 1972). Se ha mostrado que la arginina 41 está directamente involucrada en la interacción del ligando-receptor, mientras que la tirosina 37 es estructuralmente importante para la cadena pero no es esencial para la unión. Un papel importante en la unión del EGF a sido asignado a Ile 23. Este aminoácido está expuesto en la superficie de la proteína y se une directamente a la parte hidrofóbica del receptor. Además, tirosina 29 y leucina 47 son esenciales para la actividad biológica (Boonstra *et al*, 1995).

b) Organización del gen del EGF

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

c) Expresión en tejidos y acciones del EGF

El EGF actúa como un potente mitógeno y agente anabólico sobre una variedad de tejidos de origen ectodermal y endodermal y participa en el proceso de cicatrización de las heridas. Este factor puede tener un importante papel en el proceso de embriogénesis. En el ratón el EGF está relacionado con el control de la formación del paladar secundario, regulando el proceso del desarrollo el cuál incluye una modulación cuantitativa de la síntesis de glucosaminglicano (Pimentel, 1994). Entre las actividades del EGF están la estimulación del transporte de iones, el aumento de fosforilación de proteínas endógenas, alteraciones en la morfología celular y estimulación de la síntesis de DNA. El hígado del ratón contiene un gran número de receptores de EGF, debido a que ejerce importantes efectos sobre este órgano, especialmente en el control de homeostasis hepática, metabolismo de glucosa y gluconeogénesis (Soley, 1987). El EGF tiene efectos impresionantes sobre la función vascular especialmente en la contracción arterial. Los sitios de unión del EGF están presentes en la túnica media de la arteria coronaria (Gan, 1989). El EGF tiene importantes efectos sobre el riñón, estimulando la síntesis de prostaglandinas en cultivos celulares de riñón. El EGF tiene importantes efectos sobre la producción y acción de diferentes hormonas. La síntesis de hormonas inducidas por EGF puede ocurrir por diferentes mecanismos que pueden involucrar o no la síntesis de nuevas proteínas. La acción de la hormona tiroidea en diferentes tipos de células es modulada por el EGF (Pimentel, 1994). El EGF tiene importantes efectos en la función gonadal. Según sean las condiciones fisiológicas predominantes, el EGF puede tener efectos estimulantes o inhibitorios sobre los procesos esteroideogénicos que ocurren en cultivos frescos de células de Leydig de testículos de rata y ratón prepubertal y adulta (Verhoeven, 1986). Su efecto en la regulación de la esteroideogénesis en el testículo del ratón embrionario se desconoce.

d) Receptor del EGF

El receptor del EGF del ratón se ubica en el cromosoma 11 (Pimentel, 1994). Es una glucoproteína transmembranal de aproximadamente 170,000 Da (Fig. 11).

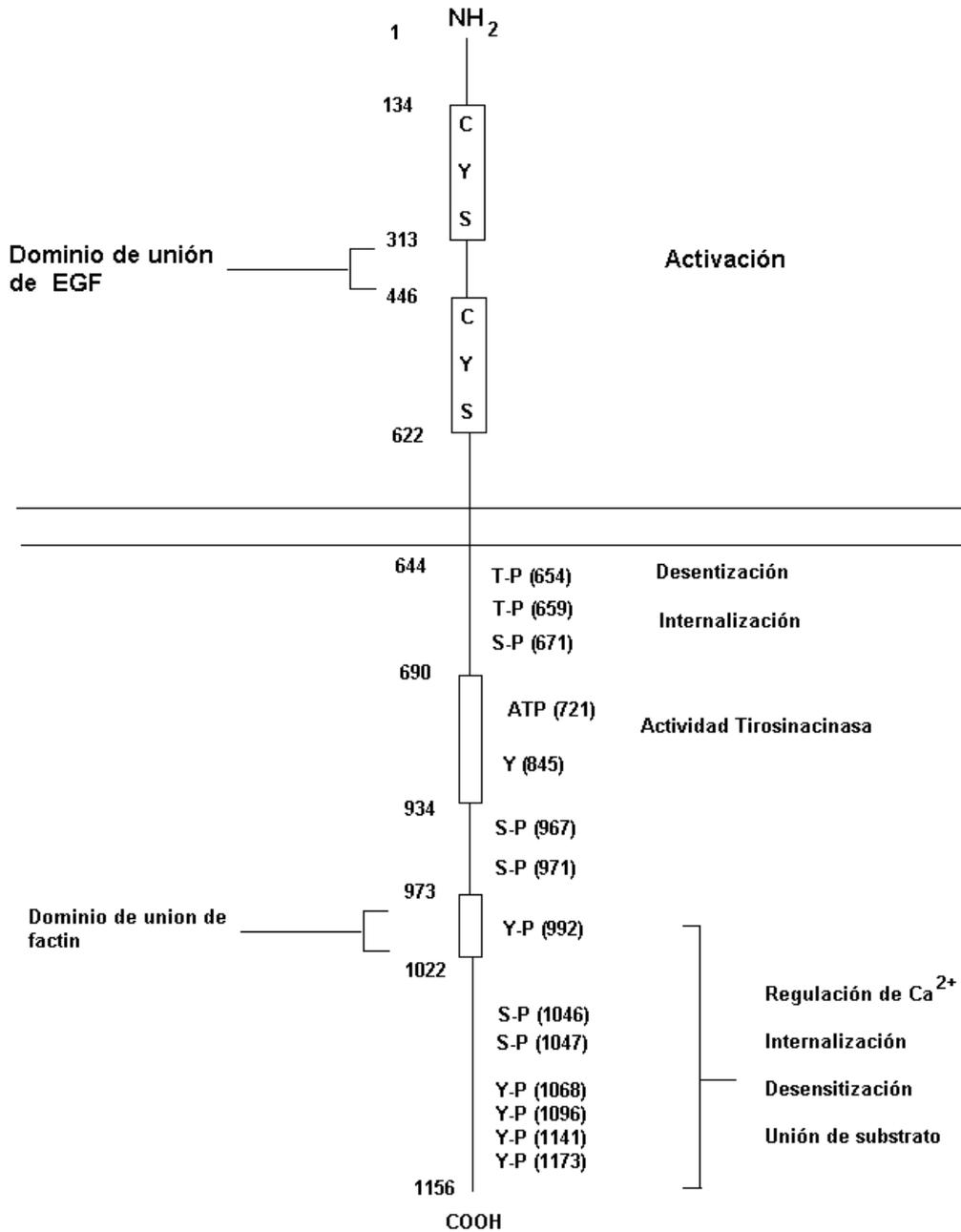


Fig. 11 Representación lineal de la estructura primaria del receptor del EGF (Tomada de Boonstra *et al*, 1995).

El dominio externo del receptor del EGF contiene al amino terminal de la molécula, 622 residuos de aminoácidos y 12 sitios donde puede ocurrir una N-glicosilación. Además, el dominio externo contiene dos dominios ricos en cisteína. El dominio de unión del EGF al receptor se ha identificado entre los dominios ricos en cisteínas (Carpenter, 1986). El receptor del EGF contiene un dominio hidrofóbico de 23 residuos de aminoácidos, los cuáles cruzan la membrana. El dominio interno del receptor está compuesto por 542 residuos de aa y contiene una región de aproximadamente 30° aa homóloga al dominio catalítico de la proteína cinasa, codificada por el gen *src* de la familia de oncogenes. Así que el receptor EGF pertenece a la clase de receptores de tirosinacinas (Boonstra *et al*, 1995).

e) Cascada de señales del EGF

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

5. Ciclo celular

El ciclo celular es el proceso ordenado y repetitivo en el tiempo en el que la célula crece y se divide en dos células hijas. Las células que no se están dividiendo no forman parte, de por sí, en el ciclo celular, sino que están en una fase conocida como G₀. Todas las células se originan únicamente de otra existente con anterioridad. El ciclo celular se inicia en el instante en que aparece una nueva célula, descendiente de otra que se divide y termina en el momento en que dicha célula, por división subsiguiente, origina dos nuevas células hijas. El ciclo celular puede considerarse como una sucesión continua de estados que se diferencian del anterior y del siguiente por la cantidad de material genético existente en el núcleo celular. La duración del ciclo celular varía según la estirpe celular, siendo 24 la duración media del ciclo completo. El evento clave en la división celular es la adecuada distribución del material genético a las células hijas. Este material está organizado en cromosomas. Los cromosomas están implicados en dos grandes procesos: a) la transmisión de la información genética de célula en célula y de generación en generación y b) permitir la expresión ordenada de esta información para controlar las funciones y el desarrollo celulares (Cervantes, 2002).

a) Fases del ciclo celular

La célula puede encontrarse en dos estados claramente diferenciados de acuerdo a Cervantes 2002 y Lewin 2001. El estado de división celular o mitosis que ocupa una pequeña parte del ciclo celular. Es un proceso continuo de eventos nucleares y citoplasmáticos que incluye cinco fases: profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis. Durante este proceso el adecuado reparto cromosómico es mediado por el aparato mitótico, compuesto por los centros organizadores de los microtúbulos (centrosomas en células animales), el huso mitótico formado a partir de las proteínas del citoesqueleto (tubulinas y proteínas asociadas a microtubulos, MAP) y los cinetocóros de cada cromátida.

El estado de no división o interfase. La célula realiza sus funciones específicas y, si está destinada a la división celular, realiza la duplicación del ADN. Es el período comprendido entre divisiones celulares. Es la fase más larga del ciclo celular, ocupando casi el 95% del ciclo, transcurre entre dos mitosis y comprende tres fases (Fig 12).

Fase G1 (Gap 1): Es la primera fase del ciclo celular en el que existe crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN. Este período transcurre entre el fin de una mitosis y el inicio de la síntesis de ADN. Tiene una duración de entre 6 y 12 horas y durante este tiempo, la célula dobla su tamaño y masa debido a la continua síntesis de todos sus componentes, como resultado de la expresión de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo.

Fase S: Es la segunda fase del ciclo, en la que se produce la replicación o síntesis del ADN, como resultado cada cromosoma se duplica y queda formado por dos cromátidas idénticas. Con la duplicación del ADN, el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y de ADN que al principio. Tiene una duración de unos 6-8 horas (Se le llama fase S por el período sintético de replicación de ADN, las fases G1 y G2 se refieren a dos “gaps” (espacios) del ciclo celular en los que no existe síntesis de ADN.

Fase G2 (Gap 2): Es la segunda fase de crecimiento del ciclo celular en la que continúa la duplicación de proteínas y ARN. Durante este período la célula tiene dos juegos diploides completos de cromosomas. Al final de este período se observa al microscopio cambios en la estructura celular, y que indican el principio de la división celular. Tiene una duración entre 3 y 4 horas. Termina cuando los cromosomas empiezan a condensarse al inicio de la mitosis.

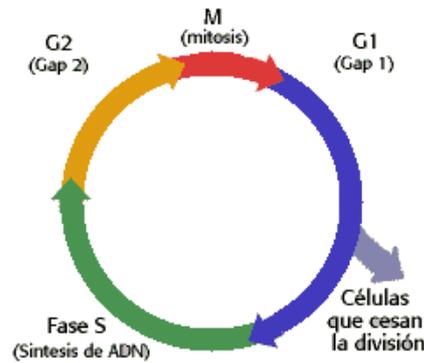


Fig. 12 Etapas del ciclo celular (Tomada de Lewin, 2001)

Las células reciben constantemente información de otras células y del medio externo, esto determina que continúen dividiéndose o que se diferencien en tipos celulares específicos. La etapa limitante del ciclo celular es el período S, ya que una vez que la célula duplicó su material genético debe continuar el ciclo y dividirse. El principal punto de control del ciclo se encuentra al final de G1 y determina la entrada a S. Además, existen otros puntos de control o chequeo al final de G2, antes de entrar a mitosis para asegurar la integridad del material genético antes del reparto cromosómico. El último punto de control se encuentra en la transición metafase-anafase con el alineamiento correcto de los cromosomas en el plano ecuatorial, antes de producirse la segregación de las cromátidas hermanas. Las moléculas centrales de la regulación del ciclo celular son los complejos ciclina-CDK (quinasas dependientes de ciclinas), los cuales controlan el avance del ciclo.

b) Función y tipo de ciclinas

Las ciclinas son un grupo heterogéneo de proteínas con una masa de 36 a 87 kDa. Se distinguen según el momento del ciclo en el que actúan (Tabla 2).

- Ciclinas G1: promueven el paso de G1 a S
- Ciclinas G1/S
- Ciclinas S: necesarias para iniciar la replicación del ADN
- Ciclinas M: promueven la mitosis

Las ciclinas son proteínas de vida muy corta que actúan como una subunidad reguladora que es necesaria para la función de la quinasa con los sustratos apropiados y se destruyen luego de separarse de las CDK. La ciclina induce un cambio en la conformación de su pareja que es necesario para crear el sitio activo de la quinasa. Así pues una subunidad catalítica es inactiva por si misma y puede ser activa únicamente cuando se une a una ciclina (Tabla4).

Complejo Cdk/ciclina	Ciclina	Cdk asociada
Cdk-G1	ciclina D	Cdk 4,6
Cdk-G1/S	ciclina E	Cdk2
Cdk-S	ciclina A	Cdk2
Cdk-M	ciclina B	Cdk1

Tabla 4. Tipos de ciclinas detectadas en vertebrados. (Tomada de Cervantes, 2006).

c) Papel de las cinasas.

Las cinasas, dependientes de ciclina (CDK), son moléculas con una masa de 34 kDa. Forman dos lóbulos entre los cuales está el centro catalítico, donde se inserta el ATP. En la entrada del centro hay una treonina que debe estar fosforilada para que la quinasa actúe. En el centro catalítico hay dos treoninas que, al ser fosforiladas, inhiben a la quinasa y una región de unión a la ciclina llamada PSTAIRE.

Activación de los complejos ciclina/CDK: El complejo ciclinaA/CDK2 activa la proteína CAK, quinasa activadora de CDK. La proteína CAK fosforila a la CDK, activándola. La fosfatasa PP2a desfosforila a la CDK, inactivándola.

Inhibición de los complejos ciclina/CDK: Existen complejos inhibidores de las quinatas

clclina-CDK denominados CKI como la p27 y p21 que se unen a la ciclina y a la CDK al mismo tiempo bloqueando el sitio activo de la CDK. Las enzimas ligasas de ubiquitina catalizan la disociación de ciclina y CDK y la unión de la ciclina a la proteína ubiquitina, junto a la cual se dirigirá al proteasoma.

Una enzima ligasa de ubiquitina es el complejo SCF, que actúa sobre las ciclinas G1/S. Otro complejo denominado APC (anaphase promoting complex) actúa sobre ciclinas M. Funciona como una ligasa E3 de ubiquitina. El sustrato ubiquitinado es degradado por el proteosoma (Lewin, 2001).

6. Biosíntesis de esteroides gonadales.

Las hormonas esteroides se producen en células específicas de los testículos, la corteza adrenal, ovarios y placenta. Los testículos son los encargados de secretar, principalmente, testosterona (andrógenos), la corteza adrenal produce la aldosterona, cortisol y la dehidroepiandrosterona (DHEA), los ovarios producen los estrógenos que engloban el estradiol (13-metil-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahidrociclopenta[a]fenantrene-3,17-diol), la progesterona(17acetil10,13dimetil1,2,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17tetradecahidrociclopenta[a] fenantren-3-ona) y el 4-androsteno-3, 17-diona, y por último estaría la placenta que también secreta estradiol y progesterona, pero además produce otro estrógeno, el estriol. Los esteroides biológicamente activos, concretamente los andrógenos y los estrógenos, se forman también en tejidos periféricos a partir de precursores esteroides que circulan en la sangre, dichos tejidos incluyen piel, hígado, cerebro y tejidos mamario y adiposo (Nebert, 1987).

Los esteroides no se almacenan en cantidades apreciables sino que una vez que son secretados, pasan a la circulación general y se distribuyen por todos los tejidos, siendo posteriormente destruidas principalmente en el hígado.

La actividad de la aromatasas reside dentro de una glucoproteína transmembranal -familia P450 de monooxigenasas (Corbin, 1988); también es esencial una flavoproteína omnipresente, la NADPH-citocromo P450 reductasa. Ambas proteínas se localizan en el retículo endoplásmico de células de la granulosa ovárica, células de Sertoli y de Leydig testiculares, células del estroma de tejido adiposo, sincitiotrofoblastos placentarios, blastocisto previo a la implantación y diversas regiones del cerebro.

a) Origen de esteroides gonadales

El colesterol es el origen biosintético de todas las hormonas esteroideas, los mensajeros extracelulares son elaborados por las gónadas y la corteza suprarrenal, y la placenta en las mujeres embarazadas. La activación de la síntesis de las hormonas esteroideas se inicia por la estimulación de la hidrólisis de los ésteres de colesterol y una captación de colesterol en las mitocondrias de las células del órgano blanco (Mathews, 2002). La biosíntesis de las hormonas esteroides comienza por la escisión de la cadena lateral del colesterol dando como resultado la pregnenolona, para ello el colesterol entra en la mitocondria mediante un transportador específico dónde sufre un proceso de hidroxilación en las posiciones 20 y 22 por una monooxigenasa que tiene citocromo P450 en su grupo prostético. Después, interviene la acción de una desmolasa que separa el resto del aldehído isocaproico. Esta etapa se considera limítrofe en la biosíntesis de hormonas esteroides, llegando incluso a actuar la pregnenolona como retroinhibidor de la hidroxilación del colesterol (Mathews, 2002). La pregnenolona se convierte en la hormona esteroidea progesterona mediante una deshidrogenación y la isomerización de un doble enlace. La hidroxilación en el C-21 por una enzima de la corteza suprarrenal, seguida de otras dos hidroxilaciones y una deshidrogenación para formar un grupo aldehído, da aldosterona, un mineralocorticoide. La hidroxilación de la progesterona en C-17 da 17α -hidroxiprogesterona, el precursor de todos los demás esteroides. Dos hidroxilaciones de este intermediario dan cortisol (un glucocorticoide), fundamentalmente en la glándula suprarrenal. Una enzima de la corteza suprarrenal y de las gónadas rompe la cadena lateral de la 17 -hidroxiprogesterona en C-17, dando androstenediona, un precursor de los andrógenos y los estrógenos. Las enzimas de estos procesos forman un complejo llamado aromatasas. Se debe observar que las reacciones catalizadas este complejo constituyen la única ruta de síntesis de los anillos aromáticos que se conocen en las células animales. La testosterona sufre una reducción en C-5, dando 5α -dihidrotestosterona, que es un andrógeno más potente (Mathews, 2002).

II. Planteamiento del problema

Estudios anteriores demostraron la expresión del mRNA del IGF-1 y de su proteína en el ratón. Así como el papel del IGF-1 como importante regulador de las enzimas esteroideogénicas P450 17 α – Hidroxilasa y 17 β – Hidroxiesteroide deshidrogenasa durante el desarrollo testicular de diferentes especies de vertebrados. Hallazgos hechos en el ratón demostraron resultados similares en etapas posteriores durante el desarrollo gonadal embrionario del ratón (Villalpando, López – Olmos, 2001). Se ha descrito que el IGF-I, promueve la diferenciación de las células mesenquimáticas a células de Leydig en los testículos fetales de 16.5 y 20.5 d.g., además de incrementar el índice mitótico en células de Leydig en testículos fetales de 16 y 18 d.g. Sin embargo, el efecto del IGF-1 en células de Sertoli del testículo embrionario del ratón no se ha descrito, por lo tanto consideramos necesario evaluar el efecto en las células de Sertoli para determinar la función fisiológica en este tipo celular durante el desarrollo embrionario.

Por otra parte, se ha observado que el RNA mensajero y la proteína del receptor a EGF se expresan desde los 14 d.g. en la gónada de la rata. Además, se ha descrito que el EGF regula la proliferación celular del testículo adulto, pero su efecto en las células de Sertoli durante la etapa embrionaria no se ha descrito.

A partir de los antecedentes descritos se proponen las siguientes hipótesis:

III. Hipótesis

1. La administración exógena del Factor de Crecimiento Similar a Insulina (IGF-1) incrementará la proliferación de las células de Sertoli de 14, 16 y 18 días de gestación en el ratón *Mus musculus*.

2. El Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), estimulará la mitosis en las células de Sertoli de ratón en las edades mencionadas.

3. La combinación de estos factores, tendrá un efecto sinérgico sobre la proliferación de las células de Sertoli a lo largo del desarrollo testicular del ratón.

IV. Objetivos

- 1) Identificar el efecto del Factor de Crecimiento Similar a Insulina (IGF-1) en la proliferación de las células de Sertoli en ratones de 14 d.g. (Fase de crecimiento), 16 d. g. (Etapa fetal) y 18 d. g. (Etapa prenatal).

- 2) Determinar cual es el papel del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) en la mitosis de las células de Sertoli en las edades mencionadas.

- 3) Determinar si existe una acción sinérgica del IGF-I y del EGF en la proliferación de las células de Sertoli en cada una de las edades mencionadas del desarrollo testicular en ratón.

V. Material y métodos

Animales

Se utilizaron ratones machos y hembras de 10 semanas de edad de la cepa CD-1 y se cruzaron un macho con cinco hembras. El día que se observó el tapón vaginal se denominó día cero de la gestación. Se emplearon hembras gestantes de 14, 16 y 18 días de gestación y se mantuvieron en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en cajas estériles con Sani-Chips de Harlan, con periodos de 12 horas de luz – oscuridad a temperatura de 22 – 23 °C y se alimentaron con Diet Mouse Food de Harlan y agua esterilizada *ad libitum* acidificada con HCl puro (pH 2.5), filtrada por osmosis inversa y esterilizada en autoclave.

Aislamiento de tejido

En un ambiente estéril las hembras se sacrificaron por dislocación cervical y se realizó un corte en forma de V en la región ventral. Se separó el útero, se sacaron los embriones en una caja de Petri y se separó la región anterior de la región posterior mediante el uso de un bisturí. Se obtuvieron los testículos de los embriones exponiendo la parte dorsal interna del embrión y se colocaron en cajas de Petri estériles con medio de cultivo M199, en un ambiente estéril de acuerdo al método descrito por Villalpando y López-Olmos (2003).

Purificación de células de Sertoli

En un ambiente estéril las gónadas se transfirieron a un tubo Eppendorf estéril con 500 µL. de medio de cultivo D-MEM. Se les extrajo la mayor cantidad posible de residuos de tejido del medio de cultivo. Se lavaron dos veces con 500 µl. de PBS estéril atemperado de acuerdo a la técnica adaptada en el laboratorio (2006). El tejido obtenido se incubó 4 minutos en una solución proteolítica compuesta por: 995 µl. de PBS libre de Calcio y Magnesio filtrado, 20 µl.

de colagenasa (0.2 mg/ml) y 20 μ l. de DNasa (0.01 mg/ml). Después de 4 minutos de incubación el tejido se disgregó manualmente utilizando una pipeta siliconizada. Enseguida, se detuvo la reacción proteolítica con inhibidor de tripsina (GIBCO) al 0.2 %. Se agregaron 390 μ l. de PBS estéril y atemperado y se centrifugó por 15 minutos a 3000 rpm. Posteriormente, se decantó el sobrenadante de un solo golpe y el tejido recuperado por centrifugación se lavó dos veces con PBS estéril atemperado y entre cada lavado se centrifugó dos minutos a 3000 rpm. Las células recuperadas por la centrifugación se resuspendieron en 1 ml. de PBS y se dejaron reposar por 15 minutos en una gradilla a temperatura ambiente para que se separaran por gravedad. De esta manera, los túbulos que contenían a las células de Sertoli se precipitaron al fondo y las células de Leydig que se mantienen en la superficie. Se separó el sobrenadante que contiene a las células de Leydig, con una pipeta siliconizada y a las células sedimentadas en el fondo del tubo, que correspondieron a los túbulos seminíferos con las células de Sertoli, se lavaron dos veces con 500 μ l. de PBS y se centrifugaron entre cada lavado por 2 minutos a 3500 RPM. El tejido recuperado, se incubó con una solución de tripsina al 0.12 % (791 μ l. de PBS, 189 μ l. de EDTA 2 mM. (Versene), 20 μ l. de tripsina al 2.5%) por 2 minutos más un minuto de disgregación manual. Realizada la disgregación manual se detuvo la reacción de la tripsina con 110 μ l. de Inhibidor de tripsina (Gibco) al 0.2 % agitando levemente. Se centrifugó el tubo y las células se lavaron 2 veces con 500 μ l. de PBS centrifugando entre cada lavado a 3500 rpm. dos minutos. Se resuspendió el pellet en 500 μ l. de medio de cultivo DMEM suplementado con penicilina y estreptomicina.

Conteo celular

Una vez realizado el aislamiento y purificación de las células de Sertoli, se tomaron 10 μ l. del medio de cultivo DMEM con las células de Sertoli aisladas y se le añadió 10 μ l. de azul de tripano al 0.2 % en PBS y se mezcló. Se contó la viabilidad celular depositando 10 μ l de ésta solución en una cámara de Neubauer. Las células que incorporaron el colorante, fueron células muertas y las células que no incorporaron el colorante fueron contadas como viables. Se observó en un microscopio óptico modelo GalenTm III y se contaron las células contenidas en los cuatro cuadrantes externos de la cámara de Neubauer. El total de células se calculó para obtener el número de células contenidas por mililitro utilizando la siguiente ecuación:

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

Cultivo Celular

Conociendo el número de células recuperadas en la muestra, se realizó un cálculo para obtener un volumen el cual contendría 25 000 células. En todos los experimentos se cultivaron 25 000 células de las gónadas disgregadas de 14, 16 y 18 días de gestación en una incubadora con 95 % de O₂ y 5 % de CO₂. Las primeras 24 horas, las células se cultivaron con 200 μ l. de Medio D-MEM modificado con 1g. de Glucosa, L – glutamina (Dulbeco), suplementado con estreptomycin y penicilina (1mg/ml) y suero bovino fetal estéril al 10 % en cajas de cultivo (Marca?) por 24 horas. Pasadas las primeras 24 horas las células cultivadas se lavaron con 100 μ L de PBS para eliminar residuos del SBF. Terminados estos lavados, las células fueron cultivadas por 24 horas más con medio de cultivo D-MEM modificado y suplementado. Después de 24 horas las células se incubaron por 24 horas con IGF-1, EGF y una combinación de estos factores (IGF-1/EGF) a una concentración de 100 ng/ml y también suplementado con Bromodeoxyuridina (BrdU) al 0.1%. en medio de

cultivo D-MEM modificado y suplementado. A los grupos control no se les administró los factores de crecimiento. Terminadas las últimas 24 horas de incubación, las células se sacaron de la incubadora, se les retiró el medio de cultivo y se lavó cada pozo por duplicado con 200 μ L de PBS esteril, para eliminar el exceso de medio. Se agregaron 200 μ L de glutaraldehído 0.3% en amortiguador de fosfatos a cada pozo y las células se fijaron por 10 min. con agitación leve y a baja temperatura. Después de los diez minutos de fijación se retiró el glutaraldehído y se secó cada pozo sacudiendo firmemente sobre un papel absorbente. Se envolvió en papel aluminio cada caja y se guardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 24 horas para su posterior inmunodetección.

Inmunodetección de las células marcadas

Se sacaron las cajas del congelador y se dejaron atemperar 10 min. Se lavaron con 200 μ L de PBS a temperatura ambiente (TA) 5 min. dos veces. Se retiró el PBS y se incubaron con solución bloqueadora de albúmina al 5% 1 hora. Se les adicionó a cada pozo 200 μ L de PBS caliente ($<80^{\circ}\text{C}$) 3 veces por 10 min. Se incubaron con 50 μ L anti-BrdU (1:10) por 1 hora. Se lavaron 3 veces con PBS a TA 5 min. Se incubaron con 50 μ L anti-mouse FITC 1:10 en oscuridad por 1 hora. Pasado este tiempo, los pozos se lavaron con PBS- Tween (0.05%) a TA 3 veces. Se secaron los pozos sacudiendo firmemente sobre un papel absorbente. Terminada la inmunodetección, las cajas de cultivo se mantuvieron en oscuridad envueltas en papel aluminio y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la posterior toma de las fotografías utilizando el microscopio de fluorescencia.

Cuantificación de las células marcadas

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

Análisis estadístico

Los resultados experimentales fueron analizados estadísticamente utilizando las pruebas de “t” de Student con un nivel de probabilidad del 99.5%, ($P < 0.05$). Empleando una n de 4 experimentos independientes, lo que corresponde a 16 experimentos por variable.

VI. Resultados

Cultivo Celular

El cultivo celular fue monitoreado constantemente y resultó ser el adecuado en lo que se refiere a la pureza, el buen crecimiento y desarrollo de las células de Sertoli cultivadas (Fig. A y B).

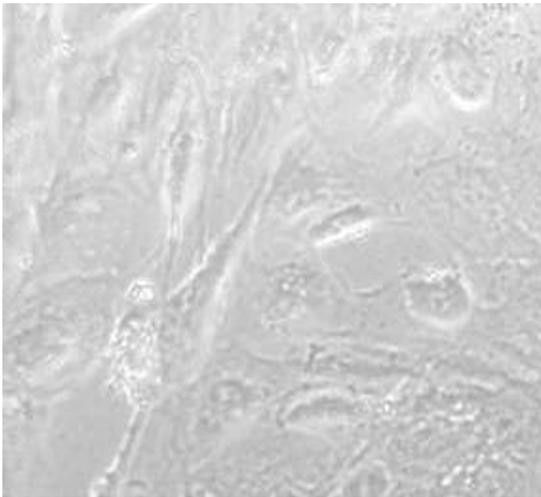


Fig. A

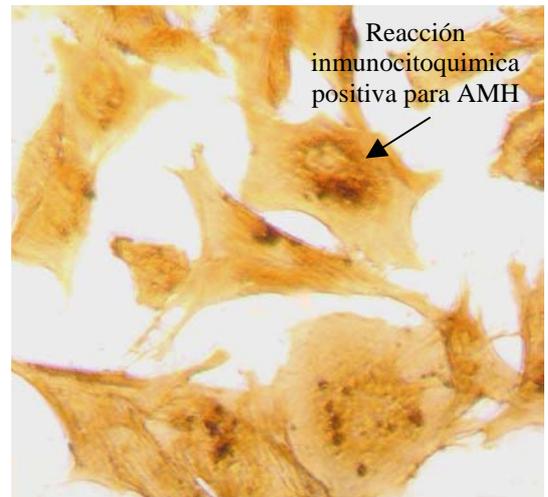


Fig. B

Fig. 13 Fotografías que muestran la pureza y el correcto crecimiento de las células de Sertoli durante el proceso de cultivo celular. Fig. A, Grupo control de la prueba inmunocitoquímica utilizada para detectar la hormona inhibidora de los conductos de Müller (AMH) expresada por las células de Sertoli, no se observa una reacción positiva. Fig. B Grupo experimental de la misma prueba inmunocitoquímica, se observa una reacción positiva a la prueba, corroborando la presencia de la AMH secretada exclusivamente por las células de Sertoli.

2. Inmunodetección

Por medio de la inmunodetección, fue posible detectar la proliferación de las células de Sertoli, ya que es una técnica que permite observar las células que integraron la BrdU al DNA al momento de su replicación durante la división mitótica. En la imagen 14 se observan las células que fueron tratadas por medio de esta técnica. Los núcleos de las células de Sertoli se observan marcados con el anticuerpo secundario fluoresceinado (Anti – Mouse FITC).

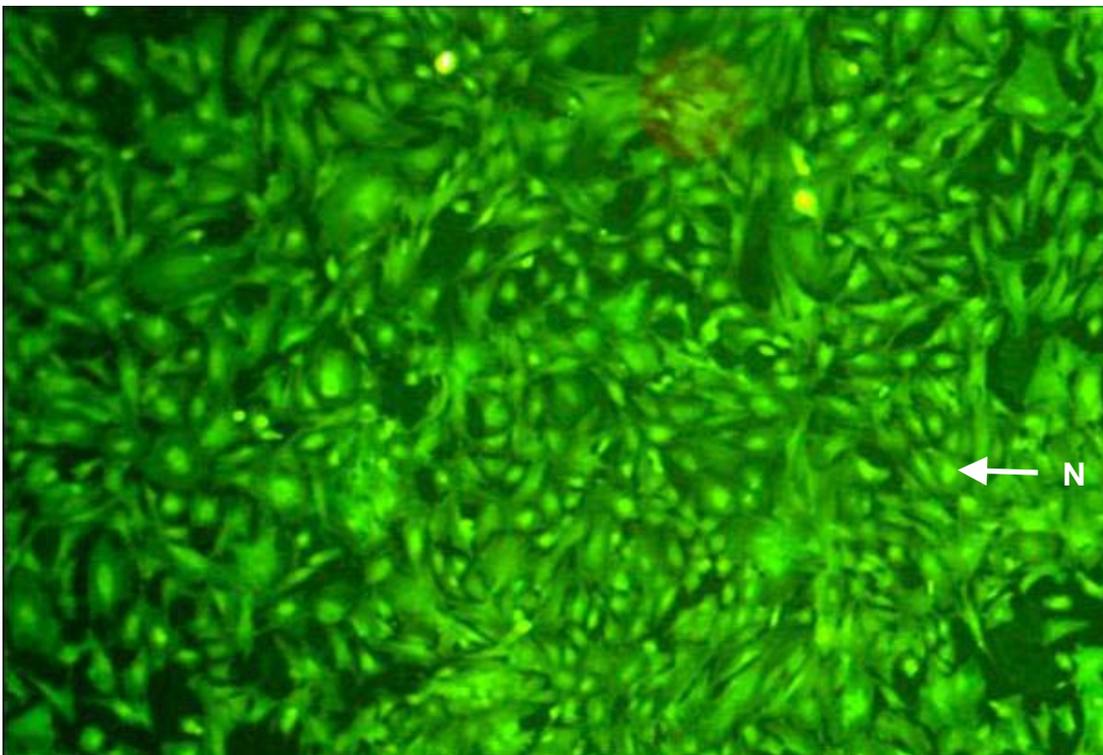


Fig. 14 Células de Sertoli de 14 d.g. marcadas con BrdU. SE observa la marca en los núcleos (N) de las células. Aumento 20X.

Efecto del IGF-I en la proliferación de las Células de Sertoli

Resultados obtenidos al administrar exógenamente el IGF-I a las células de Sertoli embrionarias de 14, 16 y 18 d.g. de testículo de ratón. Las células de Sertoli de 14 d.g. del grupo control muestran un porcentaje de proliferación mayor (54.05 %). con respecto a las que fueron tratadas con el IGF-I (Fig. 15) que muestran un porcentaje del 45.94 % de proliferación.

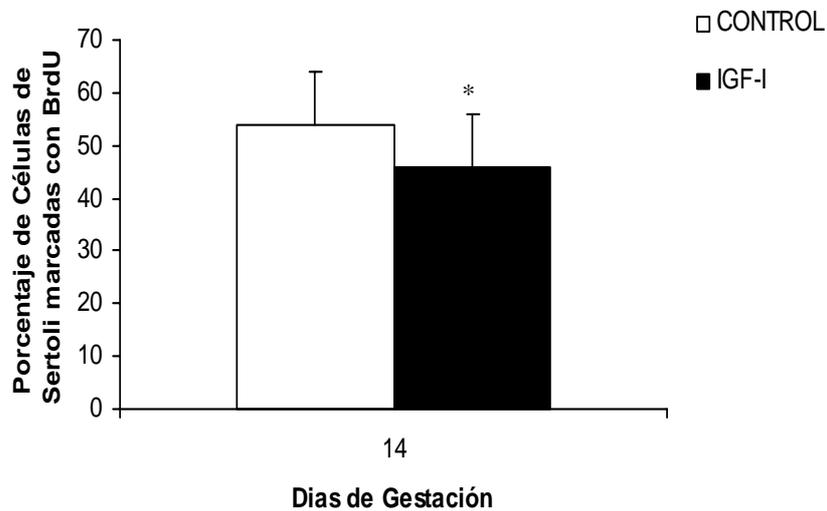


Fig. 15. Porcentaje de proliferación de las Células de Sertoli de 14 d.g. tratadas con IGF-I. La gráfica muestra los resultados expresados en porcentaje. $n=4$ (16 experimentos por variable), $*p < 0.05$.

Efecto del IGF-I en la proliferación de las Células de Sertoli de 16 d. g.

La figura 16 muestra el porcentaje de proliferación obtenido al estimular las células de Sertoli de 16 d.g. con el IGF-I. En este caso, se observó que el grupo de células de Sertoli control presentaron un menor porcentaje de proliferación (39.43%), mientras que el grupo experimental mostró un mayor porcentaje de proliferación (60.56 %). Es decir, se observó una regulación positiva en la proliferación por este factor.

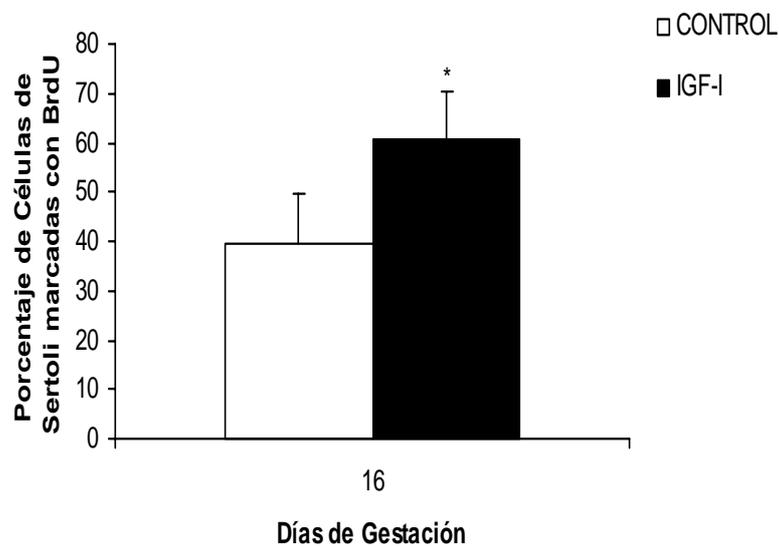


Fig. 16. Porcentaje de proliferación de las Células de Sertoli de 16 d.g. tratadas con IGF-I La gráfica muestra los resultados expresados en porcentaje. $n=4$ (16 experimentos por variable), p^* , $p < 0.05$.

Efecto del IGF-I en la proliferación de las Células de Sertoli de 18 d. g.

Los resultados obtenidos al estimular las células de Sertoli de 18 d.g. con el IGF-I, muestran que cuando estas células no son estimuladas con este factor, tienen una proliferación menor (45.63%) con respecto al grupo experimental (54.36%), (Fig. 17).

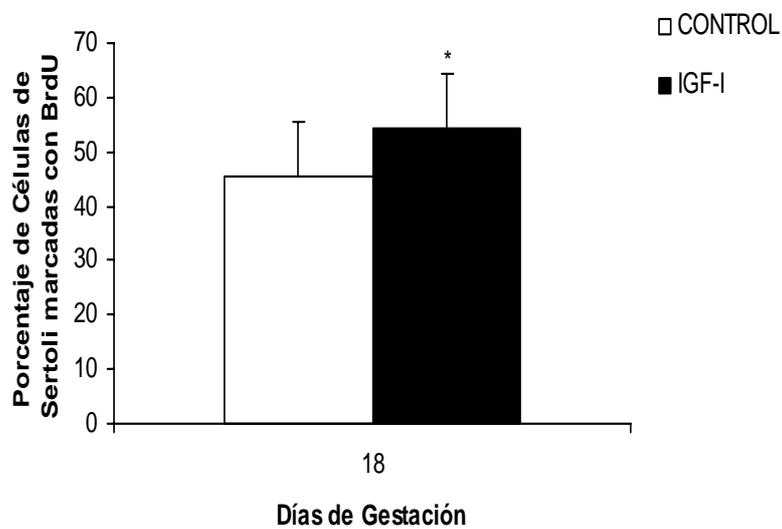


Fig. 17. Porcentaje de proliferación de las Células de Sertoli de 18 d.g. tratadas con IGF-I. La gráfica muestra los resultados expresados en porcentaje. $n=4$ (16 experimentos por variable), $*p < 0.05$.

Comportamiento del efecto del IGF-I a lo largo de las edades descritas

En la figura 18 se muestra de manera integral el efecto del IGF-I a lo largo de las diferentes etapas de desarrollo en experimentación. Se observó que no existe un efecto positivo significativo en la proliferación de las células de Sertoli embrionarias a los 14 d.g. A los 16 d.g. hay un incremento significativo en los niveles de proliferación debido a este factor, mientras que a los 18 d.g. dicho nivel máximo alcanzado en la etapa anterior disminuye, aunque su porcentaje de proliferación sigue siendo significativo.

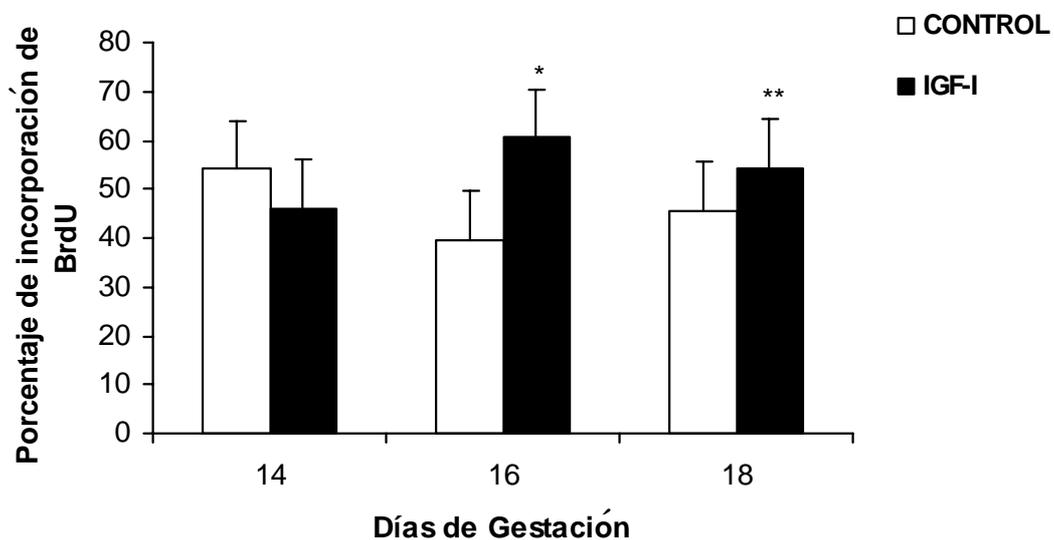


Fig. 18. Porcentaje de proliferación de las células de Sertoli tratadas con el IGF-I a lo largo de las fases críticas del desarrollo. Se observa un nivel máximo en la proliferación celular a los 16 d.g. *p,**p < 0.05.

Efecto del EGF en la proliferación de las Células de Sertoli

En la figura 19 se muestra que cuando las células de Sertoli de 14 d. g. fueron estimuladas con EGF, presenta un porcentaje de proliferación menor (43.73%) que las células de Sertoli del grupo control (56.26%).

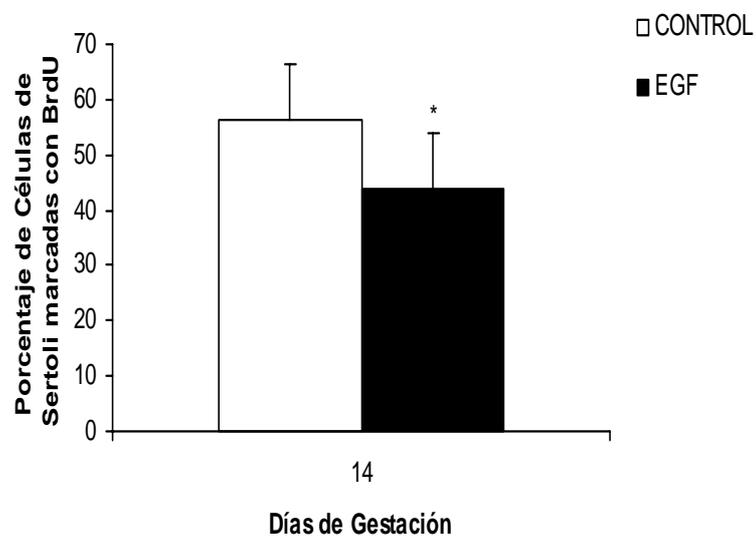


Fig. 19. Porcentaje de proliferación de las Células de Sertoli de 14 d.g. tratadas con EGF. La gráfica muestra los resultados expresados en porcentaje. $n=4$ (16 experimentos por variable). $*p < 0.05$

Para el caso de los experimentos realizados con el EGF a los 16 d.g. la comparación de los porcentajes de proliferación mostraron una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo experimental (Fig. 20). Es decir, las células de Sertoli del grupo control tuvieron un porcentaje de (45.93 %), mientras que las estimuladas con EGF presentaron un mayor grado de proliferación (54.06 %).

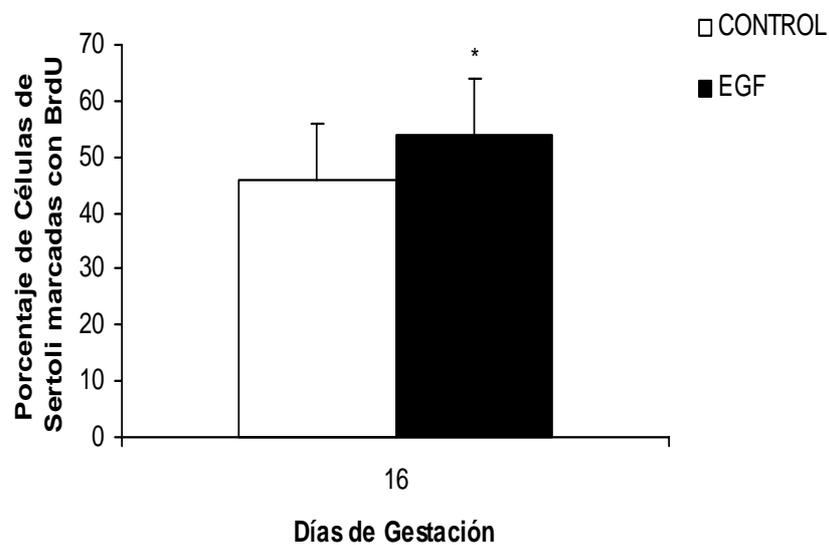


Fig. 20. Porcentaje de proliferación de las Células de Sertoli de 16 d.g. tratadas con EGF. La gráfica muestra los resultados expresados en porcentaje. n =4 (16 experimentos por variable), *p < 0.05.

A diferencia de los dos resultados anteriores, se observó que el grupo control tuvo un porcentaje menor de proliferación celular del 41.52 % mientras que las células estimuladas con dicho factor de crecimiento mostraron un porcentaje de proliferación del 58.47 %, es decir, reguló positiva y significativamente la proliferación celular (Fig. 21).

Es a esta edad cuando se alcanzó el nivel máximo en la proliferación de las células de Sertoli a causa del EGF con respecto al grupo control.

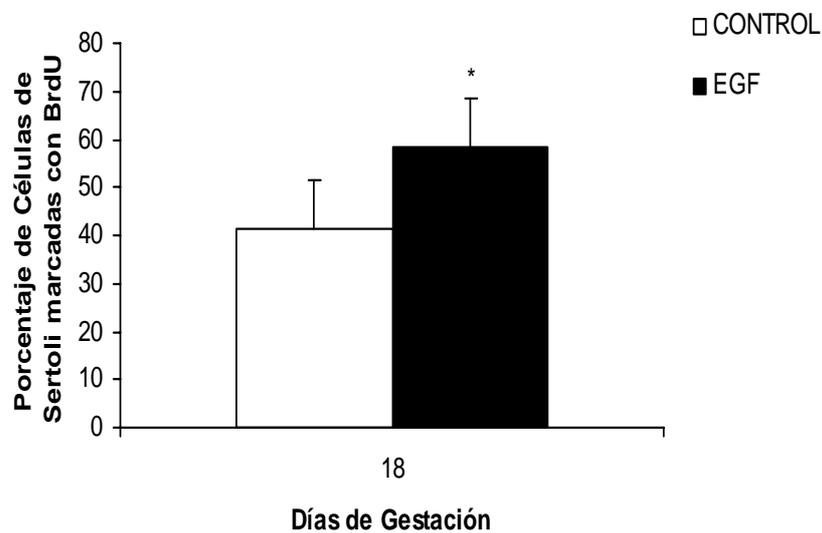


Fig. 21. Porcentaje de proliferación de las Células de Sertoli de 18 d.g. tratadas con EGF. La gráfica muestra los resultados expresados en porcentaje. Se observa un mayor nivel de proliferación de las células de Sertoli estimuladas a esta edad respecto al grupo control. n =4 (16 Experimentos por variable), * $p < 0.05$.

Comportamiento del efecto del EGF en las edades críticas mencionadas

En la figura 22 se observa, de manera integral, el efecto del EGF en la proliferación de las células de Sertoli. En este caso, el efecto que produjo dicho factor muestra un comportamiento gradual, es decir, en la etapa de crecimiento (14 d.g.) tuvo un efecto negativo con respecto al control, pero este efecto cambió durante la etapa fetal (16 d.g.) llegando a ser un efecto positivo significativo a diferencia de su grupo control y de la edad anterior (14 d.g.) y, continua su efecto gradual incrementando de manera significativa (con respecto al grupo de 16 d.g.) la proliferación de este tipo celular hasta la etapa prenatal (18 d.g.).

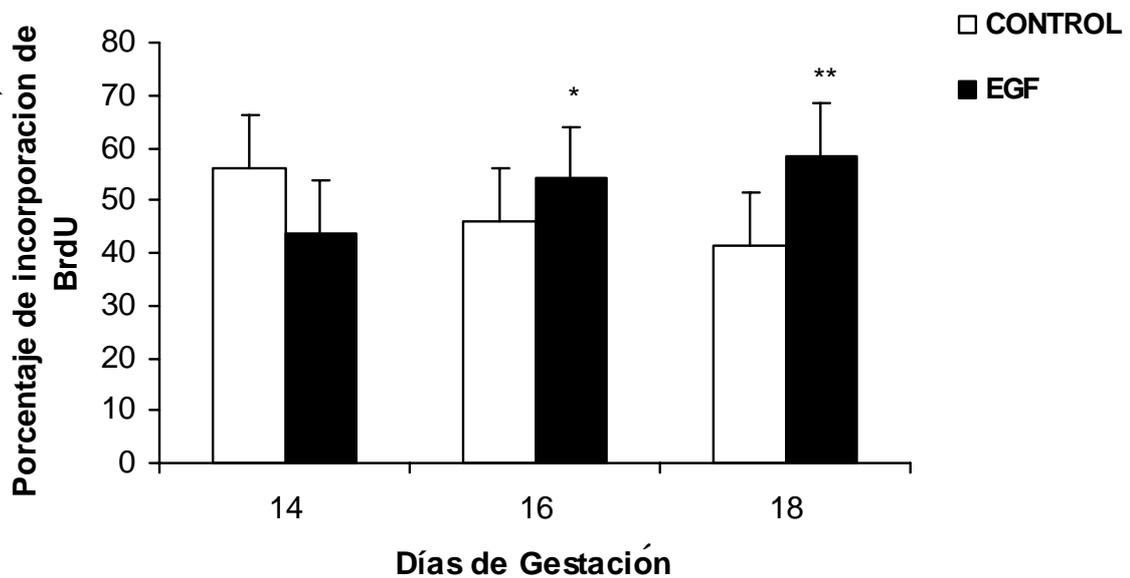


Fig. 22. Porcentaje de proliferación de las células de Sertoli tratadas con el EGF a lo largo de las fases críticas del desarrollo embrionario. Se observa un nivel máximo en la proliferación celular a los 18 d.g. Se observa un efecto gradual en la proliferación celular debido al estímulo con el EGF. *p, **p < 0.05.

5. Efecto sinérgico del IGF-I / EGF en la proliferación de las Células de Sertoli

A continuación se presentan los resultados de los experimentos realizados utilizando la combinación del IGF-I/EGF como una presunta combinación estimulante de la proliferación celular en las edades anteriormente mencionadas. A los 14 d.g. no existió un efecto positivo en la proliferación celular, el grupo control mostró un porcentaje de proliferación del 63.05%, mientras que el grupo experimental tuvo un nivel de proliferación del 36.94 % (Fig. 23)

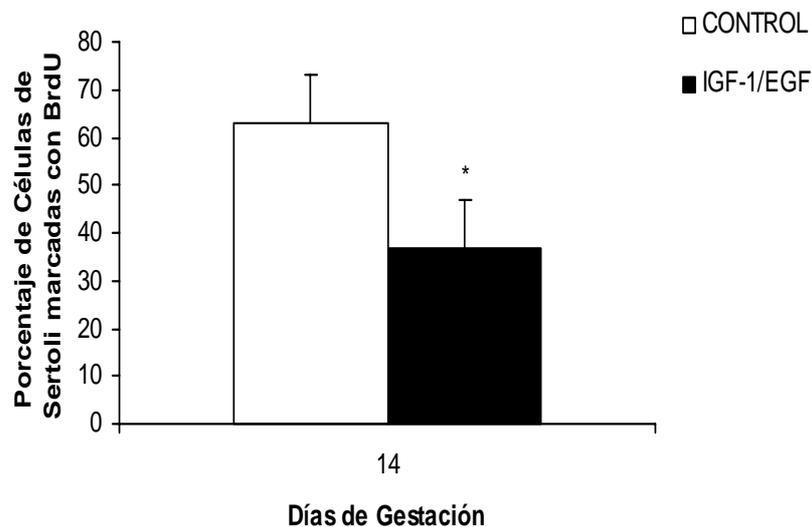


Fig. 23. Porcentaje de proliferación de las células de Sertoli de 18 d.g. tratadas con IGF-I/EGF. La gráfica muestra los resultados expresados en porcentaje. Se observó un mayor nivel de proliferación de las células del grupo control que las estimuladas con la combinación de estos factores. $n = 4$ (16 Experimentos por variable), $p < 0.05$.

El resultado mostrado en la figura 24, representa el efecto de esta combinación de factores, mostrando un ligero incremento en la proliferación de las células de Sertoli de 16 d.g. respecto a la última edad analizada (14 d.g. Fig. 14.12). En este caso, el grupo control muestra un porcentaje de proliferación del 52.35% y el grupo experimental tuvo un porcentaje de 48.64 %. Aunque exista un incremento en los niveles de proliferación del grupo experimental los resultados continúan mostrándose no significativos.

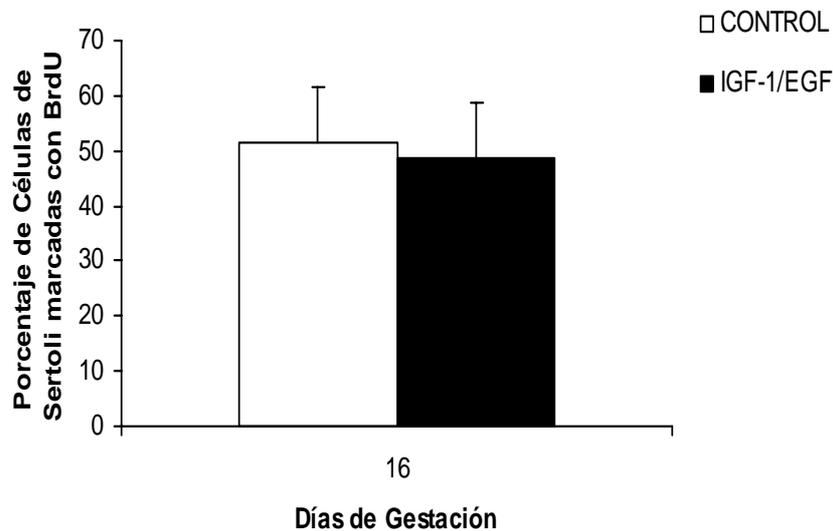


Fig. 24. Porcentaje de proliferación de las Células de Sertoli de 16 d.g. tratadas con IGF-I/EGF. La gráfica muestra los resultados expresados en porcentaje. Se observa un ligero mayor nivel de proliferación de las células del grupo control que las estimuladas con la combinación de estos factores.

n =4 (16 Experimentos por variable), $p < 0.05$.

En este último caso (Fig. 25), se muestran los resultados obtenidos cuando las células de Sertoli fueron estimuladas con la combinación de estos factores a los 18 d.g. El grupo control presentó niveles más bajos en el porcentaje de proliferación (43.17%), con respecto al grupo experimental, que tuvo un incremento positivo en el porcentaje de proliferación celular (56.82%), es decir, una diferencia significativa del 13.65% entre el grupo control y el experimental.

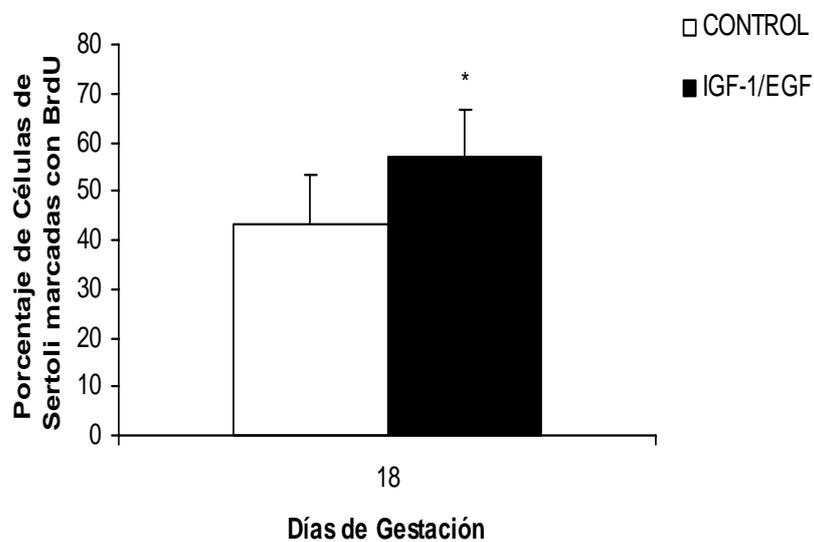


Fig. 25. Porcentaje de proliferación de las Células de Sertoli de 18 d.g. tratadas con IGF-I/EGF. La gráfica muestra los resultados expresados en porcentaje. Se observó un menor nivel de proliferación de las células del grupo control con respecto a las estimuladas con la combinación de estos factores. $n = 4$ (16 Experimentos por variable), $* p < 0.05$.

Comportamiento del efecto de ambos factores (IGF-I/EGF) en la proliferación celular las edades críticas mencionadas

Para el caso de la combinación de estos dos factores utilizados de manera contigua como posibles efectores de la proliferación celular se obtuvieron los siguientes resultados, mostrados de manera integral, a lo largo de las tres etapas críticas del desarrollo embrionario. En este caso, se observó un efecto similar al producido por el EGF, es decir, también se observó un comportamiento que podría describirse como gradual. Esto es descrito debido a que a los 14 d.g. no se observa un porcentaje de proliferación mayor al control, mientras que a los 16 d.g., comienza a notarse un incremento significativo en la proliferación con respecto al grupo de la edad anterior, aunque, continua siendo menor al control y, por lo tanto, no es significativa con respecto a su grupo control (16 d.g.). Por último, a los 18 d.g. los niveles de proliferación se han incrementado hasta el punto de superar el porcentaje alcanzado por el grupo control, es a esta edad cuando se alcanza el máximo nivel de proliferación y de una manera significativa, (con respecto a su propio grupo control y con respecto al grupo de la edad anterior) como se observa en la figura 26.

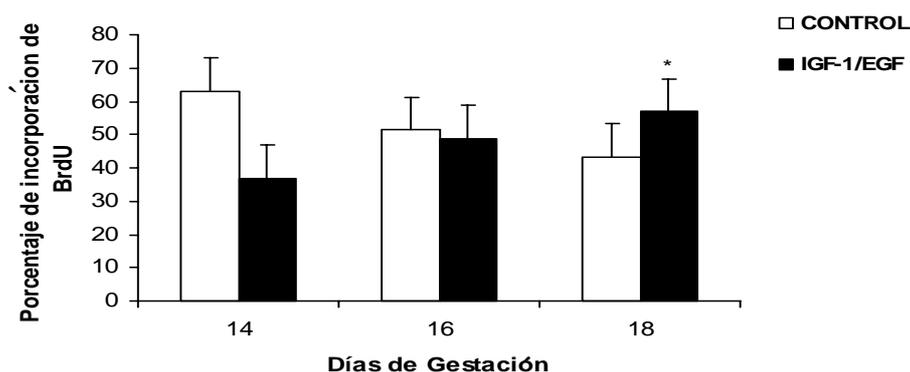


Fig. 26. Porcentaje de proliferación de las células de Sertoli tratadas con el IGF-I/EGF a lo largo de las fases críticas del desarrollo embrionario. Se observa un efecto gradual en la proliferación celular debido al estímulo ocasionado por la combinación de estos dos factores. * $p < 0.05$.

6. Relación del efecto del IGF-I, EGF e IGF-I/EGF en la proliferación de las células de Sertoli

A continuación se muestra el efecto de cada uno de los factores de transcripción y su combinación por cada una de las edades analizadas. Se observó que a los 14 d.g. ninguno de los factores, o la combinación de éstos, tuvo un efecto positivo en la proliferación celular. Los tres grupos experimentales (IGF, EGF, IGF-I/EGF) se mantuvieron con un porcentaje de proliferación por debajo del nivel de proliferación de los grupos controles (Fig.27)

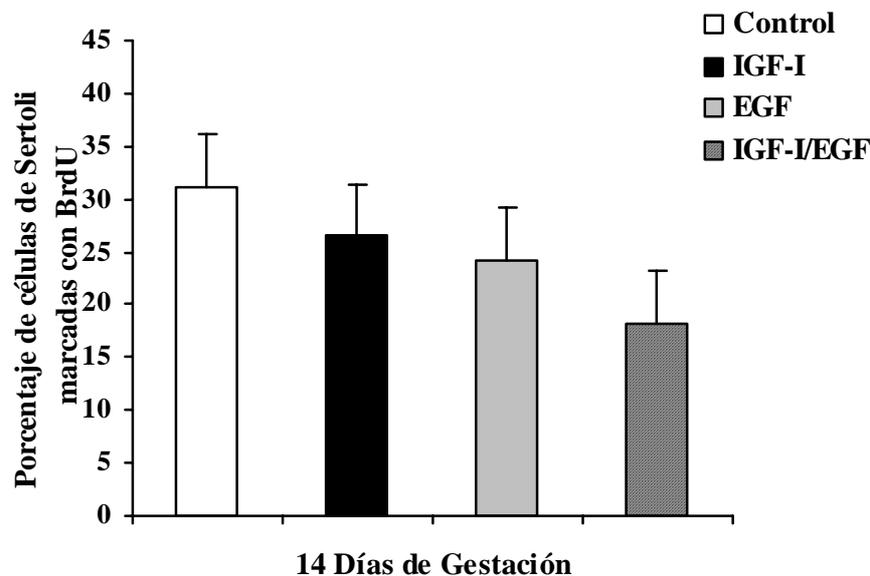


Fig. 27. Porcentaje de proliferación celular por efecto de IGF-1, EGF e IGF-1/EGF en las células de Sertoli de ratón (14 d.g.). La gráfica muestra el promedio de 4 experimentos por variable y el porcentaje de error de 5%.

El siguiente caso, muestra el comportamiento de cada uno de los factores a los 16 d. g. (Fig. 28), se observó que el IGF-I es el mayor inductor de la división celular, mientras que el EGF, también ocasionó un efecto positivo menor que el IGF-I en la proliferación de las Células de Sertoli, y la combinación de ambos no produjo un efecto positivo en la proliferación celular.

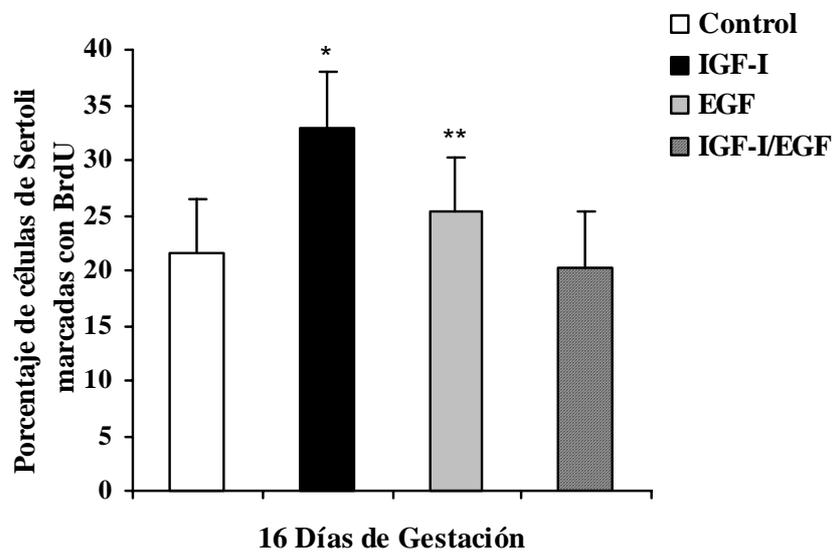


Fig. 28 Proliferación celular por efecto de IGF-1, EGF e IGF-1/EGF en las células de Sertoli de ratón (14 d.g.). La gráfica muestra el promedio de 4 experimentos por variable y el porcentaje de error de 5%, * p, ** p, t-student $p < 0.05$.

Por último, se muestran los resultados obtenidos para los experimentos a los 18 d. g., a esta edad, el principal inductor de la proliferación celular fue el EGF, seguido de la combinación de los factores y por último el IGF-I (Fig 29).

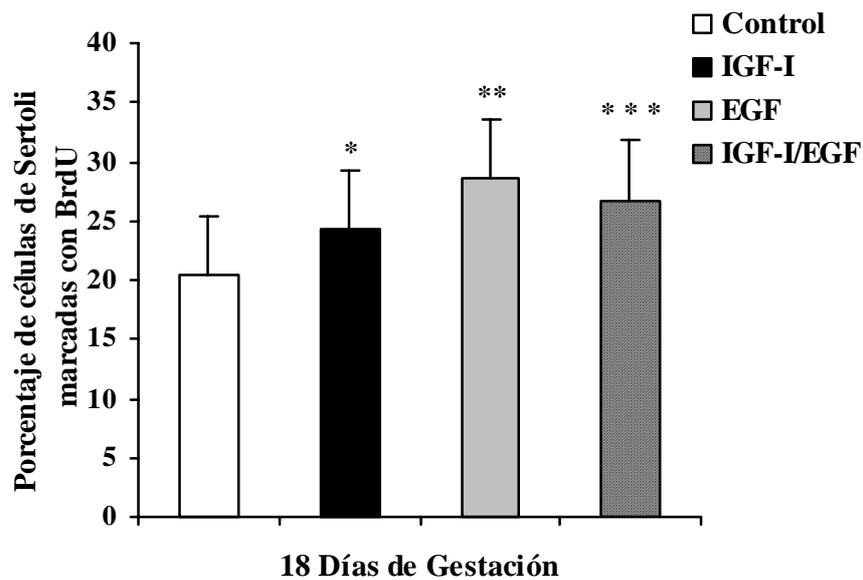


Fig. 29 Proliferación celular por efecto de IGF-1, EGF e IGF-1/EGF en las células de Sertoli de ratón (14 d.g.). La gráfica muestra el promedio de 4 experimentos por variable y el porcentaje de error de 5%, * p, ** p, *** p, t-student $p < 0.05$.

VII. Discusión

En este trabajo de investigación se determinó el efecto del IGF-I, EGF y el efecto sinérgico de los factores en la proliferación de las células de Sertoli embrionarias del ratón *Mus musculus*. Este efecto se determinó utilizando BrdU, el cual es un análogo sintético de la timidina que se incorpora al DNA de las células cuando éstas se encuentran en la fase S del ciclo celular y, por lo tanto, nos da la posibilidad de observar la proliferación celular cuando se observan las células marcadas en un microscopio de fluorescencia (Dolbeare, 1994).

De acuerdo con los resultados obtenidos, el porcentaje de proliferación causado por IGF-I en las células marcadas es diferente a lo largo de las etapas críticas del desarrollo. Estos resultados plantean el hecho de que este factor tiene un efecto diferencial en cada una de las etapas de crecimiento. En el primer caso (etapa de crecimiento 14 d.g.) hay un efecto inhibitorio en la proliferación, los datos obtenidos muestran una diferencia de porcentajes entre el grupo control y el experimental. A los 16 d.g. se observó que la proliferación de las células de Sertoli estimuladas con este factor aumentaron significativamente con respecto al grupo control y al grupo de la edad anterior descrita (la diferencia a esta edad entre el grupo control y el grupo experimental es de 21.13%). A los 18 d.g. aunque se observó una reducción en los niveles de proliferación, se apreció que existe un efecto significativo en la regulación de la proliferación celular causado por la estimulación de las células de Sertoli con dicho factor de crecimiento, lo que sería un indicativo de una probable regulación negativa a causa de este factor de crecimiento a los 18 d.g. El análisis de estos resultados demuestra que el IGF-I no actúa como inductor de la división celular a edades tempranas del desarrollo testicular. Esto podría deberse a que durante el desarrollo embrionario, este factor es producido por las células de Sertoli, actuando como factor parácrino en las Células germinales, que son el principal sitio de acción del IGF-I, además, la IGF-IBP influencia las acciones del IGF-I y contribuye a la

interacción CGP's – Sertoli embrionarias influyendo también en la función de las células de Leydig (Skinner y Griswold, 2004). Es decir, estas acciones están siendo reguladas por el IGF-I en etapas más tempranas del desarrollo, esto podría ser un indicador de que el IGF-I a los 14 d.g. está regulando otras acciones de mayor importancia para la célula y no tiene como principal acción influir en la proliferación de las células de Sertoli. En edades más avanzadas del desarrollo embrionario, el IGF-I, actúa como factor mitogénico de las células de Sertoli embrionarias, lo que apoyaría investigaciones anteriores realizadas (Sara y Hall, 1990) en las que se determinó que el IGF-I actúa como factor de progresión celular de tipos celulares como: condrocitos, músculo liso, fibroblastos, adipocitos, espermatogonias y oligodendrocitos (Sara y Hall, 1990). además de actuar como factor mitogénico sobre una amplia variedad de tipos celulares como keratinocitos, osteoblastos, células musculares y células epiteliales mamarias (Rhoades, 1996). De esta manera, estos resultados plantean la posibilidad de que la acción del IGF-I sobre las células de Sertoli, actúe como regulador parácrino de la maduración y diferenciación de la células precursoras de los gametos. Taketo, en 1991, demostró que este factor no tiene el mismo efecto en gónadas diferenciadas (12 d.g.) *in vivo* y en cultivo. Por lo tanto, podríamos inducir que el resultado obtenido a los 14 d.g. es similar al obtenido por Taketo (1991), es decir, se trata de etapas tempranas en el desarrollo embrionario y, además, las células están siendo cultivadas. Sugerimos estudios posteriores en los que se analice el efecto de este factor *in vivo*, así como, experimentos en donde se cultive la gónada intacta para así demostrar cual es el verdadero efecto de este factor en etapas tempranas durante el desarrollo de la gónada masculino. Por otra parte, estos resultados demuestran que el IGF-I si actúa como efector de la proliferación celular a los 16 y 18 d.g. a diferencia de lo planteado por Roullier- Fabré (1998), en donde se dice que este factor solamente actúa como promotor de la diferenciación de las células productoras de hormonas sexuales. Además, estos resultados son

opuestos a los obtenidos por Roullier- Fabré, en 1998, en donde se descarta el papel del IGF-I como inductor de la proliferación a los 16 d.g. en la rata. Para este caso, es necesario resaltar que los resultados obtenidos en mi investigación coinciden a los propuestos por Villalpando y López- Olmos (2003), en donde se muestra que los periodos de expresión del IGF-I coinciden con los periodos de alta producción de 17α -hidroxiprogesterona a los 16 y 18 d.g. lo cual explicaría el aumento gradual de la acción del IGF-I sobre el proceso de diferenciación celular de las células de Sertoli durante el desarrollo embrionario.

Es posible que el IGF-1 induzca la expresión de genes como ciclinas que regulan la síntesis de DNA y de otros factores de transcripción relacionados también con el metabolismo gonadal u otras funciones en etapa embrionaria.

La acción biológica del IGF-I, ya sea parácrina o autócrinamente, está mediada a través de la unión a glicoproteínas de membrana que funcionan como receptores membranales con actividad tirosina-cinasa (IGF-IR). Para el caso de este factor, se han detectado pequeños niveles de expresión de mRNA desde los 12 d.g., lo que indicaría una supuesta ausencia de los receptores suficientes para que el IGF-I funcionara correctamente como estimulador de la proliferación celular, en etapas tempranas del desarrollo testicular embrionario, que, a diferencia de edades posteriores se observa una mayor proliferación probablemente debida a una mayor disponibilidad en el número de receptores a este factor. Por lo tanto, es necesario realizar experimentos para detectar y cuantificar el IGF-IR en las edades descritas y, de esta manera, correlacionar los datos obtenidos en este trabajo. Debido a los resultados obtenidos y a la discusión anterior, se rechaza parcialmente la hipótesis nula (H_0 =Existe efecto en la proliferación debido al estímulo de los factores de crecimiento, H_A =No existe ningún efecto en la proliferación celular causada por el estímulo de los factores de crecimiento).

Para el caso del EGF, los resultados muestran que el porcentaje de proliferación celular causado por este factor es diferente a lo largo de las etapas analizadas, es decir, al igual que el IGF-I, presenta un efecto diferencial durante estas etapas. En la primera etapa analizada (14 d.g.), no se observa un efecto mitogénico positivo en las células de Sertoli causado por la estimulación con el EGF. Se observó una diferencia en el porcentaje de proliferación celular entre el grupo control y el grupo experimental de -12.53%, Por lo tanto, es probable que a esta edad el EGF también este regulando de manera negativa la proliferación celular, tal como se observó cuando las células de Sertoli fueron estimuladas con el IGF-I a la misma edad. Para la siguiente etapa analizada (16 d.g.) los resultados muestran una diferencia significativa entre el grupo control y el experimental, dicha diferencia es de 8.13%, lo cual indica que en esta etapa del desarrollo, el EGF está actuando como inductor de la mitosis, viéndose reflejado al aumentar la proliferación celular. Este incremento en la proliferación continúa incrementándose hasta los 18 d.g., es decir, hasta la última etapa del desarrollo embrionario. En este caso, la diferencia entre el grupo control y el grupo estimulado con EGF se incrementa a 18.95 %, el doble de diferencia en el porcentaje mostrado en la etapa anterior. El uso de este factor como estimulante de la división celular, parecería comportarse de manera gradual a lo largo de las etapas de desarrollo analizadas, esto es debido a que el índice mitótico continúa incrementándose a diferencia del efecto causado por el IGF-I en donde se observó un incremento de proliferación a los 16 d.g. que posteriormente decayó a los 18 d.g. Se sabe que el EGF puede actuar como un potente mitógeno y agente anabólico de una amplia variedad de tejidos de origen ectodermal y endodermal (Pimentel, 1994), pero no se han realizado estudios para evaluar el efecto que tiene este factor de transcripción como potenciador del índice mitótico de las células gonadales (Sertoli) durante el desarrollo embrionario del ratón. Este cambio gradual en la proliferación de las células de Sertoli también puede deberse al

incremento en el número de receptores, pero es necesario realizar estudios para demostrar y cuantificar la presencia de la proteína del EGF, así como, de su receptor a lo largo del desarrollo embrionario y así confirmar los resultados obtenidos en este trabajo.

De esta manera, se demuestra que el EGF tiene importantes efectos en la función gonadal, en este caso, en la proliferación celular, estos datos concuerdan con los presentados por Verhoeven (1986), en donde se describió que el EGF también actúa como mitógeno y agente anabólico sobre una variedad de tejidos de origen ectodermal y endodermal (Pimentel, 1994). También es posible que el EGF induzca la expresión de genes como ciclinas que regulan la síntesis de DNA y de otros factores de transcripción relacionados también con el metabolismo gonadal u otras funciones en la etapa embrionaria. Por lo tanto, el EGF puede tener efectos estimulantes o inhibitorios sobre los procesos esteroidogénicos que ocurren en cultivos frescos de células de Sertoli de testículos de rata prepubertal y adulta. Por los resultados obtenidos es necesario rechazar parcialmente la hipótesis nula, debido, a que solamente se observa un incremento en la proliferación de las células de Sertoli a los 16 y 18 d.g. y, no en todas las edades mencionadas como se esperaba.

El efecto en la proliferación causado por la acción sinérgica de ambos factores no fue el esperado. Para este caso, se esperaba que se obtuviera como resultado un efecto sumatorio en la proliferación debido a los dos factores, por el contrario, sólo se observó un efecto positivo en el porcentaje de proliferación en la última edad analizada. Los resultados obtenidos a los 14 d.g., muestran una probable regulación negativa, debido a que la diferencia de porcentajes entre el grupo control y el experimental es del -26.11 %. Como ya se mencionó anteriormente, aunque a los 16 d.g. exista un incremento en el índice mitótico, no es suficiente para ser considerado como un efecto significativo, ya que los datos muestran una diferencia de valores porcentuales del -3.71 %: Por último, solamente a los 18 d.g. es cuando se observa una

diferencia significativa en los porcentajes de proliferación, dicha diferencia es de 13.65%. De acuerdo a Coppola (1994), se sugiere que se requiere un IGF-IR intacto para algunos de los efectos biológicos tanto del EGF como de otros factores de crecimiento. Se ha visto que cuando el receptor del EGF es sobreexpresado en fibroblastos de ratón con deficiencia de IGF-IR, el tratamiento sustitutivo con EGF no estimuló la síntesis de DNA ni la proliferación celular. Estos efectos se corrigieron con la adición de IGF-IR y el EGF ejerció su efecto biológico aún en ausencia de IGF-I. Stewart (1996), plantea que la acción del IGF-I puede ser modificada por señales de receptores de hormonas, por lo tanto, la estimulación de la fosforilación de la proteína cinasa activadora de mitosis y la entrada de calcio a la célula que induce el IGF-1 puede ser bloqueada por la toxina pertusis, implicando un papel de inhibición selectiva de la proteína G que regula la función del IGF-IR en el adulto. Lo anterior podría explicar el porqué no se obtuvieron los resultados esperados al usar ambos factores de transcripción como estimuladores de la proliferación celular. En este caso, de acuerdo a Coppola (1994) y Stewart (1996), es necesario que el IGF-IR no esté modificado o haya sido modificado por algún ligando compatible con este receptor, para que se dé un correcto funcionamiento del EGF, lo cual no era posible, debido a que en el medio también se encontraba el IGF-I y, probablemente, éste tenga mayor afinidad a su propio receptor (IGF-IR) que el EGF. De tal manera, se induce que el IGF-IR estaba siendo expresado por el IGF y no por el EGF. Así, se induce que a los 18 d.g. sí existe un efecto significativo en la proliferación, debido a que la gónada se encuentra mas desarrollada y, por lo tanto, las células de Sertoli tienen un mayor número de receptores libres, además, este efecto podría deberse a que en esta edad, las células de Sertoli hayan dejado de regular otras funciones que eran importantes durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, tales como la diferenciación y proliferación de otros tipos celulares que también son importantes para la formación de la

gónada. De igual manera, es necesario realizar estudios posteriores cuantitativos y cualitativos para determinar la proporción de receptores específicos para IGF-I y para EGF en las células de Sertoli embrionarias, así como para determinar su transición a lo largo de las etapas críticas del desarrollo embrionario.

VIII. Conclusiones

- Las células de Sertoli, al inicio del desarrollo (14 d.g.), no requieren del IGF-I o EGF para su crecimiento.
- El IGF-1 actúa como regulador de la proliferación de la célula de Sertoli en edades de 16 y 18 d.g.
- El EGF es un inductor de la proliferación de la célula de Sertoli a los 18 d.g. Aunque, a esta edad, este factor de crecimiento ejerce un efecto menor al IGF-I.
- La combinación de ambos factores IGF-1/EGF tiene un efecto sinérgico sobre las proliferación de la células de Sertoli de manera diferencial, el mayor efecto se observó a los 18 d. g.
- El efecto sinérgico de ambos factores de crecimiento sobre las células de Sertoli depende de la edad de desarrollo del embrión.

IX. Bibliografía

1. Adams IR, McLaren A, 2002. Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development*. 129(5):1155-64
2. Arango N, Lovell-Badge R, Behringer. 1999. "Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: In vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development". *Cell* 99:409-419.
3. Baxter R. 1991. "Circulating binding proteins for the insulin-like growth factors". *Trends Endocrinol. Metab* 4:91-96.
4. Behringer R. Finegold M. and Cate R. 1994. "Mullerian Inhibiting Substance function during mammalian sexual development". *Cell* 79: 415-425.
5. Boonstra J, Rijken P, Humbel B, Cremers F. Verkleij A, Henegouwen P. 1995. "The Epidermal Growth Factor". *Cell Biology International*. 19:413-430.
6. Brett R, Searle RF, Buler JN. 1999. "Up-regulation of natural killer cell cytotoxicity by interleukin-2: the effect of sex and parity". *Am J reprod immunol*. 41(5):356-9.
7. Capel B. 1998. Sex in the 90's: SRY and the switch to male pathway. *Annual Reviews In Physiology*. 60 497 – 523.
8. Carpenter G. Zengdegui J. 1986. "Epidermal growth factor, its receptor, and related proteins". *Exp Cell Res* 164:1-10.
9. Cervantes A. 2002. "Genética general manual de prácticas de laboratorio". Facultad de Química. UNAM Pág. 27-30.

10. Chuzel F, Clark AM, Avallet O, Saenz JM. 1996. "Transcriptional regulation of the lutropin/human choriogonadotropin receptor and three enzymes of steroidogenesis by growth factors in cultured pig Leydig cells. *Eur J Biochem* 239(1):8-16.
11. Clemmons DR, Busby WH, Arai T, Nam TJ, Clarke JB, Jones JI, Ankrapp DK. 1995. "Role of insulin-like growth factor binding protein in the control of IGF actions". *Prog Growth Factors Res.* 6(2-4):357-66. Review
12. Coppola D, Ferber A, Miura M, Sell C, D'Ambrosio C, Rubin R, Baserga R. 1994. "A functional insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the epidermal growth factor receptor". *Mol. Cell. Biol.* 14:4588-4595.
13. Corbin CJ, Graham-Lorence S, McPhaul M, Mason JI, Mendelson CR, Simpson ER. 1988. "Isolation of a full-length cDNA insert encoding human aromatase system cytochrome P-450 and its expression in nonsteroidogenic cells". *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (23):8948-52.
14. Daughaday WH, Rotwein P. 1989. "Insuline-like Growth Factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations" *Endocr Rev.* 10(1):68-91. Review.
15. D'Ercole AJ, Ye P, Calikoglu AS, Gutierrez- Ospina G. 1996. "The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system". *Mol Neurobiol* 13(3):227-55. Review.
16. Denley A, Bonython E, Booker G, Cosgrove L, Forbes B, Ward C, Wallace J. 2004. "Structural determinants for insulin-like growth factor II to insulin

- receptor (IR)-A, the Exon 11 minus isoform of the IR". *Mol Endocrinol* 18:2502-2512.
17. Dolbeare F, Selden JR. 1994. "Immunochemical quantitation of bromodeoxyuridine": application to cell-cycle kinetics. *Methods Cell Biol.* 41, 297-316 PN26429.
18. French-Constant C, Hollingsworth A, Heasman J, Wylie CC. 1991. "Response to fibronectin of mouse primordial germ cells before, during and after migration". *Development.* 113(4):1365-73.
19. Froesch ER, Zapf J. 1985. "Insulin-like growth factors and insulin: comparative aspects". *Diabetologia* 28(8):485-93.
20. Gan BS, Hollenberg MD. 1989. "Autoradiographic localization of binding sites for epidermal growth factor-urogastrone (EGF-URO) in coronary arteries". *Eur J Pharmacol* 167(3):407-10.
21. Gilbert, SF. 2000. "Developmental Biology". 6th Ed. *Sinauer Associates, Inc. Publ.*
22. Gilbert SF. 2005. "*Biología del desarrollo*". 7^a ed. *Editorial Médica Panamericana.* Buenos Aires Cap. 17, Pág. 585-614.
23. Giudice LC, Dsupin BA, Irwin JC. 1992. "Steroid and peptide regulation of insulin-like growth factor-binding proteins secreted by human endometrial stromal cells is dependent on stromal differentiation". *J Clin Endocrinol Metab* 75(5):1235-41.
24. Godin I, Wylie C, Heasman J. 1990. "Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture". *Development* 108(2):357-63.

25. Godin I, Wylie CC. 1991. "TGF beta 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture". *Development* 113(4):1451-7.
26. Hansson HA, Billig H, Isgaard J. 1989. "Insulin-like growth factor I in the developing and mature rat testis: immunohistochemical aspects". *Biol Reprod* 40(6):1321-8.
27. Harley VR 2003. "The molecular action of testis-determining factors SRY and SOX9. In: The genetics and biology of sex determination". West Sussex, UK: Jhon Wiley and Sons Ltd. *Novartis foundation Symposium*. 244:57-66
28. Haqq CM, King CY, Ukiyama E, Falsafi S, Haqq TN, Donahoe PK & Weiss MA. 1994. "Molecular basis of mammalian sexual determination: activation of Mullerian inhibiting substance gene expression by SRY". *Science* 266 1494–1500.
29. Hiort O. 2000. "The molecular basis of male sexual differentiation". *Eur J Endocrinol*. Feb;142(2):101-10.
30. Karl PI. 1995. "Insulin-like growth factor-1 stimulates amino acid uptake by the cultured human placental" *trophoblast*. *J Cell Physiol* 165(1):83-8.
31. Karl J, Capel B. 1995. "Three-dimensional structure of the developing mouse genital ridge". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 350:235-242.
32. Karl J, Capel B. 1998. "Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium". *Dev Biol* 203(2):323-33.
33. Koopman P, Munsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R. 1990. "Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation". *Nature* 348:450–452

34. Koopman P. 1999. “Sry and Sox9: mammalian testis-determining genes” *Cell Mol Life Sci* 55:839-856.
35. Lewin B. 2001 “Genes”, Editorial Marbán, Madrid España, Cap. 27, Pág. 835-864.
36. Lim HN, Hawkins JR. 1998. “Genetic control of gonadal differentiation”. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12(1):1-16. Review.
37. McLaren A, Southee D. 1997. “Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis”. *Dev Biol.* 187(1):107-13.
38. Mathews C, Van Holde K, Ahern K. 2002, “Bioquímica”. Pearson Educación. Madrid, Pág. 774-778.
39. Merchant-Larios H, 1984, “Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis”. In: ultrastructure of reproduction, *Ed. Martinus Nijhoff Publ.* Chap. 3, 19 – 30.
40. Merchant H. 2004. “El sexo gonadal”. *Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas*, UNAM; 451-460.
41. Nebert DW, Gonzalez FJ. 1987. “P450 genes: structure, evolution, and regulation”. *Annu Rev Biochem* 56:945-93. Review.
42. Ong J, Yamashita S, Melmed S. 1987. “Insulin-like growth factor I induces c-fos messenger ribonucleic acid in L6 rat skeletal muscle cells”. *Endocrinology* 120(1):353-7.
43. Parker K. Schimmer B. y Schedl A. 1999. “Genes essential for early events in gonadal development”. *Cell. Mol. Life Sci.* 55:831-838.
44. Pask A, Graves JA. 1997. “Sex chromosomes and sex-determining genes: insights from marsupials and monotremes”. *Cell Mol Life Sci* 55(6-7):864-75.

45. Pimentel E. 1994. *“Handbook of Growth Factors, Vol II: Peptide Growth Factors”*.
Cáp. 3, Pág. 97 a 120.
46. Powell DR, Lee PD, Chang D, Liu F, Hintz RL. 1987. “Antiserum developed for the E peptide region of insulin-like growth factor IA prohormone recognizes a serum protein by both immunoblot and radioimmunoassay”. *J Clin Endocrinol Metab* 65(5):868-75.
47. Rechler M, Nissley S. 1985. “The nature and regulation of the receptors for insulin-like growth factors”. *Annu Rev Physiol* 47:425.
48. Rhoades R, Tanner G. 1996. *“Fisiología Médica”*. Ed. Elsevier Masson por *Fisiología de la reproducción*.
49. Stewart C. Rotwein P. 1996. “Growth, Differentiation, and Survival: Multiple Physiological Functions for Insulin-Like Growth Factors”. *Physiological Reviews* 76(4):1005-1026.
50. Rimini R, Pontiggia A, Spada F, Ferrari S, Harley VR, Goodfellow PN, Bianchi ME. 1995. “Interaction of normal and mutant SRY proteins with DNA”. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 350(1333):215-20.
51. Rosenfeld RG, Pham H, Oh Y, Lamson G, Giudice LC. 1990. “Identification of insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGF-BP-2) and a low molecular weight IGF-BP in human seminal plasma”. *J Clin Endocrinol Metab* 70(2):551.
52. Rouiller-Fabre V. Lecref L. Gautier C. Saez J. Habert R. 1998. “Expresión and effect of Insulin-like growth factor I on rat fetal Leydig cell and differentiation”. *Endocrinology* 139:2926-2934.
53. Ruíz – Durá MF. 1988. “Fundamentos de embriología y fisiología de la reproducción”. *Universidad Nacional Autónoma de México. Omega*. 2: 25-41.

54. Sara VR, Hall K. 1990. "Insulin-like growth factors and their binding proteins". *Physiol Rev* 70(3):591-614. Review.
55. Schalch D, Reismann D, Emler C, Humbel R, Li CH, Peters M, Lau E. 1984. "Insulin-like growth factor I/somatomedin C (IGF-I/Sm C): comparison of natural, solid phase synthetic and recombinant DNA analog peptides in two radioligand assays". *Endocrinology* 115(6):2490-2.
56. Schmahl J, Eicher EM, Washburn LL, Capel B. 2000. "Sry induces cell proliferation in the Mouse gonad". *Development* 127:65-73.
57. Shen WH, Moore CC, Ikeda Y, Parker KL, Ingraham HA. 1994, "Nuclearreceptor steroidogenic factor 1 regulates the mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade". *Cell* 77(5):651-61.
58. Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R. 1998. "Dax 1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination". *Nature* 391:761-767.
59. Swain A, Lovell-Badge R, 1999. "Mammalian sex determination: a molecular drama". *Genes Dev* 13:755-767.
60. Schmahl J, Eicher EM, Washburn LL, Capel B. 2000. "Sry induces cell proliferation in the mouse gonad". *Development* 127(1):65-73.
61. Soley M. Hollenberg M. 1987. "Epidermal growth factor (urogastrone)-stimulated gluconeogenesis in isolated mouse hepatocytes". *Arch Biochem Biophys* 255:136.
62. Taketo T, Saeed J, Roberge S, Matsuo N, Koide SS. 1991. "Regulation of testicular differentiation and testosterone production in the fetal mouse gonad in vitro". *J Steroid Biochem Mol Biol* 38(4):523-31.
63. Taylor J, Mitchell W, Cohen S. 1972. "Epidermal growth factor: physical and chemical properties". *J. Biol Chem* 247:5928-5934.

64. Thissen JP, Pucilowska JB, Underwood LE. 1994. "Differential regulation of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein-1 messenger ribonucleic acids by amino acid availability and growth hormone in rat hepatocyte primary culture". *Endocrinology* 134(3):1570-6.
65. Verhoven G, Cailleau J, 1986. "Stimulatory effects of Epidermal growth factor on steroidogenesis in Leydig cells". *Mol Cell Endocrinol* 47: 99.
66. Villalpando I. 2001. "Péptidos en la biología del desarrollo de los mamíferos". In: Javier Velásquez Moctezuma (Ed). *Biología de la Reproducción II. UAM-Puis*. Pág. 121-143.(a)
67. Villalpando I. 2001. "Sinfonía de genes gonadales", *Ciencia y Desarrollo*. 160 pp. 32 – 41.(b)
68. Villalpando I. López-Olmos V. 2003 "Insulin-like growth factor I (IGF-I) regulates endocrine activity of the embryonic testis in the mouse". *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 86:151-158.
69. Wang Q, Wu Y, Aerts T, Slegers H, Clauwaert J. 1999. "Expresion og IGF-I and IGF-II receptors in rat C6 glioma cells as a function of the growth phase" *Cell Physiol Biochem*. 8(6):304-13.
70. Werner H, Stannard B, Bach MA, Roberts CT Jr, LeRoith D. 1991 "Regulation of insulin-like growth factor I receptor gene expression in normal and pathological states". *Adv Exp Med Biol* 293:263-72. Review.
71. Werner P, Kawashima E, Reid J, Hussy N, Lundstrom K, Buell G, Humbert Y, Jones KA. 1994. "Organization of the mouse 5-HT3 receptor gene and functional expression of two splice variants". *Brain Res Mol Brain Res* 26(1-2):233-41.

72. Williams JA, Bailey A, Humbel R, Goldfine ID. 1984. "Insulin-like growth factors bind to specific receptors in isolated pancreatic acini". *Am J Physiol* 246(1 Pt 1):G96-9.
73. Whitfield LS, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. 1993. "Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene SRY". *Nature*. 19; 364(6439):713-5.
74. Yao H, Capel B. 2005. "Temperature, Genes and Sex: a Comparative View of Sex Determination in *Trachemys scripta* and *Mus musculus*". *J Biochem* 138:5-12.
75. Yarden Y, Schelessinger J. 1987. "Self-phosphorylation of Epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation". *Biochemistry* 26:1434. (a)
76. Yarden Y. Schelessinger J. 1987. "Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor". *Biochemistry* 26:1443. (b).