

**Inmunolocalización del factor de crecimiento
similar a la insulina (IGF-I) y su receptor
(IGF-Ir) en el tracto reproductor del verraco**

Róger Horacio Fernández Hernández

Zamorano

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria
Diciembre, 2005

Inmunolocalización del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) y su receptor (IGF-Ir) en el tracto reproductor del verraco

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el grado
Académico de Licenciatura

presentado por

Róger Horacio Fernández Hernández

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2005

El autor concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Róger Horacio Fernández Hernández

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2005

Inmunolocalización del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) y su receptor (IGF-Ir) en el tracto reproductor del verraco

Presentado por:

Róger Horacio Fernández Hernández

Aprobado por:

John Jairo Hincapié, Ph.D.
Asesor Principal

John Jairo Hincapié, Ph.D.
Coordinador Área Temática
Zootecnia

Isidro Matamoros, Ph.D.
Asesor

Abelino Pitty, Ph.D.
Director interino
Carrera Ciencia y Producción
Agropecuaria

José Félix Pérez Gutiérrez, Ph.D.
Asesor

George Pilz, Ph.D.
Decano Académico

Jorge Oliva Hernández, Ph.D.
Asesor

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

A Dios.

A mi abuelito Gabriel Abraham Hernández Lacayo (Q.E.P.D) por siempre estar a mi lado.

A mi abuelita Aura Moreno de Hernández por ser como una madre y por el continuo apoyo en mi formación personal y profesional.

A mis padres Róger Eduardo Fernández Martínez y María Lissette Hernández Moreno por sus consejos y dedicación.

A mi hermano Gabriel Abraham Fernández Hernández por inspirarme a lograr mis metas.

A mis tíos Orlando Amaris y Doris Hernández por ofrecerme una familia llena de cariño.

A mi prima Aura Amira Amaris por sus travesuras de niña.

A mi tierra Nicaragua.

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mi familia por todo su apoyo.

A Zamorano por enseñarme más que una carrera profesional.

A mi asesor el Dr. John Jairo Hincapié por la oportunidad brindada de trabajar con él y por el apoyo continuo en el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Isidro Matamoros por su aporte a la finalización de este proyecto y por la grata experiencia de juzgar ganado a su lado.

Al Dr. José Félix Pérez por brindarme la oportunidad de realizar mi práctica profesional en el laboratorio de reproducción animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, España y por permitirme el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Jorge Oliva por su apoyo en la realización de este proyecto y sus interesantes conversaciones.

A Udenes Castillo, Denis Martínez, Carlos Espinoza, Mauricio Salazar, Marvin Escorcía, Rommel Méndez, Darío Chávez, Mario García, Oscar Perla, Ismael Portillo, José Castillo, Indira Villanueva, Judith Ortez, Thelma Brenes, Julia Calderón, Lorena Quispe y Gabriela Ronquillo por su amistad durante estos años.

A mis colegas por los buenos momentos.

RESUMEN

Fernández, R. 2005. Inmunolocalización del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) y su receptor (IGF-Ir) en el tracto reproductor del verraco. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 31 p.

Los procesos reproductivos de los machos requieren de la producción de células espermáticas competentes. Este proceso incluye la proliferación y diferenciación de células espermáticas en el tejido testicular. Los factores de crecimiento interactúan con receptores localizados en la membrana celular, comunicándose con segundos mensajeros a través de cambios conformacionales que inducen la autofosforilación de residuos de tirosina localizados sobre el dominio intracelular del receptor. Aunque inicialmente se les asoció con la estimulación de la proliferación celular, actualmente se ha documentado que participan en múltiples funciones, entre las cuales se encuentran: la regulación del ciclo celular, la estimulación de la migración celular, el transporte de aminoácidos y la síntesis de ácido ribonucleico (ARN) y proteínas, la introducción y la utilización de glucosa. Además, por estar localizados en forma ubicua, se ha sugerido que estos factores tienen un papel en la supervivencia celular y en la regulación de la homeóstasis del organismo. En el caso particular del verraco, estos estudios podrían ser de utilidad en un futuro para mejorar la eficacia de las biotecnologías reproductivas ya que permiten un mayor control sobre la función espermática. El objetivo principal del estudio fue localizar el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) y su receptor (IGF-Ir) en el tracto reproductor del verraco mediante técnicas inmunológicas utilizando anticuerpos específicos. Para realizar este estudio se utilizó tejido procedente del tracto reproductivo (testículo) de 10 verracos analizando diversos grupos celulares del testículo (células peritubulares, de Sertoli, germinales y de Leydig). El IGF-I y su receptor IGF-Ir se expresan en el tejido testicular del verraco. Para el IGF-I y su receptor IGF-Ir el porcentaje de células en los distintos grupos celulares que se expresaron fue siempre superior al 65%. El sistema IGF-I/IGF-Ir parece desempeñar un papel importante en la regulación de la fisiología testicular del verraco.

Palabras clave: Porcinos, técnicas inmunológicas, anticuerpos, peritubulares, germinales, de Leydig, de Sertoli, espermátogenesis.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Página de firmas.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Resumen.....	vi
Contenido.....	vii
Índice de tablas.....	ix
Índice de figuras.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
2.1 LOCALIZACIÓN.....	4
2.2 MATERIAL BIOLÓGICO.....	4
2.3 RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE TEJIDOS PARA EL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.....	4
2.4 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL TRACTO GENITAL.....	5
2.4.1 Preparación de muestras.....	5
2.4.2 Tinción y valoración de tejidos.....	5
2.4.3 Valoración de muestras.....	6
2.5 VARIABLES A MEDIR.....	6
2.6 REACTIVOS, DISOLUCIONES Y MEDIOS.....	7
2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	9
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
3.1 INMUNOLocalización DE IGF-I.....	10
3.2 INMUNOLocalización DE IGF-Ir.....	11
4. CONCLUSIONES.....	15

5. RECOMENDACIONES..... 16

6. BIBLIOGRAFÍA..... 17

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Escala de puntuaciones utilizada para la valoración inmunohistoquímica.....	7
2. Composición de la disolución citrato – formaldehído.....	7
3. Composición de la disolución de suero fisiológico formulado.....	7
4. Composición de la disolución formaldehído tamponado al 10%....	8
5. Composición de la disolución paraformaldehído 0.2%.....	8
6. Composición del Tampón Fosfato Salino (PBS).....	8
7. Composición del Tampón Fosfato Tritón (PBT).....	8
8. Intensidad de tinción para IGF-I en el testículo del verraco.....	10
9. Intensidad de tinción para IGF-Ir en el testículo del verraco.....	11

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Tinción inmunohistoquímica para el IGF-I en el testículo del verraco.....	13
2. Tinción inmunohistoquímica para el IGF-Ir en el testículo del verraco.....	14

1. INTRODUCCIÓN

El objetivo principal de la porcicultura es la producción eficiente de carne magra para el consumidor y su economía depende en gran medida de su eficiencia reproductiva. El método habitual para la valoración del rendimiento reproductivo, que puede variar notablemente de una granja a otra, consiste en examinar el número de crías producidas por cerda al año. Este índice comprende dos componentes importantes: el tamaño y número de camadas producidas por año (Gordon 1997).

Con base en que la rentabilidad de la empresa porcina depende en gran parte del número de lechones destetados por cerda anualmente, las técnicas de reproducción controlada que mejoren las tasas de concepción, reduzcan la incidencia de mortalidad embrionaria, acorten el intervalo entre partos y mejoren la tasa de supervivencia de los lechones posiblemente presentarán un interés comercial notable (Gordon 1997).

Los procesos reproductivos de los machos requieren de la producción de células espermáticas competentes. Este proceso incluye la proliferación y diferenciación de células espermáticas en el tejido testicular, al igual que la participación de células apoptóticas. (Wagener *et al.* 2000).

Para que los espermatozoides puedan desempeñar su función han de experimentar una serie de cambios estructurales y funcionales. Estos cambios se inician con la espermatogénesis, donde los espermatozoides completan el proceso de maduración y adquieren su motilidad, y se completa en el tracto genital de la hembra, donde experimentan la capacitación y la reacción acrosómica, con lo que adquieren la capacidad fecundante (Hafez 2002; Hafez y Hafez 2002a). Por tal razón, para que los espermatozoides puedan fecundar al ovocito han de estar sometidos a distintos ambientes fisiológicos que se generan tanto en el tracto genital del macho, como en el tracto genital de la hembra.

El estudio de las señales que regulan los distintos contextos fisiológicos a los que se encuentra sometido el espermatozoide resulta fundamental para entender el proceso reproductivo. Estos mecanismos requieren la participación de hormonas como la testosterona que son producidos por las células de Leydig que se encarga de asegurar el desarrollo de las células germinales (Tapanainen *et al.* 1993; Thompson 1994).

Algunas de estas señales actúan vía endocrina, a gran distancia del sitio donde se producen y generalmente no lo hacen directamente sobre las células germinales. Tal es el caso de las gonadotropinas, que se generan en la pituitaria y actúan en el testículo.

La LH actúa sobre las células de Leydig mientras que la FSH lo hace sobre las de Sertoli, regulando la espermatogénesis. Sin embargo, para mantener la homeóstasis testicular, además de la comunicación endocrina, es necesario que se establezca una comunicación entre los distintos compartimientos que conforman el testículo. Estas comunicaciones ocurren entre las células de Leydig y las células de Sertoli, y entre las células de Sertoli y las células germinales (Oliva, 2005).

La comunicación entre los compartimientos del testículo se establece a través de señales que actúan en el ámbito local. En los últimos años, se han identificado y caracterizado diversos péptidos, nuevas señales, que poseen una vida media corta y actúan sobre las mismas células que las producen o sobre células cercanas, regulando procesos de división, supervivencia y diferenciación celular, por lo que reciben el nombre genérico de factores de crecimiento.

Los factores de crecimiento son proteínas que tienen un peso molecular menor de 30 kDa que interactúan con receptores localizados en la membrana celular, comunicándose con segundos mensajeros a través de cambios conformacionales que inducen la autofosforilación de residuos de tirosina localizados sobre el dominio intracelular del receptor. Aunque inicialmente se les asoció con la estimulación de la proliferación celular, actualmente se ha documentado que participan en múltiples funciones, entre las cuales se encuentran: la regulación del ciclo celular, la estimulación de la migración celular, el transporte de aminoácidos y la síntesis de ácido ribonucleico (ARN) y proteínas, la introducción y la utilización de glucosa. Además, por estar localizados en forma ubicua, se ha sugerido que estos factores tienen un papel en la supervivencia celular y en la regulación de la homeóstasis del organismo (Carpenter 1987; Bellvé y Zheng 1989; Gnessi *et al.* 1997; Hill 1989).

Los factores de crecimiento han sido clasificados en familias, considerando para ello sus características estructurales y efectos biológicos. La familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF), la del factor de crecimiento fibroblástico (FGF), la del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), la del factor transformante de crecimiento β (TGF- β) y los factores de crecimiento hematopoyéticos (Hill 1989; Hafez y Hafez 2002).

Muchos de estos factores de crecimiento han sido aislados del tejido testicular de diferentes especies y la evidencia sugiere que estos factores desempeñan un rol en el control de la espermatogénesis (Lamb 1993; Spiteri-Grech y Nieschlag 1993; Kierszenbaum 1994; Smith y Conti 1996; Schlatt *et al.* 1997).

El factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I y -II) es una proteína pequeña, estructuralmente relacionada con la proinsulina, que estimula crecimiento y diferenciación en una variedad de tejidos en los vertebrados (Stewart y Rotwein 1996; Werner y LeRoith 1996).

El IGF-I es de primaria importancia durante el crecimiento posnatal, mientras que el IGF-II es considerado un factor de crecimiento fetal. Además el IGF-I es principalmente producido por el hígado bajo el control de la hormona del crecimiento (GH) y condiciones nutricionales (Clemmons y Underwood 1991).

El IGF-I producido en el hígado es secretado a la circulación sanguínea y actúa en tejidos de un modo endocrino. Detrás del efecto endocrino, el IGF-I es también producido en muchos tejidos fuera del hígado y puede funcionar como un estimulador de crecimiento autocrino y/o paracrino (D'Ercole *et al.* 1984; Daughaday 1989).

Las acciones biológicas del IGF son mediadas por una familia de células superficiales receptoras que incluyen el receptor de insulina (IR) y los receptores del factor de crecimiento similar a la insulina del tipo I y II (IGF-Ir y el IGF-IIr respectivamente).

El IGF-I ejerce su acción principalmente en conexión con el IGF-Ir y en parte con el receptor de la insulina (IR). El receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-Ir) se encuentra constituido por subunidades α - y β -, las cuales se encuentran entrelazadas por enlaces disulfuros en una configuración β - α - α - β en el receptor. La subunidad α es completamente extracelular, mientras que la subunidad β tiene contacto con la membrana y la porción intracelular tiene la actividad tirosina kinasa intrínseca (Bassas *et al.* 1988; Bondy *et al.* 1990; Lin *et al.* 1986; Handelsman *et al.* 1985; Giorgetti *et al.* 1993). También las proteínas conectores del IGF (IGFBPs) son importantes moduladores de la acción biológica del IGF (Clemmons 1991).

Los estudios realizados hasta el momento, referentes a la presencia y efectos del IGF en el aparato reproductor del macho, son escasos, dispersos y en ocasiones contradictorios. Por ello, y debido a la importancia que pueden tener estos factores en la regulación de los procesos reproductivos, es necesario profundizar en su conocimiento. En el caso particular del verraco, estos estudios podrían ser de utilidad en un futuro para mejorar la eficacia de las biotecnologías reproductivas ya que nos permiten un mayor control sobre la función espermática.

Por lo anterior se decidió realizar una investigación, la cual tuvo como objetivo localizar el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) y su receptor (IGF-Ir) en el tracto reproductor del verraco mediante técnicas inmunológicas utilizando anticuerpos específicos y como objetivos específicos la cuantificación de intensidad y proporción de tinción en diversos grupos celulares del testículo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LOCALIZACIÓN

El estudio se realizó entre los meses de Enero y Abril de 2005 en el Laboratorio de Reproducción del Hospital Clínico Veterinario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, España.

2.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Para realizar este estudio se utilizó tejido procedente del tracto reproductivo (testículo) de 10 verracos, que no presentaban ninguna alteración externa en su tracto genital. Los verracos tenían aproximadamente 5 meses de edad, un peso entre 100 y 110 kg y fueron sacrificados en un matadero industrial (GYPISA, Pozuelo de Alarcón, Madrid), de acuerdo con la normativa vigente, en política de mataderos, de la Comunidad Autónoma de Madrid.

2.3 RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE TEJIDOS PARA EL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Para realizar este estudio se recogieron 10 testículos que procedían de animales diferentes. La recolección se realizó inmediatamente después del sacrificio. En el testículo, se practicaron seis incisiones longitudinales.

Una vez que se tallaron las muestras, se fijaron inmediatamente en una disolución de formaldehído tamponado al 10%, a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, se incluyeron en parafina sintética (Vogel Histo-Com[®], Germany), utilizando para ello un procesador automático y se elaboraron bloques, que fueron seccionados con un micrótopo en cortes de cinco μm de grosor.

Las secciones de cinco μm se montaron en portaobjetos tratados previamente en Vectabond[®] (Vector Labs., Burlingame, CA, EE. UU.) para incrementar el grado de adhesión al tejido. En cada uno de los portaobjetos se montaron dos secciones, una correspondiente a la muestra a estudiar, y otra al control negativo. Finalmente, se secaron a una temperatura de 37 °C, durante tres horas y se almacenaron los portaobjetos hasta su utilización.

2.4 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL TRACTO GENITAL

Para localizar el IGF y el dominio extracelular del receptor IGF se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas, y se emplearon los siguientes anticuerpos primarios monoclonales (mc) y policlonales (pc):

Anticuerpo específico para el IGF-Ir (anti-IGF-Ir-Ab-1/mc), Mouse Monoclonal Antibody (NeoMarkers, LabVision Corporation, Westinghouse, CA, USA).

Anticuerpo policlonar de conejo específico para IGF (anti-IGF-I/pc), Rabbit Policlonal Antibody (NeoMarkers, LabVision Corporation, Westinghouse, CA, USA).

2.4.1 Preparación de muestras

En cada uno de los portaobjetos se montaron dos secciones, una correspondía al tejido a estudiar, y otra al control negativo. Los controles negativos procedían del mismo tejido y fueron tratados del mismo modo que las muestras a estudiar, excepto que no se les añadió anticuerpo primario, siendo substituido por un tampón de bloqueo (PBS con 1% de suero normal de cabra; Vectastain Elite ABC Rabbit IgG Kit, Vector Labs, Burlingame, CA, EE. UU.).

2.4.2 Tinción y valoración de los tejidos

Los tejidos montados se sometieron a un proceso de desparafinación en xilol (dos inmersiones de cinco minutos cada una en xilol) y rehidratación en concentraciones decrecientes de alcoholes, dos inmersiones de cinco minutos en cada una de las siguientes concentraciones de alcohol, 100%, 95% y 70%, seguido de inmersión en agua Milli-Q durante cinco minutos.

Posteriormente, se lavaron por inmersión en Tampón Fosfato Tritón (PBT), durante 5 minutos. Una vez lavados en PBT, se secó la región que rodeaba al tejido, empleando un bastoncillo de algodón, y se dibujó, con un lápiz hidrofóbico (Pap – pen, Zymed, San Francisco, CA, EE. UU.), una línea hidrofóbica en torno a las secciones. Las secciones se preincubaron durante 20 minutos en tampón de bloqueo (Vectastain ABC Kit, Vector Labs). Posteriormente, las muestras se lavaron con PBT, durante 5 minutos y se incubaron con sus respectivos anticuerpos primarios. La incubación con los anticuerpos primarios se realizó, en todos los casos, durante 90 minutos, en una cámara húmeda y oscura, a temperatura ambiente.

En el caso particular de los anticuerpos monoclonales, Ab-1 (Clone 24-31) Mouse monoclonal Antibody (NeoMarkers, LabVision Corporation, Westinghouse, CA, USA), previamente al tratamiento con el anticuerpo primario, y con el fin de desenmascarar los antígenos y reducir interferencias, las muestras se sumergieron en una solución de citrato sódico en agua bidestilada, al 0.58 % (p/v), pH 6, y se sometieron, durante 30 minutos, a la acción de alta presión y temperatura, para lo que se utilizó una olla de presión.

Los anticuerpos primarios policlonales se detectaron utilizando un anticuerpo secundario biotinilado, anti-IgG-conejo, procedente de cabra, unido a un complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain ABC Kit, Vector Labs). Los anticuerpos primarios monoclonales se detectaron incubando con un anticuerpo secundario biotinilado, anti-IgG-ratón (Vectastain ABC Kit, Vector Labs), procedente de cabra, también unido a un complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vector Labs).

Tras la incubación con el anticuerpo primario, éste se retiró de las muestras, que se lavaron a continuación con PBT, y se añadió el anticuerpo secundario hasta recubrir totalmente al tejido (150 µl). Las muestras se incubaron durante 60 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.

La actividad peroxidasa se detectó con 3-amino-9-etilcarbazole (AEC) (Vector Labs), que tiñe de color rojizo las células que resultan positivas. Para la tinción, se retiró primero el anticuerpo secundario, las muestras se lavaron con PBT y se incubaron a temperatura ambiente con la preparación de AEC durante un tiempo que varió en factor del estudio (IGF 15 min; IGFr 30 min). Una vez teñidas, las muestras se montaron con un cubreobjeto utilizando medio de montar acuoso (Aquatex[®] Merck).

2.4.3 Valoración de las muestras

La expresión del IGF e IGFr fue valorada de forma subjetiva bajo microscopio óptico a 100, 400 y 1000 X. En el testículo se valoraron los túbulos germinales (células peritubulares, células de Sertoli y epitelio germinal) e intersticio testicular (células de Leydig) (Algaba 1994).

En cada valoración, se analizaron cuatro o más campos distintos a 100, 400 y 1000 X y se fotografiaron los campos más representativos. Los grupos celulares que presentaban tinción positiva fueron valorados a 400X en función de la intensidad de la tinción y de la proporción de tejido teñido (Tabla 1), es decir, del porcentaje de células teñidas en cada campo analizado, de acuerdo a una puntuación subjetiva (Vermeirsch *et al.* 2001).

2.5 VARIABLES A MEDIR

Se determinó la intensidad y proporción de tinción en diversos grupos celulares del testículo (células de Leydig, células de Sertoli, células peritubulares y epitelio germinal) (Tabla 1).

Tabla 1. Escala de puntuaciones utilizada para la valoración inmunohistoquímica

Intensidad con que se tiñe el grupo celular	Proporción de teñido en el grupo celular
0: sin tinción	0: no hay células positivas
1: tinción débil	1: < 1% de células teñidas
2: tinción moderada	2: 1 – 9% de células teñidas
3: tinción intensa	3: 10 – 32% de células teñidas
4: tinción muy intensa	4: 33 – 65% de células teñidas
	5: > 65% de células teñidas

Fuente: Vermeirsch *et al.* 2001.

2.6 REACTIVOS, DISOLUCIONES Y MEDIOS

Las sales utilizadas en la preparación de disoluciones y medios, así como los alcoholes comunes, procedieron de PANREAC Química S.A (Barcelona, España), y los reactivos de origen orgánico se obtuvieron de SIGMA Chemicals (St. Louis, MI, EE. UU.), excepto en los casos descritos en el texto.

Las Tablas 2, 3, 4, 5, 6 y 7 presentan las composiciones de las diferentes disoluciones y medios utilizados.

Tabla 2. Composición de la disolución citrato – formaldehído

Citrato sódico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	98.60 mM
Formaldehído (30 – 36%, p/v)	40 mL L ⁻¹
Agua destilada	hasta 1000 mL

p/v = peso/volumen

mM = milimolar

mL = mililitro

Tabla 3. Composición de la disolución de suero fisiológico formulado

NaCl	154 mM
Formaldehído (30 – 36%, p/v)	3 mL L ⁻¹
Agua destilada	hasta 1000 mL

p/v = peso/volumen

mM = milimolar

mL = mililitro

Tabla 4. Composición de la disolución formaldehído tamponado al 10%

Formaldehído (30 – 36%, p/v)	330 mL
Agua destilada	hasta 1000 mL

p/v = peso/volumen
mL = mililitro

Tabla 5. Composición de la disolución paraformaldehído 0.2%*

Paraformaldehído	66.6 mM
PBS	hasta 1000 mL

mM = milimolar
mL = mililitro
PBS = Tampón Fosfato Salino

*La solución se calienta a 70°C durante 30 minutos (aproximadamente) en una placa térmica y con ayuda de un agitador magnético se disuelve el paraformaldehído y tras enfriarse se ajusta el pH a 7,4.

Tabla 6. Composición del Tampón Fosfato Salino (PBS)

NaCl	136.89 mM
KCl	2.68 mM
Na ₂ HPO ₄	10.14 mM
KH ₂ PO ₄	1.76 mM

mM = milimolar
mL = mililitro
Ajustar pH a 7.2 – 7.3

Tabla 7. Composición del Tampón Fosfato Tritón (PBT)

Na ₂ HPO ₄	8.45 mM
KH ₂ PO ₄	1.47 mM
KCl	2.68 mM
NaCl	136.89 mM
Se disuelve y se ajusta el pH a 7.2 – 7.3	
Triton X – 100 ¹	3mL

mM = milimolar
mL = mililitro

¹ Se agrega al final y se mezcla con la ayuda de un agitador magnético.

2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los datos se utilizó el programa Statistical Analysis System (SAS[®] 2002). El factor de estudio (efecto principal) es el tipo de célula del testículo (peritubular, de Sertoli, germinal y de Leydig). Se utilizaron 10 unidades experimentales (10 verracos) para realizar el estudio.

A los datos se les aplicó la prueba de Shapiro - Wilk's para establecer si mostraban una distribución normal. Al no detectarse una distribución normal en los datos, éstos fueron analizados con tests no paramétricos.

Los datos fueron analizados con el test de Kruskal - Wallis, por ser más de dos poblaciones en el estudio (cuatro tipos de células). Una vez considerados los resultados del test de Kruskal - Wallis, los datos fueron comparados por pares usando el test de la suma de Wilcoxon para datos no pareados.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 INMUNOLOCALIZACIÓN DE IGF-I

El estudio inmunohistoquímico reveló la presencia del IGF-I en el tracto reproductivo del verraco. La proporción de células teñidas en los tejidos que mostraron tinción positiva, es decir, el porcentaje de células que expresaron IGF-I en los distintos grupos celulares, fue siempre superior al 65%.

En el testículo, el IGF-I se detectó en las células germinales, células de Sertoli y células de Leydig (Tabla 8). En el caso de las células germinales la intensidad de tinción fue moderada. En las células de Sertoli fue débil y menor que en los grupos celulares del resto de los tejidos, que presentaron patrones de tinción moderados y muy intenso.

Las células de Leydig en el intersticio del testículo expresaron un patrón de tinción intenso, el mayor de todo el grupo celular en el testículo.

En todos los casos hubo diferencias ($P < 0.05$) en los niveles relativos de expresión (intensidad de tinción) en los distintos grupos celulares positivos a IGF-I en el testículo. Las células peritubulares no expresaron un patrón de tinción definido (Figura 1).

Tabla 8. Intensidad de tinción para IGF-I en el testículo del verraco

Tejido	Tipo de célula	Intensidad de tinción ¹
Túbulo seminífero	Germinal	2.0 ± 0.4^{b2}
	Sertoli	1.0 ± 0.0^a
Intersticio	Leydig	3.2 ± 0.2^c

¹ Intensidad de tinción: 0, sin tinción; 1, tinción débil; 2, tinción moderada; 3, tinción intensa; 4, tinción muy intensa

² Media \pm error estándar

Valores en columnas con distinta letra, difieren entre si ($P < 0.05$)

3.2 INMUNOLOCALIZACIÓN DE IGF-Ir

Los resultados obtenidos indican que el IGF-Ir se expresa en el tracto reproductivo del verraco. El IGF-Ir se detectó en las células germinales, células de Sertoli y células peritubulares en los conductos seminíferos y en las células de Leydig en el intersticio del testículo. Del mismo modo que en el caso del IGF-I, la proporción de células que expresaron el IGF-Ir en los tejidos fue superior a 65%.

La intensidad de la tinción en los grupos de células peritubulares, de Sertoli y de Leydig fue débil, sin que se apreciaran diferencias ($P > 0.05$). A diferencia de las células germinales que expresaron un patrón de tinción intenso (3.2 ± 0.2) (Tabla 9) (Figura 2).

Tabla 9. Intensidad de tinción para IGF-Ir en el testículo del verraco

Tejido	Tipo de célula	Intensidad de tinción ¹
Túbulo seminífero	Germinal	3.2 ± 0.2^{b2}
	Sertoli	1.0 ± 0.0^a
	Peritubulares	1.0 ± 0.2^a
Intersticio	Leydig	1.0 ± 0.0^a

¹ Intensidad de tinción: 0, sin tinción; 1, tinción débil; 2, tinción moderada; 3, tinción intensa; 4, tinción muy intensa

² Media \pm error estándar

Valores en columnas con distinta letra, difieren entre si ($P < 0.05$)

En líneas generales, los resultados obtenidos indican que estas señales, en el testículo, actúan en el ámbito local. Las células de Sertoli y células germinales generan IGF-I que probablemente actúa sobre ellas mismas regulando procesos de división y diferenciación en las células germinales y puesto que las células de Sertoli no se dividen en el animal adulto, el IGF-I en estas células podría actuar regulando procesos de diferenciación y de supervivencia celular (Petersen *et al.* 2001). Además, las células de Leydig también generan IGF-I, que podría contribuir a la regulación de las células de Sertoli y, por tanto, de la espermatogénesis.

Los resultados obtenidos en el verraco son consistentes con los que se han encontrado en otras especies. El IGF-I en el testículo, se aisló por primera vez en el conducto seminífero del testículo de rata (Ritzen, 1983), por inmunoreacción el IGF-I se encontró en humanos (Vanelli *et al.* 1988), rata (Baker *et al.* 1996) y testículo de ratón (Hansson *et al.* 1989). En diversos experimentos se ha demostrado la presencia de IGF-I en las células peritubulares, Sertoli y Leydig en rata (Hansson *et al.* 1989; D'Ercole *et al.* 1984).

Estudios en células de Sertoli en rata y células de Leydig inmaduras en porcino demuestran que existe un incremento en la secreción de IGF-I en presencia de FSH y LH, respectivamente (Perrard-Sapori *et al.* 1987; Kasson y Hsueh 1987; Bernier *et al.* 1986).

El IGF-I incrementa el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) posnatal en las enzimas esteroidogénicas y su actividad proteica (Chatelain *et al.* 1990; Perrard – Saponi *et al.* 1987a; Chuzel *et al.* 1996; Lin *et al.* 1987; Moore y Morris 1993). Este factor de crecimiento además aumenta los niveles de transcripción de ARNm y el número de receptores de LH (Chatelain *et al.* 1990; Perrard – Saponi *et al.* 1987a). Estudios posteriores realizados en cultivos celulares han demostrado la existencia de ARNm que codifica para el IGF-I en el testículo del verraco (Chatelain *et al.* 1987; Cailleau *et al.* 1990; Naville *et al.* 1990; Clark *et al.* 1994).

Otros estudios mencionan que el IGF-I mejora el desarrollo del blastocisto de embriones bovinos producidos *in vitro* y la estimulación de la expansión del *cumulus*, maduración nuclear y división después de la fertilización de oocitos bovinos *in vitro* (Palma *et al.* 1997; Matsui *et al.* 1995; Rieger *et al.* 1998). Además el IGF posee una participación significativa en mitogénesis de células tecaes en la esteroidogénesis de células de la teca inducida por LH durante el desarrollo folicular en bovinos (Stewart *et al.* 1995; Echterkamp *et al.* 1994).

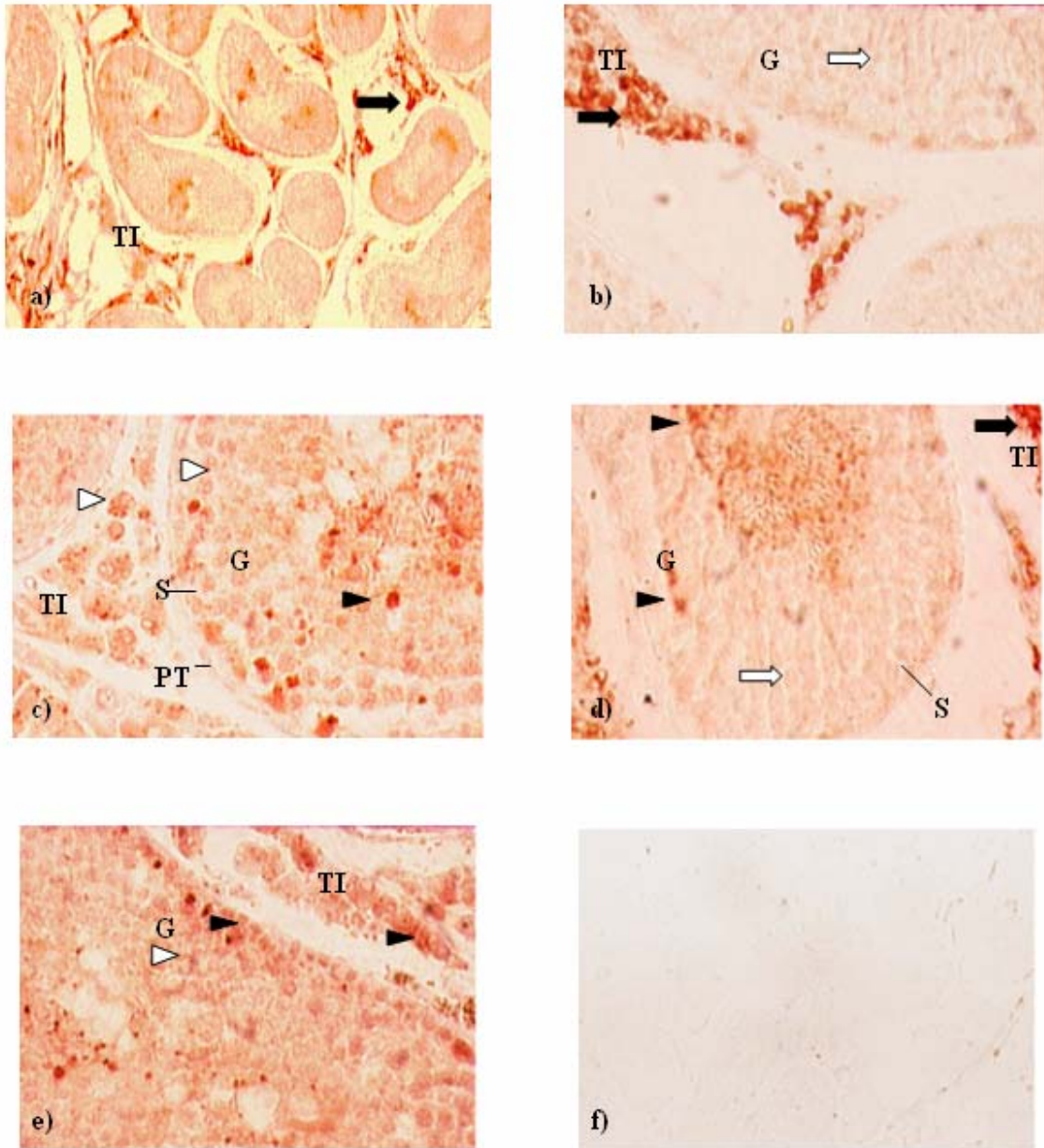


Figura 1. Tinción inmunohistoquímica para el IGF-I en el testículo del verraco. Patrones representativos de tinción a 100X (a y f) y a 400X (b,c,d y e). Tejido intersticial (TI), células peritubulares (PT), células de Sertoli (S) y células germinales (G). Control negativo (f). Tinción muy intensa (➡), tinción intensa (▶), tinción moderada (▷) y tinción débil (⇨).

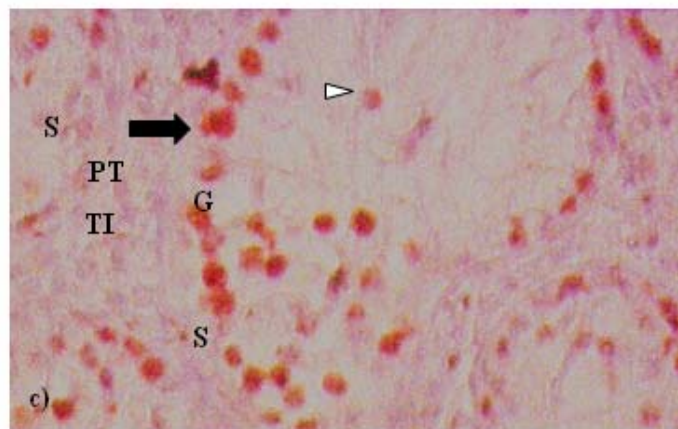
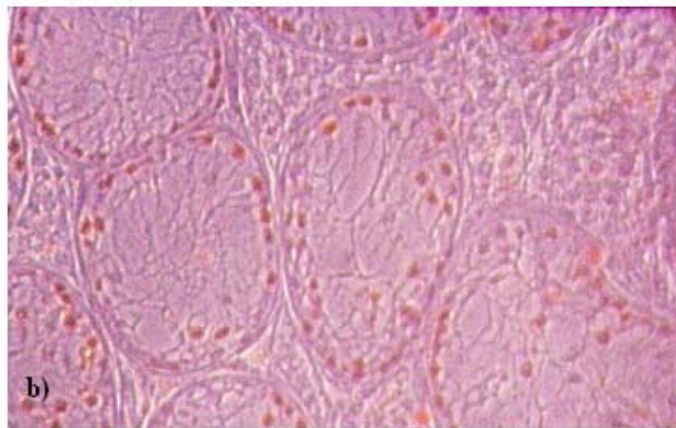
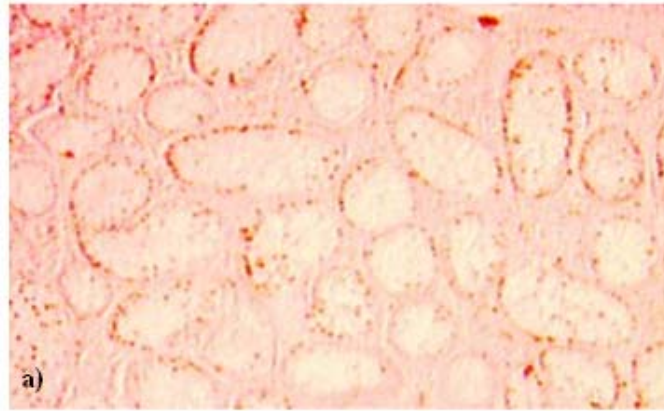


Figura 2. Tinción inmunohistoquímica para el IGF-Ir en el testículo del verraco. Patrones representativos de tinción a 100X (a), a 400X (b) y a 630X (c). Tejido intersticial (TI), células peritubulares (PT), células de Sertoli (S) y células germinales (G). Tinción muy intensa (➔) y tinción moderada (⤵).

4. CONCLUSIONES

El IGF-I y su receptor IGF-Ir se expresan en el tejido testicular del verraco.

El IGF-I se expresa en las células germinales, de Sertoli y de Leydig con un patrón de tinción de débil a intenso.

El IGF-Ir se detectó en las células germinales, de Sertoli, peritubulares y de Leydig con un patrón de tinción de débil a intenso.

Para el IGF-I y su receptor IGF-Ir el porcentaje de células en los distintos grupos celulares que se expresaron fue siempre superior al 65%.

El sistema IGF-I/IGF-Ir parece desempeñar un papel importante en la regulación de la fisiología testicular del verraco y podrían estar implicados en la regulación de la espermatogénesis y/o en la maduración de los espermatozoides.

5. RECOMENDACIONES

Realizar otros estudios de inmunolocalización del IGF-I y su receptor en los tejidos del epidídimo, próstata, vesícula seminal y glándula bulbouretral del verraco.

Realizar estudios de inmunolocalización del IGF-I y su receptor en los espermatozoides del verraco.

Estudiar los efectos biológicos del sistema IGF-I/IGF-Ir sobre los espermatozoides del verraco.

6. BIBLIOGRAFÍA

Algaba, F. 1994. Anatomía microscópica de la vía seminal. En: Pomerol, J. M., Arrondo, J. (eds) *Práctica andrológica*. Masson-Salvat Medicina. Barcelona, España. 176-179.

Baker, J., Hardy, M. P., Zhou, J., Bondy, C., Lupu, F., Bellve, A. R., Efstratiadis, A. 1996. Effects of an IGF-I null mutation on mouse reproduction. *Molecular Cell Endocrinology*. 10: 903-918.

Bassas, L., Lesniak, M. A., Serrano, J., Roth, J., de Pablo, F. 1988. Developmental regulation of insulin and type I insulin-like growth factor receptors and absence of type II receptors in chicken embryo tissues. *Diabetes*. 37: 637 – 644.

Bellvé, A. R., Zheng, W. 1989. Growth factors as autocrine and paracrine modulators of male gonadal functions. *J. Reprod. Fert.* 85: 771-793.

Bernier, M., Chatelain, P., Mather, J. P., Saez, J. M. 1986. Regulation of gonadotrophin responsiveness and cell multiplication by somatomedin-C and insulin in cultured pig Leydig cells. *J. Cell Physiology*. 129: 257-263.

Bondy, C. A., Werner, H., Roberts, C. T., LeRoith, D. 1990. Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and type I receptor gene expression in early organogenesis: comparison with IGF-II gene expression. *Molecular Cell Endocrinology*. 4: 1386–1398

Cailleau, J., Vermeire S., Verhoeven G. 1990. Independent control of the production of insulin like growth factor I and its binding protein by cultured testicular cells. *Molecular Cell Endocrinology*. 69: 79-89.

Carpenter, G. 1987. Receptor for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Ann. Rev. Biochemistry*. 56: 881-914.

Chatelain, P. G., Naville D., Saez J. M. 1987. Somatomedin C: insulin-like growth factor I like material secreted by porcine Sertoli cells *in vitro*: Characterization and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 146: 1009-1017

Chatelain, P., Sánchez, P., Saez, J. M. 1990. Growth hormone and insulin-like growth factor treatment increased testicular luteinizing hormone receptors and steroidogenic responsiveness of growth hormone deficient dwarf mice. *Endocrinology*. 128: 1857 – 1862.

Chuzel, F., Clark, A. M., Avallet, O., Saez, J. M. 1996. Transcriptional regulation of the luteotropin human/chorionic gonadotrophin receptor and three enzymes of steroidogenesis by growth factors in cultures pig Leydig cells. *Eur. J. Biochemistry*. 239: 8–16.

Clark, A. M., Samaras, S. E., Hammond, J. M., Hagen, D. R. 1994. Changes in the messenger ribonucleic acid for insulin like growth factor-I and II in the porcine testis during and between two waves of testicular development. *Biology of Reproduction* 50: 993-999.

Clemmons, D. R., Underwood, L.E. 1991. Nutritional regulation of IGF-I and IGF binding proteins. *Ann. Rev. Nutrition*. 11: 393 – 412.

Clemmons, D. R. 1991. Insulin – like growth factor-binding proteins: roles in regulation IGF physiology. *J. Dev. Physiology*. 15: 105-110.

D’Ercole, A. J; Stiles, A. D; Underwood, L. E. 1984. Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of actions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81: 935 – 939.

Daughaday, W. H. 1989. Somatomedins: a new look at old questions. In: LeRoith, D., Raizada, MK. (eds). *Molecular and Cellular Biology of Insulin-Like Growth Factors and their Receptors*. New York: Plenum. 89: 1 -4.

Echternkamp, S. E., Howard, H. J., Roberts, A. J., Grizzle, J., Wise, T. 1994. Relationships among concentrations of steroids, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding proteins in ovarian follicular fluid of beef cattle. *Biol. Reprod*. 51: 971-981.

Giorgetti, S., Ballotti, R., Kowalski-Chauvel, A., Tartare, S., Van Obberghen, E. 1993. The insulin and insulin-like growth factor-I receptor substrate IRS-1 associates with and activates phosphatidylinositol 3-kinase in vitro. *J. Biol. Chemistry*. 268: 7358–7364.

Gnessi, L., Fabbri, A., Spera, G. 1997. Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: An integrated system with hormones and local environment. *Endocrinology Rev*. 18: 541-609.

Gordon, I. 1997. Reproducción controlada del cerdo. Factores que afectan la calidad seminal y la libido en los verracos. *Acribia*. España. 29-37.

Hafez, E. S. E. 2002. Anatomía del aparato reproductor del macho. Parte I. Anatomía funcional de la reproducción. En: Hafez E. S. E., Hafez, B. (eds). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7ª ed. Mc Graw Hill. México. 3-12.

- Hafez, E. S. E., Hafez, B. 2002. Hormonas, factores de crecimiento y reproducción. Parte II. Fisiología de la reproducción. En: Hafez E. S. E., Hafez, B. (eds). Reproducción e inseminación artificial en animales. 7^a ed. Mc Graw Hill. Mexico. 33-53.
- Hafez, E. S. E., Hafez, B. 2002a. Transporte y supervivencia de los gametos. Parte II. Fisiología de la reproducción. En: Hafez E. S. E., Hafez, B. (eds) Reproducción e inseminación artificial en animales. 7^a ed. Mc Graw Hill. Mexico. 84-97.
- Handelsman, D. J., Spaliviero, J. A., Scott, C. D., Baxter, R. C. 1985. Identification of the insulin-like growth factor I and its receptor in the rat testis. *Acta Endocrinology*. 109: 543–549.
- Hansson, H. A., Billig, H., Isgaard, J. 1989. Insulin-like growth factor I in the developing and mature rat testis: immunohistochemical aspects. *Biology of Reproduction*. 40: 1321-1328.
- Hill, D. J. 1989. Growth factors and their cellular actions. *J. Reprod. Fert.* 85: 723-734.
- Kasson, B., Hsueh, A. 1987. Insulin-like growth factor I augments gonadotrophin stimulated androgen biosynthesis by cultured rat testicular. *Molecular Cell. Endocrinology*. 52: 27 – 34.
- Kierszenbaum, A. L. 1994. Mammalian spermatogenesis *in vivo* and *in vitro*: a partnership of spermatogenesis and somatic cell lineages. *Endocrinology Rev.* 15: 116 – 134.
- Lamb, D. J. 1993. Growth factors and testicular development. *J. Urology*. 150: 583-592.
- Lin, R., Haskell, J., Vinson, N., Terracio, L. 1986. Characterization of insulin and insulin-like growth factor I receptors of purified Leydig cells and their role in steroidogenesis in primary culture: a comparative study. *Endocrinology*. 119:1641–1647.
- Lin, T., Vinson, T., Haskett, N. J., Murono, E. P. 1987. Induction of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity by insulin-like growth factor-I in primary culture of purified Leydig cells. *Adv. Exp. Biol. Med.* 219: 603–607.
- Matsui, M., Takahashi, Y., Hishinuma, M., Kanagawa, H. 1995. Insulin and insulin-like growth factor – I (IGF-I) stimulate the development of bovine embryos fertilized *in vitro*. *J. Vet. Med. Sci.* 57: 1109 – 1111.
- Moore, A., Morris, I. D. 1993. The involvement of insulin-like growth factor-I in local control of steroidogenesis and DNA synthesis of Leydig and non-Leydig cells in rat testicular interstitium. *Endocrinology*. 138: 107–114.
- Naville, D., Chatelain, P. G., Avallet, O., Saez, J. M. 1990. Control of production of insulin like growth factor I by pig Leydig and Sertoli cells cultured alone or together. *Cell-cell interactions. Molecular Cell Endocrinology*. 70: 217-224.

Oliva, J. 2005. Localización del EGF/TGF α en el tracto genital y sus efectos biológicos sobre los espermatozoides de verraco. Tesis Doctoral. Madrid, ES. Universidad Complutense de Madrid. 124 p.

Palma, G. A., Muller, M., Brem, G. 1997. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro*. Fertil. 110: 347 – 353.

Perrard – Saponi, M., Chatelain, M., Saez, J. M. 1987. Modulation of Leydig cell function by culture with Sertoli cells or with Sertoli cell conditioned medium: effect of insulin, somatomedin-C and FSH. Molecular Cell Endocrinology. 50: 193-201.

Perrard – Saponi, M., Chatelain, M., Jaillard, C., Saez, J. M. 1987a. Characterization and regulation of somatomedin C/insulin-like growth factor I (Sm-C/IGF-I) receptors on cultured pig Leydig cells: effect of Sm-C/IGF-I on luteotropin receptor and steroidogenesis. Eur. J. Biochemistry. 165: 209–214.

Petersen, C., Boitani, C., Froysa, B., Soder, O. 2001. Transforming growth factor- α stimulates of rat Sertoli cells. Molecular Cell Endocrinology. 181: 221-227.

Rieger, D., Luciano, A. M., Modina, S., Pocar, P., Lauria, A., Gandolfi, F. 1998. The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes. J. Reprod. Fertil. 112: 123 – 130.

Ritzen, E. M. 1983. Chemical messengers between Sertoli cells and neighbouring cells. J. Steroid Biochemistry. 19: 499-504.

SAS[®]. Statistical Analysis System. 2002. Users Guide. SAS Institute. Cary, N.C. US.

Schlatt, S., Meinhardt, A., Nieschlag, E. 1997. Paracrine regulation of cellular interaction in the testis: factors in search of a function. Eur. J. Endocrinology. 137: 107 – 117.

Smith, E. P., Conti, M. 1996. Growth factors and testicular function: relevance to disorders of spermatogenesis in humans. Semin. Reprod. Endocrinology. 14: 209 – 217.

Spiteri-Grech, J., Nieschlag, E. 1993. Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis – a review. J. Reprod. Fertil. 98: 1 – 14.

Stewart, C. E., Rotwein, P. 1996. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. Physiology Rev. 76: 1005 – 1026.

Stewart, C. E., Spicer, L. J., Hamilton, T. D., Keefer, B. E. 1995. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. J. Anim. Sci. 73: 3719-3731.

Tapanainen, J. S., Tilly, J. L., Vihko, K. K., Hsueh, A. J. 1993. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Molecular Cell Endocrinology*. 7: 643 – 650.

Thompson, E. B. 1994. Apoptosis and steroid hormones. *Molecular Cell Endocrinology*. 8: 665 – 673.

Vanelli, B. G., Barni, T., Orlando, C., Natalie, A., Serio, M., Valboni, G. C. 1988. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis: an immunohistochemical study. *Fertil. Steril*. 49: 609-666.

Vermeirsch, H., Simoens, P., Coryn, M., Van den Broeck, W. 2001. Immunolocalization of progesterone receptors in the canine ovary and their relation to sex steroid hormone concentrations. *Reproduction*. 122: 73-83.

Wagener, A., Blottner, S., Göritz, F., Fickel, J. 2000. Detection of growth factors in the testis of roe deer (*Capreolus capreolus*). *Anim. Reprod. Sci*. 64: 65 – 75.

Werner, H., LeRoith, D. 1996. The role of insuline-like growth factor system in human cancer. *Adv Cancer Res*. 68: 183 – 223