

00346

24
26j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INSULINA Y DE UNA
PROTEINA DERIVADA DEL HEPATOPANCREAS DE
LA LANGOSTA *Panulirus argus* SOBRE CELULAS
EMBRIONARIAS EN CULTIVO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A :
LIC. MICROBIOL. RAUL JOSE BOBES RUIZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARTA C. ROMANO PARDO

MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

274552



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.

PASINACION

DISCONTINUA.

DEDICATORIA

A mi padre por su ejemplo, cariño y respeto hacia sus hijos. Porque con el amor que nos has dado siempre, todos te podremos decir GRACIAS PAPÁ por darnos y enseñarnos lo mejor de ti, QUE ES TODO.

A la memoria de mi madre, quien siempre me dio amor y me enseñó que lo máspreciado que uno puede tener en la vida es el estudio y la superación continua, estoy seguro hoy sería un gran día para ella.

A mis hermanas y sobrinos por ser motor impulsor en mi vida y recibir de ellos mucho cariño y apoyo.

A todas mis queridas tías de quienes he recibido cariño y respeto.

A mi gran profesora la Dra. Marta C. Romano Pardo, quien con sabiduría, humildad y ejemplo me ha enseñado a andar por el difícil camino de la ciencia, como solo ella lo podría hacer con una total entrega y respeto. Gracias Doctora por tan hermosos momentos.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A los Doctores, María Elena Ibarra Martín, Directora del Centro de Investigaciones Marinas, Dr. Mario Oliva Suarez, Vice-rector de Investigaciones y la Dra. Olimpia Carrillo Fornés, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Biología, todos de la Universidad de la Habana, por el gran apoyo que me brindan para que pueda realizar mis estudios de Postgrado.

AGRADECIMIENTOS

- A los miembros del jurado, Dra. Beatriz Fuentes Pardo, Dra. Patricia Ramos Morales, Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dra. Marta C. Romano Pardo, Dr. Rúben Gerardo Contreras Patiño, Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte y la Dra. Julieta Ivonne Castro Romero por la revisión del trabajo y sus valiosos comentarios.
- A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por el apoyo brindado como becario, para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias en Biología Celular en la Facultad de Ciencias de la UNAM.
- A la Universidad de la Habana, Cuba, por el apoyo que me brinda para la realización de mis estudios de Postgrado.
- A Aída Castillo Alvarez por su gran amistad y ayuda en todo momento.
- A María Teresa Alvarez Bañuelos por su hermosa amistad y compartir conmigo muchos ratos de esta Maestría.
- A Mario Pérez Martínez compañero y amigo, de quien siempre recibí buenos consejos.
- A la familia Ceballos Martínez por el cariño y apoyo que me han brindado en todo momento.
- A la Dra. Margarita Collazo Ortega, Jefa de la División de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ciencias de la UNAM por el apoyo brindado durante mis estudios.
- A mis compañeros de laboratorio, Herlinda, Carolina, Ricardo, Armando, Jesús, Luz María, Carmen, Ceyde, Manuel, Silvia, Elizabeth, por el apoyo brindado durante la realización de esta tesis.
- A la familia Bezaury Creel por el cariño que siempre me demuestran.
- A todos mis amigos mexicanos y cubanos que me han dado el apoyo que se necesita cuando uno está lejos de su país.

INDICE

RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN.....	2
<i>Insulina</i>	2
Receptor de Insulina.....	2
Estructura del Receptor de Insulina.....	5
Biosíntesis del Receptor de Insulina.....	6
Subunidad α	8
Subunidad β	10
Efectos Biológicos de la Insulina.....	14
<i>Factores de crecimiento similares a la insulina</i>	18
Receptor de IGF-I.....	20
Subunidad α	21
Subunidad β	23
Receptor de IGF-II.....	24
Funciones Biológicas de los IGFs.....	25
<i>Factor aislado del hepatopancreas de la langosta PANULIRUS ARGUS (INIHEP)</i>	28
Efectos Biológicos.....	30
<i>Testículo</i>	32
Hormonas Testiculares y Esteroidogénesis en Aves.....	36
Gonadotropinas.....	37
Efectos y Mecanismo de Acción de las Gonadotropinas en, el Testículo.....	38
Función Testicular.....	41
Hormonas Esteroides.....	42
Biosíntesis de Testosterona.....	43
Efectos de la Insulina sobre el Desarrollo del Testículo.....	47
Efectos de los IGFs sobre el Testículo.....	49
II- HIPÓTESIS.....	55
III- OBJETIVO GENERAL.....	55
Objetivos Específicos.....	56
VI- MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
Cultivo Primario de Fibroblastos.....	57
Estudio para Conocer la Concentración Óptima de Suero Bovino Fetal a Utilizar en los Cultivos de Fibroblastos de Embrión de Pollo de 12 Días.....	58
Efecto de Insulina e INIHEP sobre la Proliferación de Células de Fibroblastos.....	58
Curva Temporal de Respuesta a Insulina.....	59
Cultivo Primario de Testículo.....	59
Secreción de Testosterona por Células de Testículo en Cultivo.....	60

Estudio de la Proliferación Celular en Células de Testículo de Embrión de Pollo de 18 días	60
Técnica de Extracción de Testosterona.....	61
Técnica de Radioinmunianálisis de Testosterona.....	61
Inmunofluorescencia con Microscopía Confocal.....	62
V- RESULTADOS.....	64
Estandarización de las Concentraciones de Suero del Cultivo de Fibroblastos.....	64
Detección de Vimentina en Fibroblastos.....	64
Efecto de Insulina e INIHEP sobre la proliferación celular de Fibroblastos.....	64
Curva Temporal del Efecto del Efecto de Insulina sobre Fibroblastos.....	65
Proliferación de Células de Testículo en Presencia de Insulina o INIHEP.....	65
Producción de Testosterona Basal y Dependiente de hCG.....	66
VI- DISCUSIÓN.....	67
VII- CONCLUSIONES.....	77
VIII- REFERENCIAS.....	79

RESUMEN

La insulina y los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs), juegan un papel fundamental en el desarrollo embrionario de diferentes especies. Es bien conocido que ellos regulan la proliferación y la diferenciación celular entre otras muchas funciones. Por otra parte se ha informado que la insulina inmunorreactiva aislada del hepatopancreas de la langosta *Panulirus argus* (INIHEP), administrada en la dieta de camarones en cultivo, estimula el crecimiento de los mismos. En el presente trabajo se estudia el efecto de la insulina y el INIHEP sobre células de testículo y fibroblastos de la piel de embriones de pollo. Se utilizaron testículos de embrión de pollo de 18 días de desarrollo. Los testículos libres de albuginea se disociaron con Tripsina al 0.25%. Las células obtenidas se sembraron en medio Dulbecco's Modified Medium (DMEM) con Suero Bovino Fetal (SBF) al 10% y se incubaron por 24 horas (h). Pasado este tiempo las células se lavaron con PBS y se incubaron por 18 horas con diferentes concentraciones de insulina o INIHEP. Dos horas antes de concluir el tiempo de incubación se administró pulso de timidina tritiada. Los fibroblastos se obtuvieron de la piel de embriones de pollo de 12 días. Se disociaron mediante tripsina y se cultivaron en medio DMEM más 10% de SBF por 24 h. A continuación se cambió el medio por otro sin suero y con 0.1% de BSA, con insulina o INIHEP por 10 h. La timidina tritiada se administró a las 8 h de cultivo. Los resultados obtenidos en las células de testículos indican que la insulina produce una significativa proliferación celular. La producción basal de testosterona dependiente de hCG se incrementó con dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$ y 3 horas

de incubación. Dosis mayores causaron *down regulation* del efecto de hCG que fue más significativo en exposiciones más prolongadas a la hormona. Asimismo la insulina incrementó la proliferación de los fibroblastos a las 6 y 12 horas de exposición, más la inhibió en períodos mayores. El INIHEP estimuló de manera significativa la proliferación de fibroblastos con la dosis más baja utilizada. Sin embargo el INIHEP no modificó la producción de testosterona ni la proliferación celular en el testículo. En conjunto los resultados obtenidos indican que tanto la insulina como INIHEP estimulan significativamente la proliferación de los fibroblastos de la piel del embrión de pollo. La insulina pero no INIHEP puede modificar la proliferación celular y la esteroidogénesis en el testículo. Estos datos sugieren por primera vez un rol para la insulina en el desarrollo de los órganos reproductores del embrión de pollo. Por otra parte sería interesante destacar que los datos de este trabajo señalan que un factor derivado del hepatopancreas de la langosta puede modificar la proliferación fibroblástica en otra especie, en este caso el embrión de pollo y abre por lo tanto un campo de estudios que podría además de su interés biológico tener impacto en la producción.

INTRODUCCION

INSULINA

Los islotes pancreáticos (Langerhans) están compuestos por 3 tipos de células diferentes (α , β y δ) que son las encargadas de sintetizar el glucagón, la insulina y la somatostatina respectivamente.

La insulina es una hormona anabólica cuya estructura en humanos y otras especies está bien caracterizada. Recientemente se han producido importantes avances en la caracterización estructural y funcional de su receptor, y se sabe que sus diferentes efectos son mediados por estas proteínas membranales que existen en diferentes tipos celulares.

El precursor de la insulina se conoce como la preproinsulina. Es una gran cadena peptídica de peso molecular de 12,000 daltons y es sintetizada a partir del DNA/RNA y posteriormente en el retículo endoplásmico rugoso de las células β . Después de ser sintetizada, esta molécula es cortada por enzimas microsomales para formar proinsulina, de un peso molecular de 9,000 daltons.

La proinsulina está compuesta por la molécula de insulina y por un péptido de enlace "C", con un total de 86 aminoácidos. El péptido es cortado dentro de las vesículas de transporte por enzimas proteolíticas que eliminan los dipéptidos de unión de la molécula de insulina y el péptido C, separando de esta manera las dos

moléculas. Este proceso ocurre antes o después de pasar por el aparato de Golgi, lugar donde termina la síntesis de insulina, la que es empaquetada en vesículas secretoras que contienen cantidades equivalentes de insulina madura y péptido C.

La insulina es una hormona proteica de 51 aminoácidos, de doble cadena: la cadena A de 21 de aminoácidos y la B de 30; ambas están conectadas por dos puentes disulfuro intercatenarios entre los residuos (A7-B7 y A20-B19). Además la cadena A tiene otro puente disulfuro intracatenario entre los aminoácidos 6 y 11. (Fig. 1)

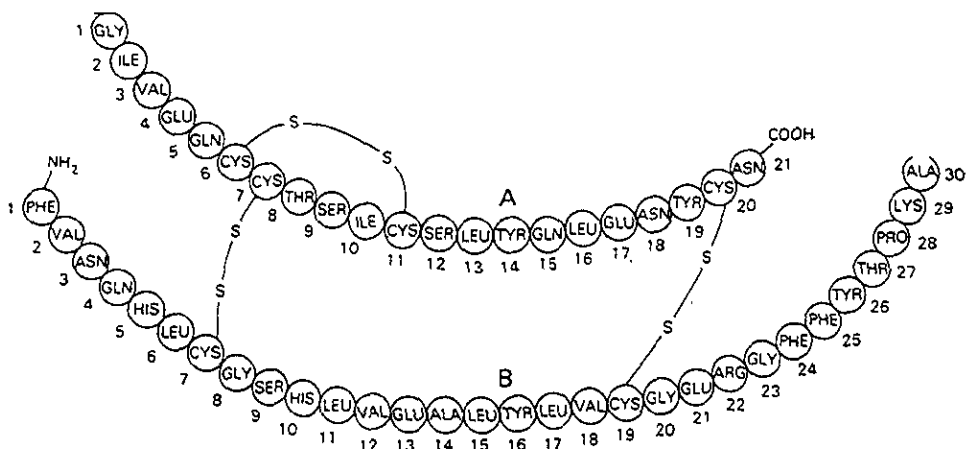


Fig. 1. Estructura de la insulina porcina.

Utilizando anticuerpos específicos de insulina y de proinsulina se comprobó que la insulina no se detecta en el aparato de Golgi. En cambio se le encuentra en cantidades pequeñas en vesículas recubiertas con una membrana y es muy abundante en las vesículas no recubiertas. Por lo tanto, en todo el proceso, las

vesículas recubiertas deben ser el lugar de conversión de la proinsulina en insulina. Las proteasas desempeñan un papel fundamental, rompiendo la molécula de proinsulina. El mecanismo de activación de las proteasas en las vesículas recubiertas parece implicar la acidificación del interior de estas vesículas, ya que en el pH ácido se activan estas proteasas (Goberna, 1992).

Durante el proceso de conversión de proinsulina a insulina que se lleva a cabo dentro de las vesículas, participan tres proteasas distintas, denominadas endopeptidasas I y II y carboxipeptidasa. Estas proteasas se sintetizan en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso y se encuentran en los gránulos de secreción desde la formación de los mismos.

Para que se libere la insulina, debe atravesar antes la membrana del gránulo y la membrana de la célula β . Por microscopía electrónica se ha observado que la membrana del gránulo se fusiona con la membrana plasmática. De esta forma permite la secreción sin perder la continuidad de la membrana durante todo el proceso. Finalmente la insulina atraviesa las paredes del endotelio capilar gracias a los numerosos poros que están cubiertos por una finísima membrana.

Receptor de Insulina

Como se mencionó anteriormente la insulina tiene que unirse a su receptor para que ocurra la cascada de señalización. El receptor de insulina se expresa en

un gran número de tejidos y puede variar en cantidad. Llega a estar en altas concentraciones (más de 300,000 receptores por célula) en hígado y tejido adiposo, que son tejidos blanco de la insulina (Kahn y col.,1981). Sin embargo en músculo esquelético, estos receptores se encuentran en bajas concentraciones, mientras que en este mismo tejido los receptores de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) se observan en mayor cantidad.

Estructura del Receptor de Insulina

El receptor de insulina está compuesto por dos subunidades α y dos subunidades β , unidas covalentemente por puentes disulfuros, que forman el heterotetrámero. Por medio de las técnicas de electroforesis en geles DE poliacrilamida en condiciones no reductoras (SDS-PAGE), se ha podido conocer que el peso molecular del holoreceptor es aproximadamente de 350,000 daltons. La técnica SDS-PAGE en condiciones reductoras, reveló que la subunidad α tiene un peso molecular de 135,000 y la β de 95,000. Cada subunidad tiene una función específica.

La subunidad α posee el dominio de unión a insulina y la β el de tirosina cinasa. La familia de los receptores de tirosina cinasa se puede dividir en diferentes clases (Ullrich y Schlessinger,1990). Tanto el receptor de insulina como los receptores para IGF-I son membranales y pertenecen a la clase II; los dos

contienen una porción rica en cisteína en sus subunidades α , las que se unen por puentes disulfuros para formar el heterotetrámero (Fig. 2).

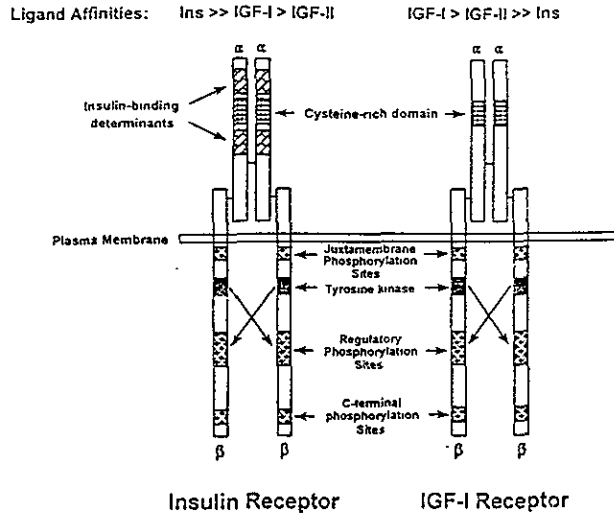


Fig. 2. Esquema que representa la estructura de los receptores para insulina e IGF-I. Tomado de Jones and Clemmons, 1995.

Biosíntesis del Receptor de Insulina

El gen del receptor de insulina consta de 150 kilobases (Kb). Se encuentra en el brazo corto del cromosoma 19 de humanos y está constituido por 22 exones y 21 intrones (Yang y col, 1985; Muller-Wieland y col, 1989; Seino y col, 1990). El promotor contiene sitios de unión de los factores de transcripción, CAAT/proteína de unión amplificadora, Sp1 y NF-1 (Araki y col, 1984; Webster y col, 1994).

El receptor de insulina es sintetizado a partir de un proreceptor de alto peso molecular que es codificado completamente por un RNAm. Muchas células presentan diferentes formas que varían en el tamaño del transcrito, entre 5.7 a 9.5 kb, y todas codifican para el receptor completo. La heterogenicidad del transcrito parece resultar primariamente de señales de poliadenilación variable en la región 3' del mensajero (Goldstein y col,1987; Goldstein y Kahn,1989). Además, existe un evento de "splicing" alternativo del exón 11, de 36 pares de bases, que codifica para 12 aminoácidos en el extremo terminal C de la subunidad α . Las dos formas de "splicing" alternativo del receptor se encuentran en la mayoría de los tejidos, sin embargo la relación entre el de exón 11+ y el exón 11- varía (Ullrich y col,1985; Ebina y col,1985; Seino y Bell,1989). El significado fisiológico de estos 12 aminoácidos no está bien aclarado, pero podría ser importante en las pequeñas diferencias de unión al receptor de insulina e IGF y en su internalización (Yamaguchi y col.,1991; Yamaguchi y col.,1993). En estudios realizados en músculo de pacientes con diabetes tipo II, se encontró incremento en la relación entre la isoforma exón 11+ y 11- (Mosthaf y col.,1991; Mosthaf y col.,1993). Estos resultados no se han confirmado en otros estudios (Benecke y col.,1992)

En el retículo endoplásmico el proreceptor de insulina es traducido y rápidamente glicosilado. Este proceso es seguido de la formación de puentes disulfuros intra e inter subunidades. El proceso post-transduccional ocurre en el

aparato de Golgi, produciéndose los cortes proteolíticos en la secuencia tetrabásica Arg720-Lys721-Arg722-Arg723 (la numeración de los aminoácidos esta basada en el exón 11+), localizada en la unión de las subunidades α y β , continuando los procesos de glicosilación y acetilación de los ácidos grasos (Hedo y col.,1983; Hedo y Simpson.,1985).

La enzima responsable del procesamiento del proreceptor ha sido identificada mediante estudios de purificación del proreceptor por inmutafinidad y se encontró actividad de la enzima endopeptidasa en vesículas purificadas del aparato de Golgi de hígado de rata (Alarcon y col.,1994). La caracterización bioquímica de esta actividad sugiere que la enzima endopeptidasa es la responsable del procesamiento del proreceptor y que es miembro de la familia Kex2, relacionada con la convertasa. Mediante estudios de *immunoblotting* realizados con las fracciones de las vesículas del Golgi, se detectaron dos miembros de esta familia, la PACE4 y la furina.

Subunidad α

La subunidad α del receptor de insulina tiene un peso molecular de 135,000 daltones y su localización es completamente extracelular y es la responsable de la unión de insulina (Ullrich y col.,1985; Ebina y col.,1985; Yipp,1992). La identificación exacta de los residuos involucrados en el reconocimiento y la especificidad, o alta afinidad de la insulina por su receptor, ha sido difícil y

controvertida. La mayoría de los datos disponibles, provienen de estudios realizados por mutágenesis dirigida que en muchos casos son difíciles de interpretar ya que afectan la conformación de la subunidad α y por lo tanto modifican la unión de la insulina con su receptor. Tavare y Siddle (1993), a partir de estudios bioquímicos y de mutágenesis "*in vitro*", sugieren que el dominio N terminal del receptor de insulina es necesario para que haya una gran afinidad del receptor por la insulina (Rafaeloff y col.,1989; De Meyts y col.,1990; Yipp,1992).

La construcción de un receptor quimérico de IGF-I que contenía residuos (1-68) del dominio N terminal de insulina, resultó en un receptor híbrido que reconocía con gran afinidad a insulina. Sin embargo una construcción similar pero adicionando residuos (1-62) del extremo N terminal del receptor de IGF-I en el receptor de insulina, bloquea la unión de IGF- I con su receptor. Los residuos 191-290, ricos en cisteína del receptor de IGF-I, son los que le confieren especificidad por su ligando (Gustafson y Rutter,1990; Kjeidsen y col.,1991).

En otros estudios sin embargo se señala que la región rica en cisteína es determinante en la unión de insulina (Gustafson y Rutter,1990). También se han realizado experimentos adonde se eliminan los aminoácidos 1 a 66 del receptor de insulina sin que esta manipulación afecte la unión de la hormona por su receptor (De Meyts y col.,1990).

Subunidad β

La subunidad β del receptor de insulina está compuesta por un dominio corto extracelular que contiene sitios de glicosilación N y O, la región transmembranal de 23 aminoácidos y el dominio intracelular que contiene Tyr, que le confiere la actividad de proteína cinasa que es requerida para que se active la cascada de señalización de insulina.

El hecho de realizar mutaciones *in vitro*, cambiando la Lys localizada en la región de unión de ATP por otros aminoácidos modifica la unión de insulina con su receptor. La actividad cinasa se inactiva completamente. En células que son deficientes en la actividad cinasa se ha observado que la insulina no actúa como estimulador del crecimiento celular, ni interviene en el metabolismo celular (Chou y col.,1987; Ebina y col.,1987; Mc Clain y col.,1987; Stumpo y Blackshear,1991).El mecanismo exacto por el que la insulina activa a la cinasa no está totalmente claro todavía.

Recientemente varios investigadores han estudiado el papel que pudiera desempeñar la región transmembranal (TM) de la subunidad β en la función del receptor así como en la actividad cinasa de esta subunidad. Para estudiar este aspecto realizaron una serie de mutaciones de esta región sustituyéndola por una región transmembranal de otros receptores de membrana, cambiando de esta

manera la longitud, la conformación y hasta la carga de los mismos (Frattali y col.,1991; Yamada y col.,1992; Goncalves y col.,1993; Cheatman y col.,1993). En estos experimentos se observó que la región transmembranal tolera estas mutaciones sin afectar de manera considerable la señalización. Por ejemplo, cuando se cambió la TM del receptor de insulina por la del receptor de PDGF no se vio afectada la actividad ligando. Estos datos junto a otros de la literatura nos sugieren que la TM tiene un papel pasivo en la señalización (Frattali y col,1991).

La unión de insulina con la subunidad α induce rápidamente una cascada de fosforilaciones de Tyr de la subunidad β (Tornqvist y col,1987; White y col.,1988). Esta cascada involucra al menos seis o posiblemente siete residuos de Tyr (Goren y col,1987; Freener y col. 1993). Tres residuos Tyr1158, Tyr1162 y Tyr1163 (la numeración de los aminoácidos es basada en el exón +11) son los sitios de mayor fosforilación y comprenden el dominio que regula la actividad cinasa. Cuando alguno de estos sitios es sustituido por Phe sólo, o en varias combinaciones, se daña la autofosforilación y la activación de la cinasa tanto *in vitro* como en células intactas (Ellis y col.,1986; Goren y col.,1987; Wilden y col,1991). Estos receptores alterados también mostraron una marcada reducción en la fosforilación de IRS-1 y una baja actividad en la regulación de las funciones biológicas (Wilden y col.,1990; Wilden y col.,1992^{a,b}).

El extremo C terminal de la subunidad β tiene dos Tyr que pueden autofosforilarse (Tyr1328 y Tyr1334) y que al parecer no son importantes para la

activación de la cinasa (Tavare y col.,1988; Tornqvist y col.,1988). Esta región también contiene algunos sitios Ser/Thr de fosforilación. El papel biológico de estos sitios no se ha determinado claramente, ya que realizando mutaciones de los 43 aminoácidos terminales (IR Δ CT), se encontró que la autofosforilación y la actividad cinasa se mantienen; pero al mismo tiempo tiene que estar completo el extremo C terminal para que se produzca una estimulación normal de la síntesis de glucógeno mediada por insulina. Además otros estudios han mostrado que IR Δ CT estimula la síntesis de DNA si se le compara con una que no ha sido mutada (IRWT). Estos resultados sugieren que este dominio regula de manera negativa el efecto de insulina sobre el crecimiento celular (Thies y col.,1989). Por el contrario en otros estudios se observa que IR Δ CT actúa de manera idéntica que IRWT en células CHO, tanto sobre la síntesis de glucógeno como de DNA. Estos experimentos sugieren que el extremo C terminal no se requiere para la función normal del receptor (Myers y col.,1991). Por todo esto el papel exacto de la autofosforilación de estos sitios no está clara todavía.

La región yuxtamembranal de la subunidad β juega un papel crucial en la función del receptor; cuenta con al menos un sitio de autofosforilación (Tyr972) que no requiere fosforilación de la cinasa o del extremo C terminal (Feener y col.,1993). Aquellos estudios en los que se ha realizado mutación de esta Tyr, han arrojado resultados contradictorios, pero también han mostrado que la presencia de esta región es necesaria para la internalización del receptor estimulado por insulina. Recientemente se ha visto que esta región tiene un número potencial de

sitios de fosforilación de Ser (Feener y col.,1993). Por lo que se especula que estos sitios de fosforilación de Ser y Thr en el receptor de insulina actúan como un circuito, apagando la señal de insulina. Mutaciones realizadas en estos sitios específicos indican que participan en la regulación de la actividad del receptor de insulina (Tavare y col.,1991; Tavare y col.,1992; Tavare y Siddle,1993). El papel fisiológico de la fosforilación aún no se conoce bien, pero aparentemente se incrementarían los niveles de proteína cinasa C (PKC) y esto resultaría en lo que se conoce como resistencia a insulina (Chin y col.,1993). Por otra parte, los niveles elevados de glucosa en sangre estimulan la actividad de PKC. Esto es un indicio de que en la diabetes la señal de la insulina esta regulada por la PKC (Lee y col.,1989 a,b).

En estado basal, la fosforilación del receptor ocurre sobre los residuos Ser y Thr y cuando se estimula con insulina también hay incremento de la fosfotirosina, la fosfoserina y la fosfotreonina del receptor. Se ha visto que los ésteres de forbol y el AMPc también inducen una fosforilación de Ser y Thr del receptor de insulina y esto se ha asociado con la disminución de la actividad Tyr cinasa (Takayama y col.,1984; Stadmauer y Rosen,1986; Takayama y col.,1988).

Recientemente se ha encontrado que el receptor de insulina tiene actividad Ser cinasa, aunque no se ha aclarado su papel fisiológico. Pero sí se observó que Ser y Thr se fosforilan en respuesta a la insulina y a los ésteres de forbol (Lewis y col.,1990 a,b; Chin y col.,1993).

El receptor de insulina es regulado positivamente por una cascada de fosforilaciones sobre los residuos de Tyr, y es regulado negativamente si estas fosforilaciones se producen sobre los residuos de Ser y Thr. La actividad cinasa es necesaria para la mayoría de las funciones biológicas de la insulina. Esto se ha comprobado con mutaciones en el sitio de unión a ATP, con lo que la actividad de tirosina cinasa es deficiente y por lo tanto, el receptor se torna biológicamente inactivo (Chou y col.,1987; Ebina y col.,1987; Mc Clain y col.,1987; Stumpo y col.,1991).

Efectos biológicos de la insulina

La insulina juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de diversos órganos, tejidos y del organismo en general. Esto se ha podido comprobar mediante estudios que han abordado diferentes aspectos del metabolismo y utilizado sistemas *in vitro* para conocer el efecto de esta hormona sobre diferentes tipos celulares. Hickman y Mc Elduff en 1989 realizaron estudios con una línea celular de osteosarcoma UMR-106-01 para conocer si la insulina regulaba la formación del hueso. Estos autores encontraron que la insulina estimula la replicación y el crecimiento celular ya que incrementa la incorporación de timidina tritiada, el número de células y la concentración de proteínas totales de manera dependiente de la dosis.

En 1995, Hernández-Sánchez y colaboradores estudiaron el papel autocrino/paracrino de la insulina sobre la neurogénesis, utilizando como modelo biológico neuroretinas de embriones de pollo de 6 días. Ellos observaron que la insulina estimulaba la proliferación celular y la diferenciación neuronal, concluyendo que la hormona jugaba un papel autocrino/paracrino en la neurogénesis y en el desarrollo de la retina del pollo.

Estudios realizados en embriones de *Drosophila* revelan que la insulina tiene efectos estimulatorios en el desarrollo de este insecto. Por ejemplo, Seacof y Dewhurst en 1974 estudiaron el efecto que tenía la insulina sobre la diferenciación del embrión y encontraron que la hormona incrementaba el número de células musculares y el contenido de proteínas de manera dependiente de la dosis, concluyendo que la insulina es necesaria para la diferenciación de *Drosophila*. Otros estudios realizados con estos insectos por Pimentel y colaboradores en 1996, revelaron que la insulina actúa como un factor de crecimiento sobre las células neuronales. Dichos autores observaron que cuando se agregó insulina al medio definido adonde se cultivó la línea celular S1 (células neuronales), esta hormona estimuló la incorporación de timidina tritiada. En otros experimentos los mismos autores comprobaron que esta hormona también estimulaba la diferenciación de estas células, ya que observaron que el fenómeno de diferenciación celular de la línea S1 que producía el suero fetal de cabra, sólo podría ser imitado con la presencia de insulina en el medio. El efecto que ejerce la insulina sobre la división celular también ha sido estudiado. Trabajos de Maller y Koontz (1981), utilizando como modelo oocitos de anfibios, demostraron que la

insulina induce la estimulación de la división de estas células, de una manera dependiente de la dosis.

Straus en 1981 y 1984 reportó que la insulina podía ejercer efectos en el crecimiento y la proliferación sobre diferentes modelos biológicos, entre los que señaló:

- Fibroblastos de pollo, humano y ratón
- Células Swiss 3T3 y BALB/c 3T3
- Células transformadas 3T3-SV40
- Hepatocitos normales y Células de hepatoma de rata.
- Células epiteliales de mamíferos y células de carcinoma de mamíferos
- Líneas celulares epiteliales de riñón y células epiteliales de riñón
- Células de músculo liso aórtico
- Células de la íntima de la aorta
- Mioblastos
- Células tumorales pituitarias de rata (Células GH3, GC)
- Células HeLa
- Células de carcinoma de próstata humano (PC3)
- Células de glioblastoma y neuroblastoma
- Células de melanoma
- Células foliculares del ovario
- Células de Sertoli
- Células de teratocarcinoma de ratón

- Células tumorales intestinales de humano

Straus planteó que la insulina puede interactuar no solo con su receptor sino también con el receptor de IGF-I y a través de una de estas vías desencadenar la señalización. Además comentó que el efecto de insulina sobre el crecimiento celular es sinérgico con el de otras hormonas o factores de crecimiento como el FGF, PDGF, PDGF 2α y la vasopresina. Sin embargo en determinados casos el efecto fué debido a la sola acción de la insulina. Straus mostró también algunos ejemplos clínicos que sugieren que la insulina es una importante hormona reguladora del desarrollo del feto humano. Otros investigadores (Temin, 1967, Morell y Froesch, 1972) mostraron que la insulina tiene un efecto estimulador sobre la síntesis de DNA en fibroblastos de la piel de embrión de pollo. Este efecto se observó cuando la insulina se agregó a cultivos estacionarios, por un período de 8-10 horas.

La insulina juega un papel importante en las etapas tempranas del desarrollo del embrión. Al respecto, Girbau y colaboradores (1988) reportaron que el receptor de insulina esta presente en embriones de pollo de dos días y realizaron experimentos para conocer si la insulina actuaba a través de su receptor. Compararon los efectos que provocaban los anticuerpos anti-insulina con los de los anticuerpos contra el receptor de insulina, sobre el crecimiento y la diferenciación en el embrión de pollo. Los resultados mostraron que ambos anticuerpos produjeron alteraciones como pérdida de peso, disminución en

proteínas totales, etc. y concluyeron que los efectos de insulina se producen por la interacción de esta hormona con su receptor.

De Pablo y de la Rosa en 1995 reportaron que la insulina junto a otros factores relacionados como la proinsulina y los IGFs, juegan un papel, al menos "*in vitro*", en el desarrollo neuronal del embrión de pollo. Estas proteínas modificaron las diferentes etapas de la proliferación, así como la diferenciación y maduración celular y estimularon la sobrevivencia celular. Por otra parte existen estudios que revelan el efecto estimulador de insulina sobre el desarrollo, el metabolismo, el crecimiento y la diferenciación de la postneurula del embrión de pollo. Girbau y colaboradores (1987), reportaron que la insulina y el IGF-I incrementan una serie de parámetros de desarrollo celular.

FACTORES DE CRECIMIENTO SIMILARES A LA INSULINA (IGFs)

Utilizando técnicas de cromatografía en gel, cromatografía de intercambio iónico y electroforesis en geles de poliacrilamida, Rinderknecht y Humbel (1976 y 1978 a,b) encontraron en el suero de humanos dos moléculas que tenían una gran semejanza estructural con la insulina a las que nombraron como factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs).

Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) son hormonas polipeptídicas que tienen una gran homología con la proinsulina y son potentes

agentes anabólicos y mitogénicos *"in vivo"* e *"in vitro"* (Baxter,1986; Zapf y Froesch,1986; D'Ercole,1987; Daughaday y col.,1989; Humbel,1990; Quin,1992; Coick y col.,1993). Se considera que el hígado es su principal fuente de producción, pero las mayores concentraciones de IGF se encuentran en la sangre. Los IGFs, al igual que la insulina, participan en la estimulación de eventos involucrados en el desarrollo de los organismos. Ellos son requeridos para el crecimiento y desarrollo normal del feto y también después del nacimiento.

Se conocen hasta el momento dos tipos de IGFs, el IGF-I y el IGF-II, que difieren poco en su estructura, son sintetizados por diferentes tipos de células y pueden actuar sobre su blanco de manera autocrina, paracrina y/o endocrina. La comparación de la estructura primaria de los IGFs y de la proinsulina indica que entre ellos existe una gran similitud y que deben originarse de un ancestro común (Rinderknecht y Humbel,1978 a,b) (Fig.3).

En la molécula de IGF se identifican cuatro dominios: A, B, C y D. Los dominios A y B son homólogos de los dominios A y B de la insulina. IGF-I es un péptido de 70 aminoácidos de cadena simple con tres puentes disulfuro que se localizan en la misma posición que en la molécula de insulina. La región de la cadena A-B de insulina y la A-B de IGF-I presentan un 50% de homología. La cadena A-B de IGF-I tiene unido un péptido de 12 aminoácidos diferente al péptido C de la molécula de proinsulina (35 residuos). Una de las diferencias entre insulina e IGF-I es que este último tiene una pequeña cadena compuesta por un residuo de 8 aminoácidos localizado en el extremo carboxilo terminal de la cadena A. El

IGF-II es un polipéptido de cadena simple de 7.5 Kda y 67 aminoácidos con tres puentes disulfuro y su precursor tiene 180 aminoácidos.

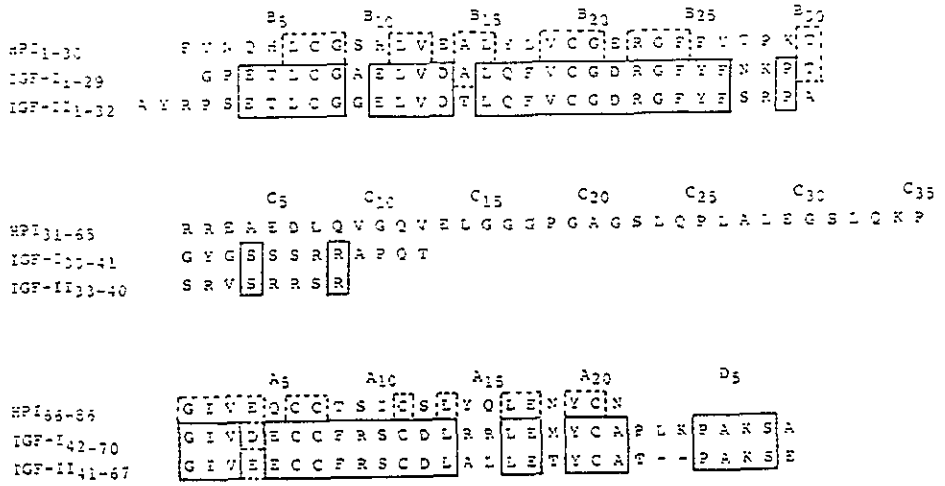


Fig. 3. Estructura primaria de la proinsulina (HPI) y de los IGF-I y II humanos. Los cuadros de líneas sólidas indican residuos idénticos entre IGF-I y II. Los cuadros de líneas punteadas indican residuos idénticos entre la HPI y los IGF-I y/o II. Tomado de Rinderknecht y Humbel, 1978.

Receptor de IGF-I

Todos los efectos que pueden provocar los IGFs están mediados por su receptor. Este es sintetizado como un polipéptido de cadena simple en el ribosoma, y es modificado postraduccionalmente eliminándose la secuencia del péptido señal. Este pro-receptor se corta para dar lugar a dos cadenas, una de 706 aminoácidos que formará la subunidad α del receptor y otra de 626 aminoácidos para la subunidad β . Estas subunidades se encuentran en regiones

diferentes de la célula: α en la región transmembranal, es la que es reconocida por el ligando y β se localiza del lado del citoplasma celular. Estas subunidades se encuentran unidas por puentes disulfuro formando el medio receptor $\alpha\beta$ que se une también por puentes disulfuros en la subunidad α con otro medio receptor $\alpha\beta$, formándose así el holoreceptor maduro $2\alpha-2\beta$ (Fig. 2).

La especificidad de unión del ligando con su receptor está dada por la región rica en cisteína que se encuentra en la subunidad α de la región transmembranal del receptor, mientras que la actividad tirosina cinasa viene dada por la subunidad β citoplasmática. Aquí es donde reside la similitud estructural entre el receptor de IGF-I y el de insulina; ambos forman receptores heterotetraméricos que son idénticos en tamaño y tienen aproximadamente entre un 50-60 % de homología secuencial y un 84% de homología en el dominio tirosina cinasa (Czech,1989).

Dominio extracelular. Subunidad α

A pesar de la gran similitud entre los receptores para IGF-I e insulina, cada uno es específico para cada ligando, aunque en determinados casos pueden reconocer a ambos. El receptor para IGF-I en membranas celulares intactas muestra una constante de disociación calculada (K_d) sobre el orden de 0.2-1nM para IGF-I, mientras que para insulina es 100 a 1000 veces menor (Steele y col.,1988; Werner y col.,1991; Frattali y Pessin,1993). El receptor de insulina tiene

un comportamiento similar, ya que tiene una alta afinidad por insulina, siendo esta afinidad 100 veces menor para IGF-I. Otros estudios han demostrado que esto depende del tipo celular con el que se realice el ensayo, pero en general tiene una afinidad 15 veces menor que para IGF-I (Steele y col., 1988; Germain y col., 1992).

Diversos anticuerpos monoclonales dirigidos contra dominios de la subunidad α se han usado para estudiar la interacción estructura función (Soos y col, 1992; Xiong y col, 1992). Los anticuerpos dirigidos contra la región rica en cisteína, incluyendo el bien caracterizado anticuerpo bloqueador del receptor, α 1R-3, inhiben la unión al IGF-I (Flier y col, 1986). Sin embargo estos anticuerpos también pueden funcionar como agonistas IGF débiles (Soos y col, 1992; Steele y col, 1990; Kato y col, 1993). Anticuerpos monoclonales contra regiones del receptor de IGF-I adyacentes a la región rica en cisteína estimulan la unión al IGF-I, y algunos de estos anticuerpos incrementan la afinidad del receptor para la insulina a aproximadamente su afinidad normal para IGF-I (Soos y col, 1992). Estos datos en conjunto coinciden con los resultados obtenidos usando receptores quiméricos (Schumacher y col, 1991; Gustafson y Rutter, 1990), que mostraron que la región rica en cisteína es necesaria para el reconocimiento de IGF-I por su receptor. Las regiones adyacentes a dicha región son necesarias para conferir especificidad del receptor de insulina para la unión con ella.

Dominio citoplasmático. Subunidad β

La región citoplasmática del receptor posee el dominio catalítico de tirosina cinasa altamente conservado. La unión de IGF-I con su receptor *in vivo* provoca una fosforilación de los residuos de tirosina y de serina (Steele y col.,1988; Kato y col.,1993). La autofosforilación de los residuos de tirosina por la unión ligando-receptor ocurre tanto para insulina como para IGF-I. La reacción es *trans* intramolecular, el residuo de tirosina fosforilado de una subunidad β fosforila el residuo de la otra subunidad β para formar el receptor maduro (Treadway y col.,1991; Frattali y col.,1992; Frattali y Pessin,1993).

Para el caso de insulina la autofosforilación y la actividad de tirosina cinasa son esenciales para la que ocurra la cascada de señalización. Se ha demostrado que una mutación en esta región del receptor provoca lo que se conoce como resistencia a insulina (Taylor y col.,1992). Estudios similares con células transfectadas NIH-3T3 confirmaron que la actividad tirosina cinasa presente en la subunidad β del receptor es fundamental para que se produzca la transducción de señales (Kato y col.,1992). Estos autores realizaron mutaciones en el sitio de unión de ATP de este dominio catalítico del receptor de IGF-I, lo cual inhibió la incorporación de timidina tritiada y alteró la actividad fosfoinositol-3-cinasa.

Receptor de IGF-II

El receptor de IGF-II es el mismo que utiliza el catión independiente manosa 6- fosfato y se le conoce con el nombre de receptor de IGF-II / MANOSA 6 fosfato. Este receptor se encuentra en la membrana celular y presenta un dominio extracelular bastante grande y un pequeño dominio intracelular. Es un receptor monomérico que une los residuos de manosa 6-fosfato en las enzimas lisosomales (Nissley y col.,1991; Nielsen,1992) (Fig. 4).

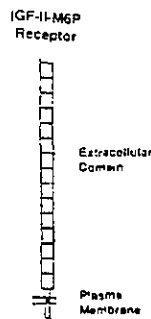


Fig. 4. Esquema de la estructura del receptor para IGF-II/manosa-6-fosfato. Tomado de LeRoith y col., 1995.

El receptor para IGF-II se ha encontrado en varias células embrionarias y adultas, pero muchos investigadores señalan que este receptor reconoce al IGF-II pero que los efectos biológicos que ejerce esta molécula sobre las células son mediados por el receptor de IGF-I. Usando anticuerpos contra el receptor IGF-II / manosa-6-fosfato se demostró que el bloqueo del mismo no afectó las funciones

biológicas de IGF-II y viceversa (Mottola y Czech,1984; Kiess y col.,1987; Stracke y col.,1989; Adashi y col.,1990; Hartmann y col.,1992; Hirai y col.,1993).

Los mecanismos de acción del receptor para IGF-II se conocen poco claros. Este receptor puede claramente mediar en la captación y la degradación de IGF-II, y se ha acumulado un número importante de evidencias que sugieren que puede mediar también algunas de las acciones del IGF-II. La pérdida de este receptor en el ratón está asociada con la muerte fetal in útero (Filson y col.,1993). La vía de señalización del receptor IGF-II / MAN-6-P involucra la activación de proteínas de unión al GTP.

Funciones biológicas de los IGFs.

Los efectos de los IGFs son debidos a la interacción con sus receptores, que desencadenan la conocida cascada de señalización que lleva finalmente a la estimulación de diferentes procesos anabólicos. Entre éstos se puede mencionar la activación metabolismo de proteínas y de carbohidratos, que son conocidos como los efectos primarios o tempranos, y efectos sobre la replicación y diferenciación celular, que son los efectos secundarios o tardíos.

Los IGFs en la circulación no están en forma libre, sino que se encuentran unidos a una familia de proteínas transportadoras que se plantea pueden estimular o inhibir la actividad de estos factores. Hasta el momento se conocen un total de

seis proteínas que se han clonado y secuenciado. Se han descritos sus funciones en diferentes tipos celulares.

A estas proteínas transportadoras se le han atribuido cuatro funciones fundamentales que tienen que ver con la regulación de las funciones biológicas de los IGFs: a) actúan como proteínas transportadoras de los IGFs en el plasma y también en el control del flujo de estos factores en el espacio vascular, b) prolongan la vida media de los IGFs y regulan su proceso metabólico, c) proporcionan un marcador de localización específico del tipo celular y del tejido, d) modulan la interacción de los IGFs con sus receptores y de esta forma pueden controlar los efectos biológicos de estos factores. Recientemente se ha visto además que una de estas proteínas puede tener algún efecto sobre las funciones celulares, ya que puede actuar a través de un receptor de membrana propio.

Uno de los efectos más estudiados de los IGFs "in vitro" ha sido el que producen sobre la progresión del ciclo celular, mediante la estimulación de la síntesis de DNA y la replicación celular. El resultado final es que las células pasan de una fase a otra del ciclo celular. Este fenómeno ha sido estudiado en la línea celular BALB/c 3T3 y se ha visto que células detenidas en la fase G₀ del ciclo celular entraron en G₁ cuando estaba presente IGF-I solo, o combinado con el factor de crecimiento de plaquetas (PDGF), o con el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF). La presencia del factor resultó en la síntesis de DNA y por consiguiente en la proliferación celular. Este efecto se logra en este caso a

través de la formación del complejo IRS1-GRB2-SOS que activa a la proteína RAS (Lu y Campisi,1992).

El efecto mitogénico (proliferación celular) que ejerce este factor se ha encontrado en diferentes tipos celulares como fibroblastos, condrocitos, osteoblastos, queratinocitos, células foliculares de la tiroides, células del músculo liso, células epiteliales de mamíferos, células de la granulosa, espermatogonias, células de Sertoli, líneas celulares cancerígenas, etc (Sara y Hall,1990; Lowe,1991; Giudice,1992; Mc Cauley,1992; Cohick y Clemmons,1993). En otros estudios de proliferación celular se ha observado que en cultivos de condrocitos de pollo el IGF-I tiene un efecto estimulador mayor que el bFGF o que PDGF (Bohme,1992).

El efecto autocrino del IGF-I sobre la proliferación se evidenció en cultivos de células foliculares de la tiroides de la rata transformadas con un vector de expresión de IGF-I humano. En este modelo se observó que la TSH estimula la incorporación de timidina tritiada a las células (Dai y col.,1992; Dai col.,1992). También existen estudios realizados en cultivos de células tímicas, en las que se observa que el IGF-I estimula la secreción hormonal y la síntesis de DNA (Timsit y col.,1992). Asimismo, la proliferación de células progenitoras eritroides y de linfocitos T es estimulada por IGF-I e IGF-II, a través del receptor de IGF-I .(Merchav y col.,1992; Kooijman y col.,1992; Merchav y col.,1993).

En células de la granulosa de la rata se ha observado que el IGF-I tiene un efecto estimulador sobre la incorporación de timidina tritiada. Este efecto se potencia a bajas concentraciones de FSH o (Bu)₂ cAMP, pero es inhibido a altas concentraciones de los mismos (Bley y col.,1992). En cultivos libres de suero de espermatozonias de rata, se ha observado que IGF-I e IGF-II tienen un efecto estimulador sobre la síntesis de DNA de estas células.

Florini y Magri,1989, demuestran que los IGFs son potentes inductores de la diferenciación total de los mioblastos. Este grupo ha demostrado que IGF-I induce la expresión del gen de la miogenina y que la diferenciación de estas células se bloqueó cuando se utilizó un oligonucleótido antisentido complementario de IGF-I. Este dato sugiere fuertemente que la expresión de este gen es mediada por la acción de IGF-I (Florini y col.,1990,1991). Bajo ciertas condiciones los mioblastos pueden secretar IGF-II, que por sí solo también induce diferenciación. Esta acción autocrina de IGF-II, se puede bloquear exponiendo las células a un oligonucleótido antisentido complementario del RNAm de IGF-II (Florini y col,1991).

FACTOR AISLADO DEL HEPATOPANCREAS DE LA LANGOSTA

***Panulirus argus* (INIHEP)**

Existen varios trabajos adonde se reporta la presencia de moléculas similares a la insulina en invertebrados, fundamentalmente en insectos y moluscos

(Martinez y col, 1973). Estas moléculas comparten características, bioquímicas y estructurales (Kramer y col, 1982), lo que sugiere que se han conservado evolutivamente y juegan un papel importante en el desarrollo y crecimiento de estos organismos, tanto en la etapa embrionaria como en el desarrollo después del nacimiento. A estas moléculas que reaccionan inmunológicamente con los anticuerpos anti-insulina de mamíferos se les conoce con el nombre genérico de "insulinas inmunorreactivas" (Sanders, 1983a), se les ha encontrado en vertebrados, invertebrados y organismos unicelulares eucariontes y procariontes (Falkmer, 1972; Falkmer y col, 1973; Falkmer y Ostberg, 1976; Tager y col, 1976; Fritsch y col, 1976; Plisetskaya y col, 1978; Duve y col, 1979; Epple y col, 1980; Le Roith y col, 1980,1981). La insulina inmunoreactiva ha sido confirmada en 18 especies de insectos (Kramer y col, 1982) y otras tantas especies de invertebrados (Flakmer y col 1973,1981). También se ha encontrado en la langosta *Homarus americanus* (Sanders, 1983a) y en otra especie de langosta *Panulirus argus* (Gallardo y col. 1994; Galindo y col, 1995). Las técnicas más utilizadas para detectar estas proteínas han sido el radioinmunoanálisis (RIA) y las técnicas inmunohistoquímicas, utilizando en este caso el método de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) de Sterberger y col., (1970).

En 1994, Gallardo y col., reportaron la presencia de una molécula con características similares a la insulina, aislada del hepatopancreas de la langosta *Panulirus argus* (INIHEP). Realizaron la extracción empleando el método para la extracción de insulina de mamíferos, reportado por Deroven (1962), con algunas

modificaciones realizadas por Sanders (1983^a) para su uso en el tejido de langosta.

Eluyendo el homogenado del hepatopancreas de la langosta *Panulirus argus* en una columna de Sephadex G-25, se encontró que existe al menos un péptido que es reconocido por los anticuerpos dirigidos contra la insulina humana. Este dato corroboró en esta especie el hallazgo de Sanders en la langosta *Homarus americanus*. El procedimiento para la extracción del péptido y la semipurificación incluyó la precipitación del mismo con solventes y la separación de este concentrado por una columna de Sephadex G-50. En el eluído se detectó la insulina inmunorreactiva por RIA. Realizando ensayos de radiorreceptores se observó desplazamiento de la insulina humana marcada por aquellas no marcadas, en este caso, humana e inmunorreactiva aislada de la langosta. Estos datos indicaron que la hormona inmunorreactiva aislada de la langosta fue capaz de inhibir competitivamente, y en forma dependiente de su concentración, la unión de la hormona humana marcada a su receptor en tejido placentario.

Efectos Biológicos

Gallardo y col., 1994, realizaron experimentos "*in vivo*" para probar el efecto de INIHEP sobre el crecimiento de postlarvas de camarón *Penaeus schmitti* en estadio P1 10. El tratamiento consistió en alimentar a estas postlarvas con dos dietas microencapsuladas, una testigo sin INIHEP y otra suplementada con el

péptido. Los animales fueron alimentados diariamente por un período de 15 días y se mantuvieron en condiciones controladas. Los resultados obtenidos muestran que el peso final alcanzado por los animales alimentados con la dieta suplementada fue significativamente mayor (57.5%) que el de los testigos. El tratamiento con INIHEP también incrementó significativamente la tasa de crecimiento de las postlarvas de camarón.

Otro de los experimentos permitió evaluar el efecto de estos péptidos similares a la insulina sobre la incorporación de la timidina tritiada al DNA de juveniles de langostas *Panulirus argus*. Gallardo (1998) observó que el INIHEP estimuló la síntesis de DNA en el hepatopancreas de los animales (Gallardo, 1998). Por lo tanto es posible que esta molécula sea importante en el crecimiento en estas especies, y que existan receptores de membrana que interactúan con ella transmitiendo la señal mitogénica. Esta señal actuaría probablemente a través de un conjunto de proteínas endocelulares entre las que estarían las MAP cinasas.

TESTÍCULO

El sistema reproductor masculino del pollo está formado por un par de testículos, el epidídimo, el conducto deferente (transporta los espermatozoides al pene) y el pene.

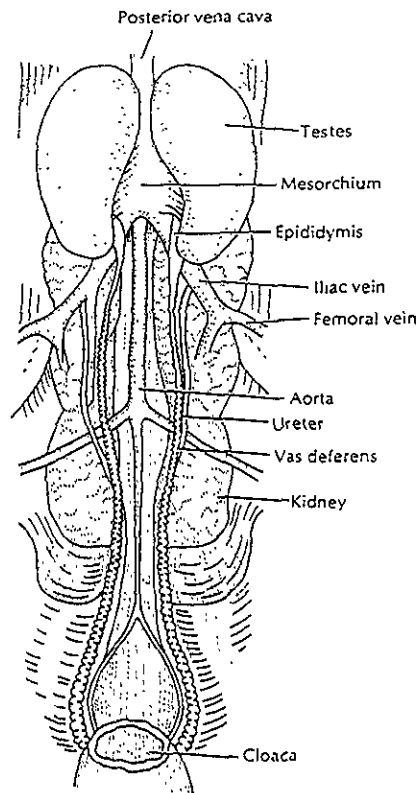


Fig. 5. Esquema del sistema reproductor masculino de pollo. Tomado de Sturkie, 1976.

El testículo forma parte del órgano reproductor masculino y cumple dos funciones fundamentales aparentemente separadas: 1)- Espermatogénesis: Proceso que se realiza en los túbulos seminíferos, por el cual las células germinales sufren divisiones y maduran para finalmente dar lugar a los espermatozoides y 2)- Esteroidogénesis: Tiene lugar en las células intersticiales (de Leydig), cuya función fundamental es la producción de testosterona, creando y manteniendo los caracteres sexuales secundarios propios del macho.

Los testículos se localizan intraabdominalmente en el extremo cefálico de los riñones en relación ventral a los mismos. El peso de los testículos es aproximadamente del 1% del peso corporal total, y cuando se alcanza la madurez sexual pesan de 9 a 30 gramos cada uno dependiendo entre otros factores de la raza, y del estado nutricional de los animales (Sturkie, 1976).

Se ha demostrado que en el pollo se produce aumento del peso corporal así como testicular durante el período neonatal y que la secreción de testosterona también aumenta en esta etapa, para después decaer al décimo día de vida. Los mismos autores encontraron que en todas las edades comprendidas entre los 2 y 12 días postnatales, los pollos responden al estímulo con gonadotropina coriónica, pero este incremento es menor con la edad del animal (Pedernera y col, 1984).

El parénquima de los testículos de las aves está formado por los túbulos seminíferos, tejido intersticial y tejido vascular. No está dividido en lóbulos (Lake, 1957). El espermatozoide pasa de los testículos al epidídimo, en el que es almacenado

en el saco seminal y se elimina luego por los vasos deferentes. En las aves los dos testículos no son de igual tamaño, el izquierdo es menor que el derecho. (Jameson Jr, 1988) Por la misma razón que no existan divisiones ni lóbulos, los túbulos seminíferos tienen un diámetro grande y un gran contenido de fluido. El conducto deferente, es un tubo largo que corre por la superficie posterior medioventral del riñón paralelamente con los uréteres, y termina en la pared de la cloaca.

El testículo del embrión de pollo de 18 días de edad presenta una verdadera túnica albugínea que lo rodea. Entre el epitelio superficial y la región medular en la que se ubican los cordones testiculares, se encuentra tejido laxo y material fibrinoide constituido por colágena y fibronectina. Se observan también algunos vasos sanguíneos. En el intersticio se encuentran células de Leydig con sus características inclusiones lipídicas, algunas de las cuales tienden a formar conglomerados. Rodeando los cordones testiculares se encuentran células pericordales o peritubulares que mantienen la integridad de los cordones y participan en la formación de la lámina basal. Entre las células peritubulares se encuentran algunas células con apariencia fibroblastoide que son las precursoras de las Leydig maduras. Delimitando los cordones testiculares se observa la lámina basal y hacia el interior se encuentran espermatogonias de gran tamaño con citoplasma claro y un núcleo de gran tamaño con cromatina poco condensada, y células de Sertoli de menor tamaño que las espermatogonias, que presentan un núcleo pequeño en donde pueden observarse varios nucleolos. Resultados similares realizando estudios morfológicos en embriones de pollo de 17 días de

desarrollo muestran que en esta etapa el cordón seminífero y el tejido intersticial se encuentran bien definidos, y describen la existencia de tres tipos celulares en el tejido intersticial (I, II, III). La primera tiene apariencia de fibroblasto, las segundas son células transicionales, con forma de huso y las de tipo III son células de Leydig con las características propias de una célula esteroidogénica, que forman islotes separados del cordón seminífero y de las células tipo I y II (Aguilar, Romano y Pedernera, 1981).

Las células somáticas del testículo (Células de Sertoli), crean un microambiente propicio para el óptimo desarrollo de las células germinales. Estas células proliferan durante el desarrollo fetal y neonatal, pero cesan la división al iniciarse la espermatogénesis. Se sabe que las células de Sertoli tienen funciones que son críticas para el buen desarrollo y funcionamiento del testículo. Sirven como barrera hematotesticular, sintetizan y secretan proteínas como la proteína transportadora de andrógenos (ABP), también sintetizan proteínas transportadoras de metales y diferentes factores de crecimiento que tienen papeles importantes en el desarrollo y buen funcionamiento de la gonada. Entre estos factores se encuentra el IGF-I que es producido por las células de Sertoli, las células de Leydig y las células germinales de ratas inmaduras (Hansson y col. 1989). La producción de este factor en el testículo de la rata es regulada por las hormonas hipofisiarias, LH y FSH. Una de las funciones principales de este factor es la de regular las funciones de las células de Leydig diferenciadas (Khan y cols. 1987). Otros investigadores han reportado también efectos del IGF-I sobre el testículo, (Bernier y cols 1986; Perrard y cols. 1987 y Benahmed y cols 1987), observando

que el pretratamiento de células de Leydig porcinas con IGF-I estimula la producción de AMPc y testosterona "in vitro".

Las células de Leydig son las encargadas de sintetizar las hormonas esteroideas a partir de los ésteres de colesterol. La testosterona es el esteroide más importante de los producidos en el testículo. Se plantea que estas células sólo proliferan durante etapas tempranas de la diferenciación del testículo. Durante la maduración adquieren una morfología característica de células productoras de esteroideos, con abundante retículo endoplásmico liso, mitocondrias con crestas tubulares e inclusiones lipídicas (Knobil, 1988).

Las células de Leydig diferenciadas presentan alta actividad de 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, NADPH, NADH, fosfatasa alcalina y glucosa-6 - fosfato deshidrogenasa.

Hormonas Testiculares y Esteroidogénesis en Aves

Las hormonas esteroideas también son necesarias para el crecimiento de los órganos reproductores de las aves. Los testículos del pollo sintetizan estrógenos y andrógenos. Hohn y Cheng (1967), reportaron altas concentraciones de estrona, estradiol y estriol en los testículos de pollo, sin embargo otros investigadores no han reportado la presencia de estrógenos en los testículos de esta ave (Delrio y col.,1967). Las progestinas también han sido identificadas en el

testículo, pero no queda claro si estas actúan localmente, si tienen sitios de acción extratesticulares o si son solamente precursores de la testosterona (Cardinali, 1970; Delrio, 1967). En el pollo, al igual que en los mamíferos, se ha identificado a la testosterona como el principal andrógeno sintetizado por las células de Leydig.

Gonadotropinas

Las hormonas glucoproteínicas de la hipófisis y de la placenta comprenden una familia de hormonas estrechamente relacionadas que se encuentran en todos los vertebrados. Debido a que existe una gran homología estructural entre las diferentes especies se considera que han evolucionado de un precursor común (Bentley, 1982). Las que conforman este grupo son la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y las llamadas gonadotropinas. Las gonadotropinas son las hormonas estimulantes del folículo (FSH) y luteinizante (LH) de origen hipofisiario, y la gonadotropina coriónica humana (hCG) de origen placentario. Todas ellas tienen dos cadenas peptídicas (α y β), unidas en forma covalente por puentes disulfuro; a cada una se unen grupos carbohidratos constitutivos. Los azúcares que constituyen del 15 al 31% del peso molecular de estas hormonas son la fucosa, la manosa, la galactosa, la glucosamina y la galactosamina. También se puede encontrar ácido siálico de manera inconstante. La secuencia de aminoácidos de la cadena α es idéntica o muy similar para todas las hormonas. Las cadenas β confieren especificidad por la hormona a la molécula completa y

tienen importantes diferencias en la secuencia de aminoácidos por lo que distinguen a una hormona de otras (Williams, 1985).

Los órganos blanco de las gonadotropinas, son las gonadas masculina o femenina. El tejido gonadal presenta receptores específicos para cada una de estas hormonas. En el caso de la LH, esta hormona comparte su receptor con el de la gonadotropina coriónica (hCG) (Karsch, 1984).

Efectos y Mecanismo de Acción de las Gonadotropinas en el Testículo

Es sabido que la LH y la hCG tienen la capacidad de regular a sus propios receptores en el humano y otros mamíferos. Esta regulación puede ser positiva y mantiene o estimula el número de receptores para las gonadotropinas. Pero también puede regular negativamente la cantidad de receptores en la célula.

Estudios realizados por Huhtaniemi y col, 1981; Tahka, 1986; Tsuruhara y col, 1977; Dufau y col, 1988, muestran que las gonadotropinas ejercen un control dual sobre la función de las células de Leydig de testículo adulto. Bajas dosis de LH/hCG mantienen los receptores y las hormonas esteroideogénicas en un estado de "regulación positiva". Por el contrario altas dosis de estas hormonas causan una "regulación negativa" del receptor y desensibilización de los mismos.

En la gónada masculina los receptores a LH/hCG se encuentran en las células de Leydig y los de la FSH en las células de Sertoli. La LH y la hCG producen efectos rápidos y a largo plazo. La acción a corto plazo consiste en la estimulación de la esteroidogénesis, y tiene como consecuencia el aumento de la secreción de testosterona. La unión de la LH o hCG a sus receptores ocasiona un incremento en la producción de AMPc intracelular y la activación de la proteína quinasa dependiente de él (Cooke y col., 1977; Dufau y col., 1979). Estas hormonas provocan un aumento en la actividad de la esterasa del colesterol y estimulan la fosforilación del sistema citocromo P-450. También inducen una mayor actividad en las enzimas encargadas de la conversión de la pregnenolona a testosterona: 17 α -hidroxilasa y C17,20-liasa (desmolasa), 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. El mecanismo exacto no se conoce pero se piensa que la estimulación aguda de la síntesis de AMPc ocasiona una elevación de la afinidad por el sustrato, el colesterol, con la cadena enzimática mitocondrial (P-450_{scc}). El colesterol es cortado por la P-450_{scc} para producir pregnenolona, la que es metabolizada posteriormente a testosterona por enzimas asociadas con el retículo endoplásmico liso.

En relación con los efectos a largo plazo de LH/hCG, se describe que la administración de estas hormonas en forma crónica, durante 5 semanas, produce la hipertrofia e hiperplasia de las células de Leydig (Tahka, 1986).

Estudios realizados utilizando como modelo células testiculares de rata adulta mostraron que una dosis única fisiológica de hCG induce un aumento en el número de receptores para esta hormona. Este fenómeno ha sido considerado como un efecto trófico tardío de la hCG en cuanto a la inducción y el mantenimiento de receptores (Huhtaniemi y col,1981). La administración de dosis altas de hCG produce en un primer momento un rápido aumento del número de receptores LH/hCG, que se explica por un desenmascaramiento de los mismos o por la incorporación de nuevos receptores a la membrana (Huhtaniemi,1984).

Distintos investigadores han estudiado las modificaciones que se asocian al fenómeno de "regulación negativa" para estos receptores. Se ha observado que el tratamiento agudo con hCG induce dos tipos de alteraciones, que son dependientes de la dosis y del tiempo de exposición a esta hormona. Entre estas se encuentran la pérdida de receptores a LH/hCG y las alteraciones esteroideogénicas, que pueden ser de dos tipos: "tardía" en los pasos posteriores a la formación de progesterona y "temprana", que se presenta antes de la formación de pregnenolona. Experimentos *in vivo* e *in vitro* en los cuales fueron utilizadas altas dosis de hCG demostraron la existencia de una rápida pérdida de receptores para LH/hCG ulterior al tratamiento; estos efectos perduraron hasta una semana, produciéndose la recuperación dos días después de este período (Sharpe, 1976; Haour y Saez, 1977; Hsueh y col, 1976; Catt y col, 1979; Schumacher, 1976).

Función Testicular

En el embrión de pollo, los testículos se encuentran morfológica y funcionalmente diferenciados a los ocho días de desarrollo ya que son capaces de producir testosterona en pequeñas cantidades (Woods, 1977 y Guichard, 1973). Acorde con este hecho Chieffi (1964) y Narbaitz (1963), encontraron actividad de la enzima $\Delta 5$ - 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa así como la presencia de lípidos en gonadas de esta edad.

La función testicular en el pollo también es controlada por el eje hipotálamo-hipófisis-gonada (Woods, 1987). Naibandov (1948), hipofisectomizó pollos machos y observó que las gónadas se atrofiaban, que había una regresión de los órganos sexuales y que se producían algunos cambios en el plumaje. Se demostró que FSH es necesaria para iniciar el crecimiento de los túbulos seminíferos. Por otro lado la LH interviene en el desarrollo de las células de Leydig y en la subsiguiente síntesis y secreción de andrógenos (Graber y col., 1967).

En el caso de la prolactina, Nolvandov (1945), realizó estudios para conocer su efecto sobre los testículos de pollo y encontró que al administrar la prolactina los testículos se atrofiaban, disminuyendo la producción de andrógenos, y una reducción del tamaño de la cresta. Sin embargo otros trabajos no están de acuerdo con estos resultados por lo que no pueden extenderse a todas las especies de aves.

Woods, (1977 a,b), estudió el efecto de las gonadotropinas en la síntesis de andrógenos. Utilizando la técnica de inmunocitoquímica, determinó que después que los embriones de pollo eran decapitados presentaban un decremento de los andrógenos del testículo en el día 13.5 de incubación, y que éstos se restablecían cuando se realizó transplante de adenohipófisis o se adicionaba LH en la membrana corioalantoidea (CAM). Asimismo los embriones hipofisectomizados presentaron bajos niveles de testosterona en plasma, y el agregado de LH o bien un transplante de adenohipofisis a la membrana corioalantoidea revirtió el efecto de la ablación de la hipófisis. Estos datos demostraron que la síntesis y secreción de testosterona está bajo el control de la hipófisis, estableciéndose el eje adenohipofisario-testicular a los 13.5 días de desarrollo embrionario (Woods,1983).

Hormonas Esteroides

La estructura química básica de los esteroides son cuatro anillos aromáticos, tres cicloexanos (A,B,C) y un ciclopentano (D), toda la molécula es conocida como ciclopentanoperhidrofenantreno. Sobre este núcleo se agregan cadenas laterales las que determinan las diferentes clases de esteroides.

El compuesto de 27 átomos de carbono (C27) con núcleo colestano y grupos metilo en posición C10 y C13 y una cadena con ocho carbonos en C17,

corresponde al colesterol, compuesto básico a partir del cual se forman todas las hormonas esteroides.

A partir del colesterol se forman los compuestos de 21 átomos de carbono (C21) que corresponden al núcleo de pregnano. Estos compuestos por su actividad biológica se llaman progestinas como pregnenolona, progesterona, 17-hidroxiprogesterona, 20-hidroxiprogesterona.

Las progestinas dan origen a los andrógenos por pérdida de la cadena en C17 lo que origina los compuestos con un núcleo de androstano. Los andrógenos son precursores biosintéticos de los estrógenos porque pueden ser aromatizados. Estos últimos han perdido el grupo metilo del C10, tienen 18 carbonos (C18), su anillo A está aromatizado y su grupo básico es el estrano (Braid, 1984).

Biosíntesis de Testosterona

Existen dos vías para la síntesis de testosterona, la vía $\Delta 4$ y la $\Delta 5$ (Fig. 6). Todos los esteroides intermediarios de las dos vías son producidos por los testículos en pollo y en otras aves. (Lake y Furr, 1971; Nakaruma y Tanabe, 1972; Galli y col., 1973; Guichar y col. 1973^{a,b}).

Por técnicas bioquímicas e histoquímicas se han identificado en testículos de pollo enzimas que metabolizan a los esteroides y que a su vez son marcadores

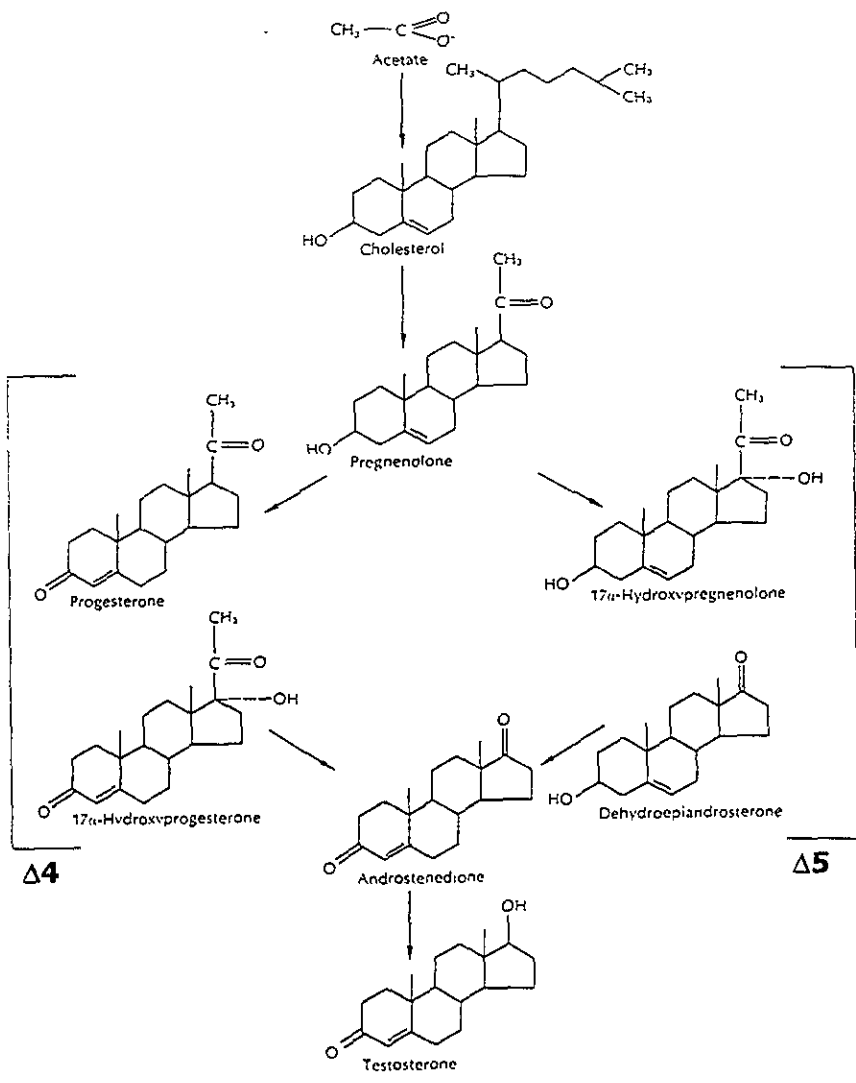


Fig. 6. Esquema que representa las dos vías ($\Delta 4$ y $\Delta 5$) de síntesis de testosterona en aves. Tomado de Sturkie, 1976.

específicos de las células esteroidogénicas (Lake y Furr, 1971; Nakamura y Tanabe, 1972; Lofts y Murton, 1973). Nakamura y Tanabe, 1972, reportaron que los testículos de pollos adultos pueden utilizar la vía $\Delta 4$ y la $\Delta 5$ para la síntesis de testosterona. Como ocurre en mamíferos, la actividad enzimática relacionada con la secreción de testosterona a partir de pregnenolona (ambas vías) se encontró en la fracción microsomal de homogenados de testículos. Estudios *in vitro* en pollos mostraron que la gonada embrionaria es capaz de sintetizar testosterona de manera más eficiente por la vía de dehidroepiandrosterona (DHEA), Guichard y col., 1973a. En estudios realizados utilizando cultivo de órgano se mostró que el testículo de embrión de pollo puede sintetizar testosterona a partir del séptimo día de vida (Guichard col., 1973a; Galli y Wassermann, 1973), en el desarrollo pre y postembrionario. Se ha encontrado que los metabolitos de la vía de síntesis de testosterona cambian con la edad del animal (Sturkie, 1976). En mamíferos estos cambios en la síntesis de andrógenos están asociados con la maduración del sistema enzimático (Linder, 1961).

Se ha informado que los testículos del embrión de pollo son capaces de producir hormonas sexuales femeninas, sin embargo no hay evidencias de que circulen en sangre. A este respecto existe un reporte de Fraps y col., 1949, que informa de la presencia de progesterona en la sangre de pollos machos, pero se sabe que el bioensayo que ellos utilizaron detecta otros esteroides. Guichard y col 1973a reportan que los testículos de embriones de pollo pueden sintetizar pequeñas cantidades de estrona y estradiol cuando son incubados *in vitro*.

Woods y Domm en 1966 demostraron la presencia de la enzima $\Delta 5-3\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa, que es la responsable de convertir la pregnenolona a progesterona, y la DHEA a androstenediona en las células de Leydig de testículos de embriones de pollo.

La posibilidad de que la actividad secretora de las células de Leydig de las aves estuviera estimulada por la LH fue sugerida por Follet y col., (1972), quienes encontraron que los niveles de LH en el plasma se incrementaban de manera significativa después que las codornices eran expuestas a cuatro días de fotoestimulación. Otros autores (Nicholls y Graham 1972), observaron que cuando la codorniz Japonesa se exponía durante tres días a estímulo de luz, las células de Leydig sufrían un cambio de células no secretoras a células secretoras.

Woods (1987) estudió la maduración del eje hipotálamo-hipófisis-gonada y observó que éste comienza a regular la adenohipófisis-gonada durante el último tercio del desarrollo en el embrión de pollo. También encontró que a partir del día 13 de desarrollo del embrión macho, la LH comienza a regular la síntesis y secreción de testosterona. Asimismo la LH incrementa el número de receptores homólogos en las células de Leydig, lo que conlleva a un aumento de la síntesis de testosterona, que a su vez disminuye los niveles de LH en plasma, estableciéndose así un mecanismo de retroalimentación negativo.

Por otra parte, estudios realizados en el pato Pekín revelan que el incremento del tamaño de las células de Leydig al inicio del ciclo reproductivo es paralelo al incremento de los niveles de testosterona en plasma (Garnier y Attal, 1970; Garnier, 1971). Castro y Romano (1994) estudiaron el efecto de FSH y hCG en el mantenimiento de la producción basal de testosterona por células de testículos de pollos recién nacidos. Encontraron que las gonadotropinas estimulan la producción de testosterona de manera tiempo y dosis dependiente y que se produce una regulación negativa, con disminución de la producción de testosterona en presencia de altas dosis o exposición prolongada a hCG.

No solo las células de Leydig del embrión de pollo son capaces de metabolizar esteroides. Las células de Sertoli y el epitelio de revestimiento de los conductos de salida de los testículos de pollo también contienen enzimas que metabolizan andrógenos (Lofts y Bern, 1972; Lofts y Murton, 1973; Tingari, 1973).

Efectos de la insulina sobre el Desarrollo del Testículo

La diferenciación y el crecimiento de las gonadas masculinas incluyen interacciones entre las células somáticas y las germinales que conforman el testículo. Estas interacciones son reguladas principalmente por las hormonas tróficas FSH, LH, GH, prolactina y por los efectos autocrinos/paracrinos que ejercen algunos factores de crecimiento. Estas hormonas y factores modulan la función esteroidogénica de las células de Leydig. Algunos ejercen efectos de tipo

paracrino como por ejemplo FSH, dado que no se han podido demostrar receptores para esta hormona en células de Leydig.

Khan y colaboradores en 1992 realizaron estudios para conocer el efecto que producía la insulina, los factores de crecimiento (IGF-I, TGF α) y la LH sobre la proliferación de las células de Leydig de ratas no maduras. Observaron por técnicas de autorradiografía la incorporación de timidina tritiada en el núcleo de las células, y reportaron que tanto la LH como la insulina, IGF-I y TGF α estimularon la incorporación de timidina tritiada. La incorporación de timidina tritiada que indujeron la insulina y el TGF α dependió de la densidad celular. También observaron que estas moléculas producían efecto estimulador tanto cuando se administraban juntas como por separado.

Otros trabajos como el de Moore y Morris (1993) demostraron que la insulina estimula la síntesis de DNA de células de Leydig de roedores y que este estímulo se produce a través del receptor de IGF-I. Este efecto fue mayor en cultivos deplegados de células de Leydig intersticiales, que en cultivos ricos en este tipo celular. En su trabajo también reportan que la insulina y TGF α actúan sinérgicamente, provocando un importante incremento en la incorporación de timidina tritiada en células intersticiales. Estos resultados muestran el efecto paracrino/autocrino que tiene esta molécula sobre el crecimiento y desarrollo de las células intersticiales.

Adashi y colaboradores (1982), estudiaron el efecto que la insulina provocaba sobre la esteroidogénesis midiendo la secreción de testosterona basal y estimulada con hCG, en células de testículo de rata adulta hipofisectomizadas. Demostraron que la insulina no estimulaba la producción basal, pero que sí incrementaba la secreción de testosterona dependiente de hCG, de manera dosis dependiente. En cambio Lin y cols (1986) utilizando células de Leydig purificadas de rata adulta, encontraron que la insulina estimulaba moderadamente la producción basal de testosterona y marcadamente la dependiente de hCG.

Dubois y Callard en 1993 estudiaron los mecanismos de control de la espermatogénesis *in vitro*. Utilizaron cultivos de unidades conformadas por células de Sertoli y germinales del testículo del pez perro *Squalus acanthias*. El estudio se realizó en células premeióticas, meióticas y postmeióticas. Usando la técnica de incorporación de timidina tritiada investigaron el efecto que producía la insulina y el IGF-I sobre la síntesis de DNA. Sus resultados muestran que estas moléculas participan en los mecanismos que gobiernan la proliferación de células germinales masculinas.

Efecto de los IGFs sobre el Testículo

Roullier-Fabre y colaboradores en 1998 estudiaron el efecto de IGF-I sobre la diferenciación y las funciones esteroidogénicas de las células de Leydig de ratas inmaduras utilizando testículos de fetos de ratas de diferentes edades. Observaron

que la adición de IGF-I a los cultivos por 3 días, en presencia o ausencia de LH, incrementó el número de células de Leydig identificadas por una técnica histológica-química que revela la presencia de la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD). La reacción positiva fue más pronunciada en los cultivos de células de testículos de fetos de 16.5 días, edad en que las células de Leydig se están diferenciando *in vivo*. A esta misma edad se observó que tanto IGF-I como la LH incrementan significativamente la producción de testosterona. Estos autores concluyeron que estos resultados sugieren que IGF-I es un factor que actúa de manera paracrina/autocrina en la diferenciación y actividad de las células de Leydig fetales.

La secreción hormonal de otros tipos celulares también es regulada por los IGFs. En el ovario estos factores estimulan la síntesis y secreción de hormonas de las células de la granulosa y de las células de la teca del ovario, y se ha observado un efecto sinérgico cuando se combinan con FSH y un estrógeno (Giudice,1992). Por otra parte en presencia de IGF-I, las células de la zona fascicular de la glándula suprarrenal incrementan el número de receptores para la hormona liberadora de corticotropinas (ACTH) y aumentan la secreción de hormonas esteroideas cuando se estimulan con dicha hormona. (Penhoat y col, 1989). También se observó que al tratar a estas células con ACTH se provoca un estímulo de la secreción de IGF-I, que de forma autocrina potenciaría la acción de la ACTH. Estudios de Lowe (1991), demuestran que IGF-I también estimula la secreción de hormonas por células de Leydig y células foliculares tiroideas.

Lin y colaboradores en 1986 investigaron el efecto de IGF-I sobre la esteroidogénesis. Utilizaron células de Leydig de ratas maduras y observaron el efecto de IGF-I sobre la producción de testosterona basal y estimulada con hCG. Encontraron que IGF-I estimulaba la secreción de testosterona, tanto basal como dependiente de hCG; el efecto dependía de la dosis de IGF-I aplicada. Estos resultados sugirieron que las células de Leydig tenían receptores de tipo IGF-I y los mismos autores comprobaron esta hipótesis (Lin y col, 1986). De Mellow y col. (1987) utilizaron el mismo modelo para investigar el efecto de IGF-I, IGF-II. Observaron que a corto tiempo de exposición, los IGFs estimularon la secreción de testosterona significativamente y que este efecto fue mayor cuando se estimulaba con hCG y cuando la densidad celular era elevada. Concluyeron que en un corto tiempo de exposición (1 hora) a IGFs, estos factores son capaces de estimular la esteroidogénesis en las células de Leydig. El efecto que provocan estos factores parece ser parte de los mecanismos de control paracrino que operan en el testículo.

Otros trabajos reportan efecto esteroidogénico de IGF-I sobre las células de Leydig. Bernier y col. (1986) utilizaron células de Leydig de cerdo, que cultivaron en un medio F-12/DME enriquecido con transferrina, vitamina E y diferentes dosis de IGF-I (0.5-100 ng/ml) durante 3 días; las células fueron además tratadas con hCG por 4 horas. Observaron que el pretratamiento con IGF-I estimuló la secreción de testosterona dependiente de hCG. Utilizando este mismo modelo Perrard y col. (1987), demostraron que IGF-I incrementa significativamente la

unión de LH/hCG, la secreción de testosterona basal así como la dependiente de hCG. Morera y col. (1987), también evaluaron los efectos de IGF-I sobre células inmaduras de Leydig de cerdo, obteniendo una estimulación máxima de la secreción de testosterona dependiente de hCG, con la dosis de 50 ng/ml de IGF-I. Estos mismos autores hicieron otros estudios adonde además de IGF-I (100 ng/ml) agregaron al medio un inhibidor de la síntesis de DNA (citosina arabinosida, 10 μ M), observando que este tratamiento no afectaba la acción esteroideogénica de IGF-I sobre estas células. Concluyeron entonces que el aumento de la producción de testosterona producido por el IGF-I no está relacionado con la proliferación de las células de Leydig.

Los antecedentes arriba mencionados permiten afirmar que la insulina y los factores de crecimiento similares a la insulina actúan sobre diversos tipos celulares modificando la proliferación celular y las funciones propias de dichas células. En el presente trabajo nos interesa particularmente el efecto de insulina sobre el testículo de embrión de pollo en desarrollo. Los antecedentes en cuanto a la influencia de la insulina en la proliferación de fibroblastos de la piel del embrión de pollo, sugieren que esta hormona podría modificar la proliferación de las células del testículo de estos embriones. Este hecho podría ser relevante para la función del testículo; particularmente nos interesa estudiar las consecuencias del efecto de insulina en la esteroidogénesis del testículo del embrión de pollo. No se encontraron datos en la literatura referentes a efecto de insulina sobre el testículo del embrión de pollo, ni del pollo adulto.

Por otra parte se ha anotado antes que el factor aislado del hepatopancreas de la langosta *Panulirus argus* (INIHEP), tiene propiedades compatibles con los factores de crecimiento similares a la insulina. INIHEP es capaz de incrementar significativamente el crecimiento del camarón en cultivo (Galindo y col., 1994). Sin embargo se dispone de pocos datos sobre los tipos celulares involucrados en este efecto. Basados en los efectos de los IGFs en fibroblastos supusimos que INIHEP podría modular la proliferación de estas células. Por lo tanto se propuso el cultivo de fibroblastos de la piel de embrión de pollo como modelo biológico para el estudio del rol de dicho factor. Dado que en el transcurso de esta tesis se observó que la insulina estimulaba la proliferación celular en un cultivo de testículo de embrión de pollo, se planteó la posibilidad de que INIHEP modificara también la

proliferación de células del testículo, e influyera por ejemplo sobre la producción de testosterona por las células esteroideogénicas.

HIPOTESIS

1- Si la insulina modifica la proliferación de fibroblastos de la piel del embrión de pollo, entonces es posible que esta hormona afecte también la proliferación celular en el testículo del embrión de pollo. Estos cambios podrían a su vez modificar la esteroidogénesis en este órgano.

2- Si el factor aislado del hepatopaneas de la langosta *Panulirus argus* (INIHEP), incrementa el crecimiento del camarón en cultivo, entonces es posible que este factor modifique la proliferación de fibroblastos en la piel del embrión de pollo, y asimismo de las células del testículo.

OBJETIVO GENERAL

Conocer el efecto de insulina y del factor aislado del hepatopaneas de la langosta *Panulirus argus* sobre los fibroblastos de la piel y sobre las células del testículo del embrión de pollo *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Conocer el efecto de insulina sobre la proliferación de fibroblastos de la piel de embrión de pollo de 12 días.

2- Establecer el efecto de INIHEP sobre la proliferación de fibroblastos de la piel de embrión de pollo de 12 días.

3- Conocer el efecto de la insulina sobre la proliferación de células del testículo de embrión de pollo de 18 días.

4- Establecer el efecto de INIHEP sobre la proliferación de células del testículo de embrión de pollo de 18 días.

5- Conocer el efecto de la insulina sobre la producción de testosterona basal y dependiente de hCG, en células del testículo de embrión de pollo de 18 días.

6- Establecer el efecto de INIHEP sobre la producción de testosterona basal y dependiente de hCG, en células del testículo de embrión de pollo de 18 días.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo Primario de Fibroblastos

Se utilizaron embriones de pollo de 12 días de edad. Los embriones se extrajeron del huevo en forma aséptica y se colocaron en cajas de Petri estériles que contenían una solución salina libre de calcio y magnesio.

Se procedió a la toma de pequeños fragmentos de la piel de la zona de abajo del ala para evitar el exceso de plumas. Los fragmentos se colocaron en matraces Erlenmeyer que contenían 20 ml de tripsina al 0.25% (Gibco) y se incubaron durante 15 minutos a 37°C, con agitación continua de 90 ciclos por minuto en un baño Precision.

Transcurrido este tiempo los fragmentos de piel se trasladaron a tubos de vidrio y se adicionó medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) con 10% de suero bovino fetal (SBF, Agroindustria Nacional), para detener la acción de la tripsina. El proceso de disociación celular se completó utilizando pipetas Pasteur.

Las células se sembraron en placas de 24 pozos, calidad de cultivo de tejidos (COSTAR, Cambridge, Ma 02140) a razón de 180,000 células por pozo, en 1 ml de DMEM, (GIBCO, No. 12800-058, que contiene glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio) al que se le agregó 0.1% de una solución de antibióticos (penicilina 10,000 U/ml y estreptomina 10,000 mcg/ml) y SBF al 10%.

Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 95% de oxígeno y 5% de CO₂ por un tiempo de 24 horas.

Estudio para conocer la concentración óptima de Suero Bovino Fetal a utilizar en los cultivos de Fibroblastos de embrión de pollo de 12 días.

Para realizar este estudio se preparó DMEM, variando las concentraciones de SBF (5 y 10%). Las células de fibroblastos se cultivaron como se describió más arriba. Recibieron luego un pulso de timidina tritiada, por 24 o 48 horas: Terminado el tiempo de incubación, se retiró el medio y las células se lavaron con 500 μ l de timidina no marcada. Se adicionó 1 ml de Tripsina al 0.25% a cada pozo y las células se incubaron bajo las mismas condiciones por un tiempo de 15 minutos. Después se raspó cada pozo para obtener las células, las que se colocaron en un vial al cual se le añadió líquido de centelleo y se contaron en un contador de centelleo líquido, Beckman LS 6000 TA, USA.

Efecto de insulina e INIHEP sobre la proliferación de células de fibroblastos.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a retirar el medio de cultivo y a lavar tres veces las células con una solución libre de calcio y magnesio. Se adicionó a cada pozo 1 ml de medio DMEM sin SBF, con albúmina al 0.1% más la solución de antibióticos. Se incorporó entonces el factor aislado del hepatopancreas de la langosta *Panulirus argus* (INIHEP) o insulina (1, 10, 100, 1000 ng/ml y 10, 50 y 100 μ g/ml). Algunos pozos no recibieron hormonas. Se incubaron las células bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. A las 8 horas de incubación se agregó a las células un pulso de timidina tritiada de 10 μ l por pozo, y se incubaron por 2 horas más. Terminado el tiempo de incubación, se retiró el medio y las células se lavaron con 500 μ l de timidina no marcada y se procesaron como se refiere más arriba.

Curva Temporal de Respuesta a Insulina

Los fibroblastos de embrión de pollo previamente cultivados por 24 horas en las condiciones descritas, se lavaron con medio DMEM. Las células se incubaron a 37°C con las diferentes concentraciones de insulina durante varios tiempos (6, 12 y 24 horas). Dos horas antes de concluir el tiempo de incubación se le dió al cultivo un pulso de timidina tritiada. Transcurrido el tiempo de incubación se procesó el experimento de la manera que ya se ha explicado.

Cultivo Primario de Testículo

Para la realización de estos cultivos se utilizaron testículos de embrión de pollo de 18 días de edad. Los embriones se extrajeron asépticamente, se colocaron en cajas de Petri estériles y fueron decapitados. Se disecaron ambos testículos, se pusieron en cajas de Petri que contenían una solución salina libre de calcio y magnesio y se limpiaron de tejidos adherentes. El tejido se pasó a un matraz que contenía Tripsina al 0.25% en solución salina libre de calcio y magnesio y se incubó a 37°C en un baño con agitación continua, de 90 ciclos por minuto por un tiempo de 15 minutos. Transcurrido este tiempo, los testículos semidisociados se colocaron en un tubo cónico con medio DMEM con SBF para completar la disgregación de forma mecánica. Se tomaron de la suspensión anterior 200 microlitros y se sembraron en pozos de placas calidad cultivo de tejido, que contenían DMEM más 10% de SBF y la solución de antibióticos ya mencionada. Las células se incubaron a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de oxígeno, durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se procedió a realizar los diferentes experimentos con INIHEP o insulina, para valorar su efecto sobre la proliferación celular. Asimismo se estudió la producción de testosterona

en condiciones basales y bajo estímulo con hCG, en presencia y ausencia de insulina e INIHEP, como se describe a continuación.

Secreción de Testosterona por células de testículo en cultivo.

Las células de testículo cultivadas durante 24 horas se lavaron con medio fresco DMEM y se adicionaron diferentes concentraciones de insulina (10, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ o del factor (100, 10 y 1 ng/ml) con y sin hCG a una concentración de 2.5 U.I / ml, incubándose por 18 horas a 37 °C, en 95% de aire y 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo se tomó el medio de cultivo y se procedió a la extracción de testosterona según la metodología descrita más abajo, para después realizar el Radioinmunoanálisis.

En otros experimentos las células se incubaron en DMEM + albúmina 0.1% y diferentes concentraciones de insulina por 1 hora y se cambió nuevamente el medio por otro que contenía DMEM + 0.1% de BSA (secreción basal de testosterona) o bien dicho medio más hCG (2.5 U.I./ml) (secreción dependiente de hCG). Se procedió a incubar las células durante 3 horas en las condiciones ya descritas y al final de este período se recogieron los medios para medir testosterona previa extracción con éter.

Estudio de la Proliferación Celular en Células de Testículo de Embrión de Pollo de 18 días.

Las células que se encontraban en medio DMEM más 10% de SBF por 24 horas, se lavaron 3 veces con DMEM sin SBF, y se les adicionó otro medio que contenía albúmina al 0.1% más la solución de antibióticos, y las diferentes concentraciones de insulina (10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) o de INIHEP (1, 10, 100, 1000

ng/ml). Las células se incubaron por 18 horas en estas condiciones y dos horas antes de concluir la incubación se dio un pulso de timidina tritiada.

Terminado este período, se retiró el medio y las células se lavaron 3 veces con timidina no radioactiva. Se adicionó 1 ml de tripsina al 0.25% a cada pozo y las células se incubaron por un tiempo de 15 minutos. Después se raspó cada pozo para obtener las células, las que se colocaron en un vial al cual se le añadió líquido de centelleo. La radioactividad se contó en un contador de centelleo líquido Beckman LS 6000 TA, USA.

Técnica de Extracción de Testosterona

Se vació el contenido de cada pozo en tubos cónicos para extracción y se les añadió 5 mL de éter frío. Se agitó por 1 minuto en vortex. Se congeló con hielo seco y acetona para separar la fase acuosa de la fase etérea. Se decantó todo el éter en otros tubos cónicos y se esperó a que se descongelara toda la fase acuosa. Se repitieron los pasos 2 y 3. Se evaporó todo el éter extraído en cada tubo en baño a 37°C con agitación continua. A cada tubo se le adicionaron 500 microlitros de amortiguador especial para Radioinmunoanálisis (RIA). Se agitó un minuto y se congeló hasta la realización del RIA.

Técnica de Radioinmunoanálisis de Testosterona

Se prepararon por duplicado los siguientes tubos: cuentas totales, la que contenía únicamente la hormona marcada, (unión inespecífica), conteniendo hormona marcada y carbón activado, y unión máxima al que se le agregó hormona marcada, el anticuerpo antitestosterona (ICN, Costa Mesa, Ca.) y el carbón activado (Bedolla y col., 1984)

El anticuerpo antitestosterona se obtuvo de ICN, Costa Mesa, Ca. La testosterona marcada fué 1,2,6,7,-H testosterona (Amersham, Int.). La separación de la hormona tritiada libre de la unida al anticuerpo, se realizó absorbiendo aquella con carbón activado (Merck). La cuantificación del complejo anticuerpo-³[H] testosterona se realizó contando las cuentas por minuto (cpm) en un contador para emisiones beta con 30% de eficiencia, Beckman LS 6000 TA, USA, utilizando líquido de centelleo.

La determinación de la concentración hormonal en los medios se realizó extrapolando de una curva estándar realizada con el logaritmo de las concentraciones conocidas de los estándares (12.5 a 200 pg/tubo) versus el logaritmo Y, donde Y es la relación entre la unión total y la unión en presencia de la hormona no radioactiva y la transformación Logit es igual al Ln (y/ 100-y). Los resultados se analizaron con un programa de computadora diseñado para este fin. Dicho programa se basa en el procedimiento de logit Y (Bedolla, 1984).

Inmunofluorescencia con Microscopía Confocal.

Este estudio se realizó para corroborar la presencia de fibroblastos en los cultivos, mediante la expresión de la proteína Vimentina, característica del citoesqueleto de este tipo celular.

Para esto se sembraron fibroblastos de la piel de embrión de pollo de 12 días en cajas Petri que contenían pequeños cubreobjetos de vidrio. El medio utilizado fue DMEM más 10% de SBF y la solución de antibióticos. Las células se incubaron por 24 horas a 37 °C, en 95% de aire y 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo el medio de cultivo se aspiró y las células se lavaron con una solución de PBS y suero, para después fijarlas con metanol por un minuto y se volvieron a lavar con la misma solución. Posteriormente se realizó un bloqueo con suero al 3% por un tiempo de 20 minutos. Se adicionó el primer anticuerpo (Sigma) diluido

1:150 en PBS. Los cubreobjetos se mantuvieron en una cámara húmeda. Se tomaron los cubreobjetos en los que crecieron las células y se colocaron de manera que las mismas contacten con el anticuerpo o con la solución control, incubandolos durante 45 minutos a 37 °C.

Transcurrido este tiempo se lavaron rápidamente las células 3 veces con la solución de PBS + Suero y se agregó el segundo anticuerpo fluoresceinado (Sigma). Después del período de incubación se lavaron las células con PBS, 3 veces durante 5 minutos y se fijaron los cubreobjetos con una solución de glicerol y PBS. La fluorescencia de las muestras se observó con un microscopio confocal, MRC-600 BIO-RAD, con laser kriptón/argón (460-560 nm de excitación).

RESULTADOS

Estandarización de las condiciones del cultivo de fibroblastos.

En los experimentos realizados con las dos concentraciones de SBF, a las 48 y 72 horas, se observó que la incorporación de timidina tritiada aumenta con el tiempo de cultivo, lo que sugiere que las células están proliferando en las condiciones utilizadas. Por otra parte se observó que el porcentaje de SBF agregado al medio de cultivo juega un papel importante en la proliferación celular, ya que cuando se incrementa el suero de 5 a 10% se produce un incremento de más del doble en la incorporación de timidina tritiada (Fig. 1).

Detección de vimentina en fibroblastos.

Los resultados de la inmunofluorescencia mostraron que los cultivos estaban compuestos mayoritariamente por fibroblastos, ya que al observarlos en microscopía confocal comprobamos la presencia de vimentina en el citoesqueleto de un 95% de las células. Se observaron claramente las fibras extendidas de Vimentina, proteína que predominó en el citoesqueleto y que es característica de estas células (Fig. 2).

Efecto de insulina e INIHEP sobre la proliferación celular de fibroblastos

En la gráfica 3 se observa que el agregado de INIHEP a un medio definido sin SBF incrementó en un 100% la proliferación celular en la dosis de 1 ng/ml, si se le compara con el grupo que solo tiene medio definido. Dosis mayores no causaron incrementos significativos en la incorporación de timidina tritiada.

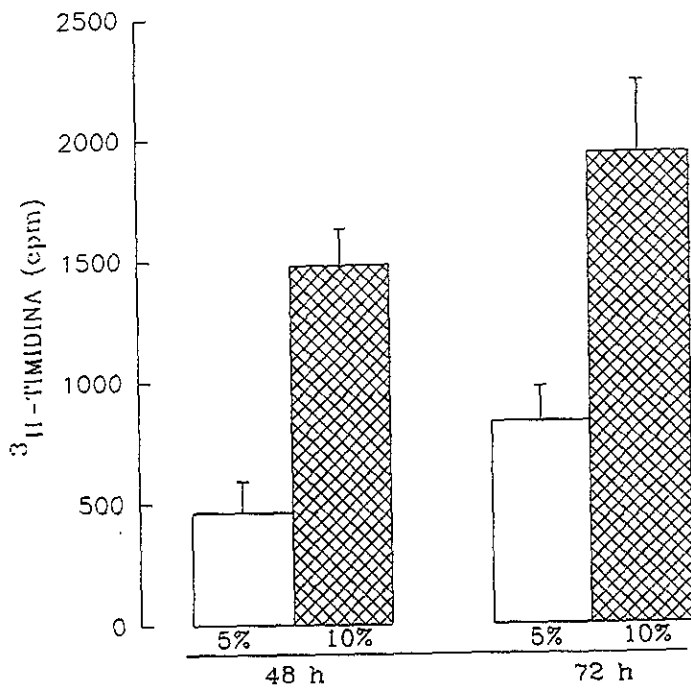


Fig. 1. Incorporación de $^3\text{H-Timidina}$ en fibroblastos de embrión de pollo de 12 días incubados durante 48 y 72 horas con diferentes porcentajes de Suero Bovino Fetal (5 y 10%). Los datos indican $\bar{X} \pm \text{DS}$ de un experimento tipo, realizado por triplicado.



Fig. 2. Expresión de vimentina en fibroblastos de piel de embrión de pollo de 12 días. Las células fueron procesadas por inmunofluorescencia como se indica en métodos y observadas en el microscopio confocal. En **A** y **B**, campos a menor y mayor aumento respectivamente. La barra blanca equivale a 50 μ m.

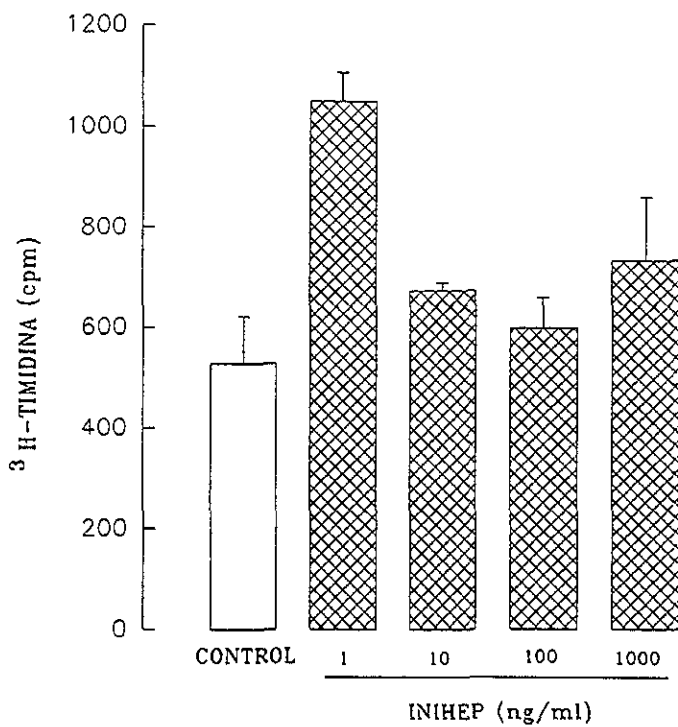


Fig. 3. Incorporación de ³H-Timidina en cultivo de fibroblastos de embrión de pollo de 12 días incubados con diferentes concentraciones de insulina inmunoreactiva aislada del hepatopancreas de la langosta *Panulirus argus* (INIHEP). Los datos indican la $\bar{X} \pm DS$. Se muestra un experimento representativo realizado por triplicado.

Con respecto a la insulina, también se encontró que estimuló la proliferación celular, significativamente, cuando se usó la dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$. Con dosis mayores se observó una disminución de la estimulación (Fig. 4).

Curva temporal del efecto de insulina sobre fibroblastos.

En la curva temporal de insulina realizada con diferentes concentraciones de esta hormona en medio definido (10, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$) se encontró que a las 6 y 12 horas de incubación la insulina aumentó la proliferación celular en la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. Este efecto fue más evidente a las 12 horas de incubación. Sin embargo, a este tiempo, la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ inhibió la proliferación celular con respecto al control. Después de 24 horas la insulina produjo inhibición de la incorporación de timidina tritiada en las tres concentraciones utilizadas en este estudio (Fig. 5).

Proliferación de células de testículo en presencia de insulina o INIHEP.

En los experimentos realizados con insulina se observó que esta hormona estimuló de manera significativa (150%) ($P < 0.01$) la incorporación de timidina tritiada a las células de testículo en las tres dosis utilizadas, (Fig. 6). Sin embargo a diferencia de lo que ocurre con los fibroblastos el INIHEP no estimuló de manera significativa la incorporación de timidina tritiada en las células tratadas (Fig. 7).

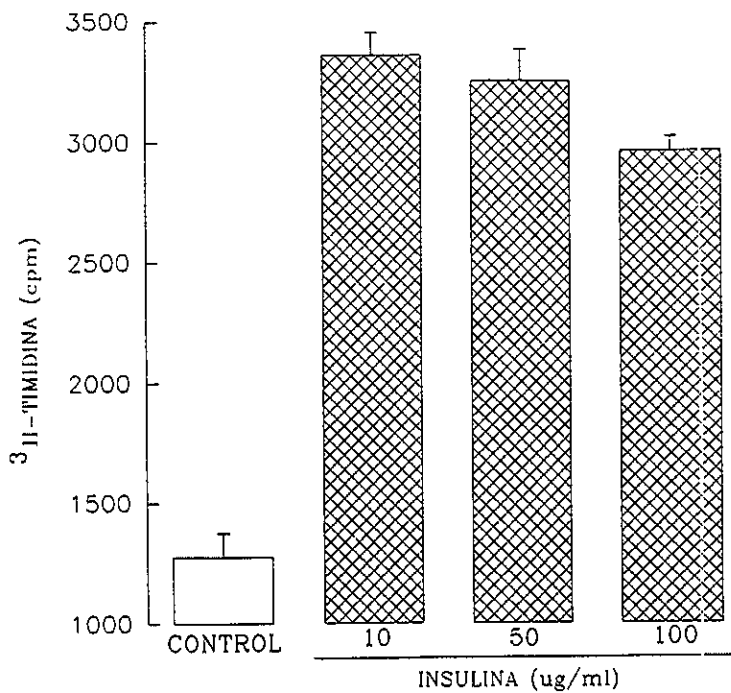


Fig.4. Efecto de insulina sobre la incorporación de ³H-Timidina en cultivo de fibroblastos de embrión de pollo de 12 días incubados con diferentes concentraciones de insulina durante 10 horas. Los datos muestran la $\bar{X} \pm DS$ de experimento representativo realizado por triplicado.

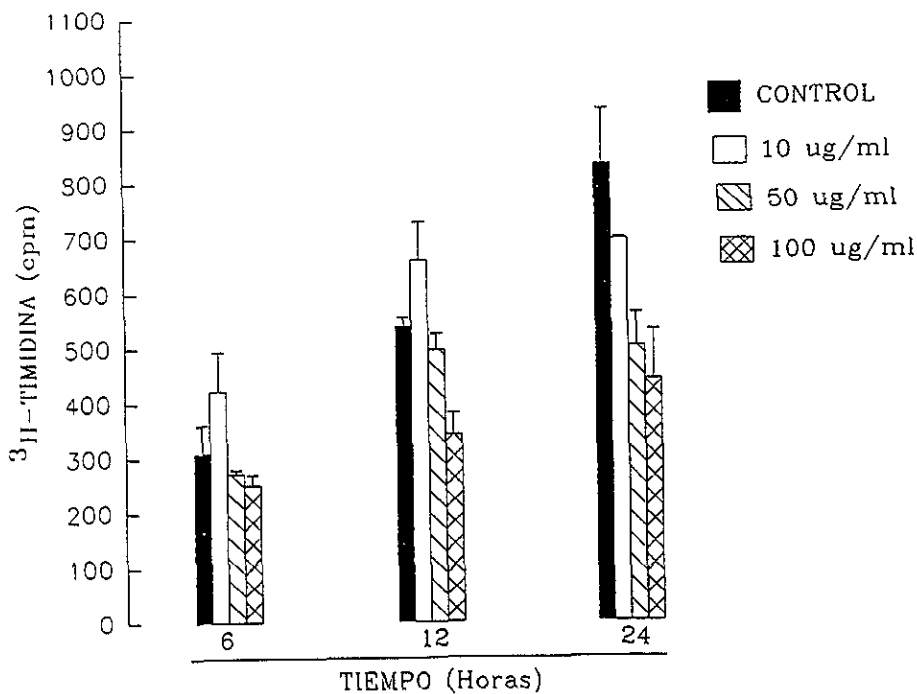


Fig. 5. Incorporación de timidina tritiada en cultivo de fibroblastos de embrión de pollo de 12 días tratados con diferentes concentraciones de insulina durante 6, 12 o 24 horas. Los datos muestran la $\bar{X} \pm DS$ de experimento tipo realizado por triplicado.

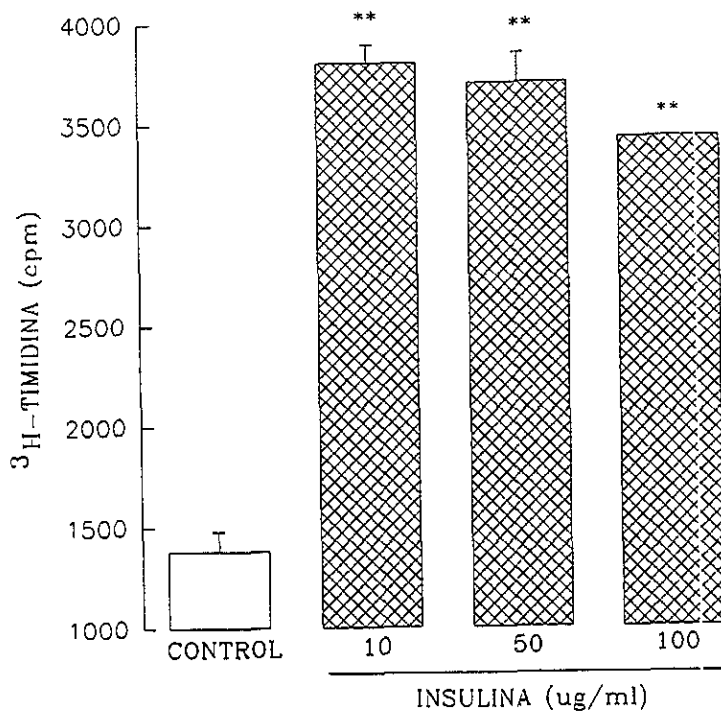


Fig. 6. Efecto de diferentes concentraciones de insulina sobre la incorporación de ³H-Timidina en células de testículo de embrión de pollo de 18 días. Los datos muestran la $\bar{X} \pm DS$ de tres experimentos. ($P < 0.05$)

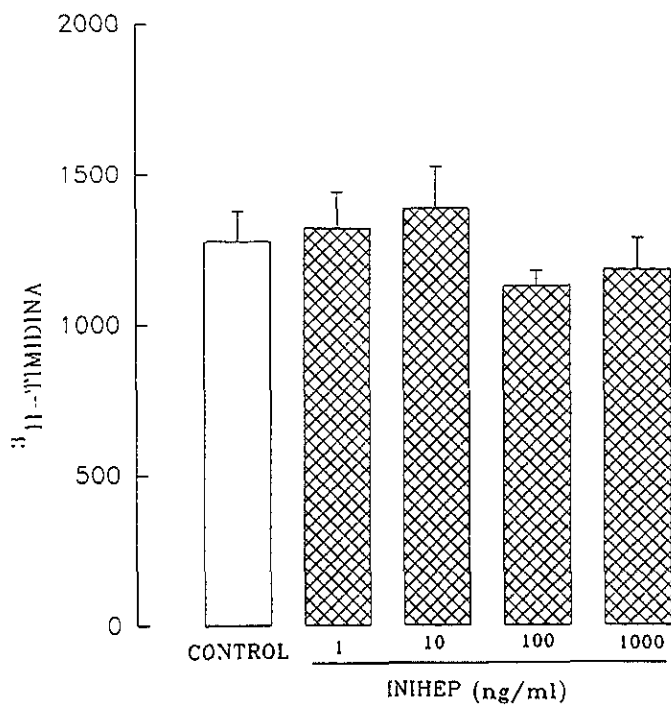


Fig. 7. Incorporación de $^3\text{H-Timidina}$ en cultivo de células de testículo de embrión de pollo de 18 días tratadas con diferentes concentraciones de insulina inmunoreactiva aislada del hepatopáncreas de la langosta *Panulirus argus* (INIHEP). Los datos muestran la $\bar{X} \pm \text{DS}$ de un experimento tipo realizado por triplicado.

Producción de Testosterona basal y dependiente de hCG

Los experimentos realizados con el INIHEP muestran que el tratamiento con este factor no provocó cambio alguno en la producción basal de testosterona. Sin embargo cuando se estimuló con hCG (2.5UI) las células respondieron aumentando significativamente la producción de testosterona. El tratamiento con INIHEP tampoco alteró la respuesta a la hCG (Fig.8).

La figura 9 muestra que el agregado de hCG a los cultivos provocó otra vez un significativo incremento en la producción de testosterona. El tratamiento con insulina no modificó la secreción basal de testosterona. Sin embargo cuando se incorporó insulina (10 ug/ml) + hCG a los cultivos las células respondieron ligeramente mejor ($P < 0.05$). A la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ se observó que la insulina provocó una significativa regulación negativa del efecto de hCG.

Cuando las células se cultivaron por 18 horas en presencia de insulina solamente (10 $\mu\text{g/ml}$), se observó que la hormona modificó ligeramente la secreción basal de testosterona, ($P < 0.05$). Nuevamente cuando sólo se adicionó hCG esta gonadotropina provocó un estímulo significativo de la secreción de testosterona (4 veces). La presencia de insulina y hCG provocó en el medio de cultivo otra vez regulación negativa del efecto de hCG, que fue ya evidente en la dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 10).

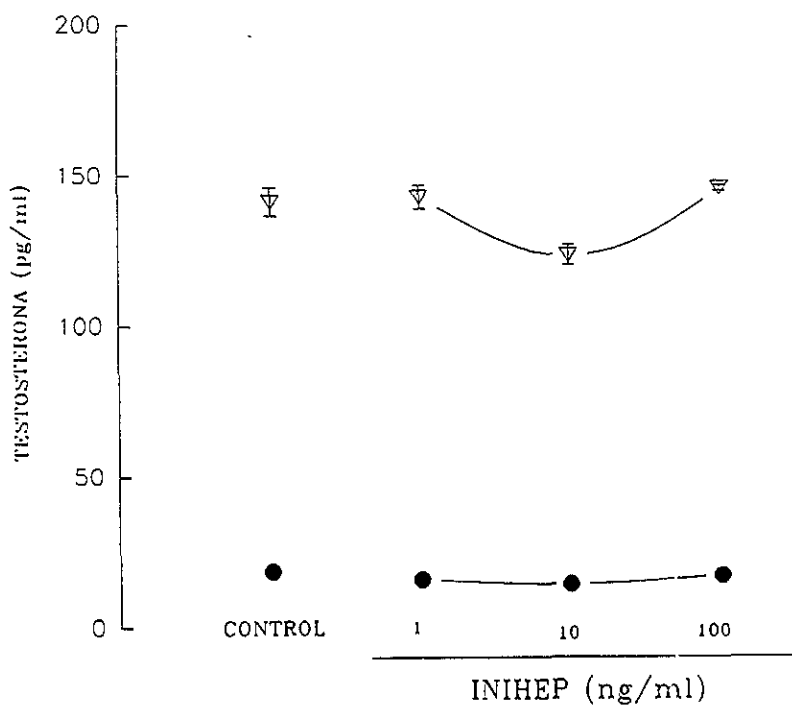


Fig. 8. Secreción de testosterona en condiciones basales (●) o en presencia de hCG (▽) en células de testículo de embrión de pollo de 18 días incubadas con diferentes concentraciones de insulina inmunoreactiva aislada del hepatopancreas de la langosta *Panulirus argus* (INIHEP). Los datos muestran la $\bar{X} \pm DS$ de experimento tipo realizado por triplicado.

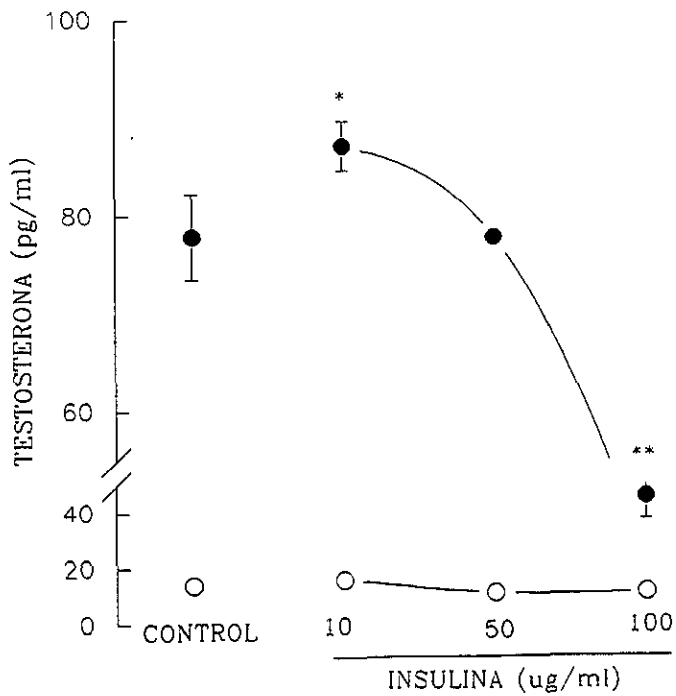


Fig. 9. Secreción de testosterona en condiciones basales (o) o estimulada con hCG (*) en células de testículo de embrión de pollo de 18 días pretratadas durante 1 hora con diferentes concentraciones de insulina y luego incubadas con o sin hCG durante 3 horas. Los datos muestran la $\bar{X} \pm DS$ de tres experimentos realizados por triplicado.* ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$)

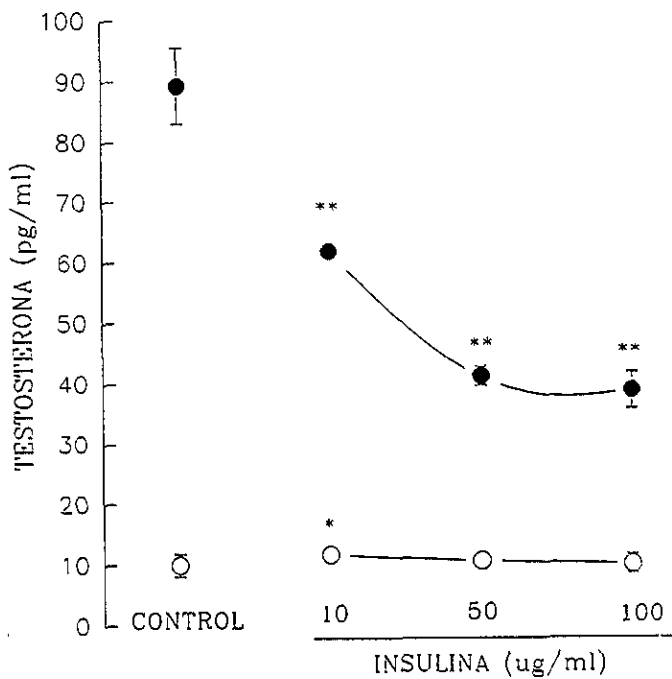


Fig. 10. Efecto de la presencia de insulina por 18 horas sobre las células de testículo de embrión de pollo de 18 días. Secreción de testosterona en condiciones basales (o) o en presencia de hCG (•). Los datos muestran la $\bar{X} \pm DS$ de tres experimentos realizados por triplicado. * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.001$)

DISCUSION

Durante el desarrollo embrionario los sistemas endocrino y nervioso ejercen control y regulación del crecimiento y la diferenciación a través de mecanismos específicos. Muchos de estos mecanismos continúan activos aún durante la vida adulta. El sistema endocrino juega un papel fundamental en el establecimiento y desarrollo del eje hipotálamo-hipófisis-gonada y es de esta manera que regula el crecimiento y la función del testículo.

Se sabe que muchas de las funciones que son capaces de realizar estos sistemas se ejercen a través de una serie de moléculas como: hormonas, factores de crecimiento, citocinas, etc., que estimulan o inhiben eventos celulares como la diferenciación y proliferación celular, así como la esteroidogénesis en el testículo.

Los cultivos celulares han sido ampliamente utilizados por los investigadores para estudiar el comportamiento celular bajo condiciones experimentales controladas.

En el presente trabajo hemos estudiado como la insulina y el INIHEP modulan la proliferación celular *in vitro* de fibroblastos de la piel de embrión de pollo de 12 días y de células de testículo de embrión de pollo de 18 días. Además estudiamos el efecto que ejercen estas moléculas sobre la producción de

testosterona en condiciones basales y bajo la influencia de hCG, en el modelo de testículo ya mencionado.

Como era de esperar los resultados de estandarización de las condiciones de cultivo reflejan que el porcentaje de suero utilizado en los mismos juega un papel fundamental para que ocurra una buena incorporación de timidina tritiada en los fibroblastos de embrión de pollo de 12 días. Encontramos que el suero al 10% provoca una mayor incorporación de timidina tritiada. Al respecto Morrell y Froesch (1972), reportaron estímulo del crecimiento celular de fibroblastos de embrión de pollo de 12 días al adicionar un 5% de suero bovino fetal. Por la propia constitución del suero es difícil determinar cual puede ser el factor o los factores responsables de la estimulación del crecimiento celular. Es conocido que el suero que se adiciona a los cultivos contiene proteínas, hormonas y factores de crecimiento que permiten que las células se puedan adherir a la superficie de cultivo y que éstas se desarrollen de manera satisfactoria *in vitro*. En este trabajo se agregó suero a los cultivos primarios sólo para que en las primeras 24 horas las células se adhirieran adecuadamente y tuvieran un ambiente apropiado para su desarrollo. Se utilizó la concentración de suero que mayor incorporación indujo, para que cuando en la siguiente etapa experimental las células se enfrentaran a las condiciones de un medio mucho más pobre como el DMEM suplementado con albúmina, estuvieran en las mejores condiciones.

El uso de anticuerpos dirigidos contra vimentina permitió verificar que los cultivos estaban compuestos en un alto porcentaje de fibroblastos. Se observaron

abundantes fibras de vimentina características de los filamentos intermedios del citoesqueleto de este tipo celular (Alberts,1994). Esta técnica permitió determinar que un alto porcentaje de células derivadas del cultivo de piel eran fibroblastos.

Como se observa en la Fig. 4, la insulina produjo un estímulo significativo cuando se adicionó a los cultivos de fibroblastos de piel de embrión de pollo de 12 días. Estos datos coinciden con los reportados en fibroblastos de la piel de embrión de pollo de 12 días por Morrell y Froesch (1972), quienes utilizando un modelo similar obtuvieron un importante estímulo de la proliferación. En la curva tiempo-dosis dependiente de nuestro trabajo se observa que a las 6 y 12 horas la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de insulina produjo un estímulo significativo de la proliferación celular. Estos resultados pueden explicarse por los efectos a largo plazo de la insulina, que se sabe es capaz de actuar como un factor de crecimiento. Vaheri y col. (1974) encontraron en su estudio que la insulina estimula la proliferación de fibroblastos de embrión de pollo y señala que la insulina comienza a incrementar la incorporación de timidina tritiada entre las 4 y 5 horas después de ser adicionada al cultivo, alcanzando un efecto máximo entre las 8 y 9 horas de tratamiento y el pico mitótico entre las 12 y 13 horas. Por otra parte en nuestros resultados se observa que a las 24 horas de cultivo en presencia de insulina ocurre ya una inhibición de la proliferación celular, es decir un fenómeno de regulación negativa común a muchas hormonas cuando las células se exponen a ellas en dosis altas o por tiempos prolongados.

Por otra parte se reporta en este trabajo por primera vez que una hormona derivada del hepatopancreas de la langosta *Panulirus argus* (INIHEP) estimuló de manera importante la proliferación celular de fibroblastos de embrión de pollo de 12 días. Al respecto Gallardo (1998), reportó que este factor fue capaz de estimular *in vitro* la proliferación celular de células del hepatopancreas de la langosta *Panulirus argus*. Se ha descrito que los péptidos similares a la insulina desencadenan procesos biológicos relacionados con el crecimiento y la regulación del metabolismo (Rosen, 1987).

El desencadenamiento de la cascada de señalización por la insulina y también por los IGFs, al igual que otros muchos factores de crecimiento comienza con la interacción de éstos con su receptor específico de membrana, lo que sugiere que en los fibroblastos del embrión de pollo de 12 días existen receptores para insulina y probablemente para factores relacionados a IGF-I, como es el caso de INIHEP.

Por otra parte nuestro grupo ha realizado estudios que demuestran que las células del testículo de pollo pueden crecer aceptablemente en un medio libre de suero si se les adiciona al mismo albúmina (Castro y Romano, 1994). Esto nos ha permitido evaluar el efecto que inducen determinadas hormonas y el propio suero sobre las células del testículo de pollo recién nacido. Se observó que las células de testículo cultivadas bajo estas condiciones son capaces de proliferar y mantienen su capacidad de producir testosterona, de manera espontánea o en forma dependiente de hCG. En el presente trabajo se observa que también las

células de la piel y del testículo de embrión de pollo se desarrollan *in vitro* en medios definidos, lo que permitió la realización de experimentos diseñados para estudiar el efecto de la insulina y de INIHEP.

Los resultados de esta tesis muestran el efecto de la insulina e INIHEP sobre la proliferación celular de células de testículo de embrión de pollo de 18 días de desarrollo. Contrariamente a lo que ocurrió en fibroblastos, la incorporación de timidina tritiada a las células de testículo en presencia de INIHEP sólo mostró una tendencia a aumentar, a la concentración de 10 ng/ml. Una posible explicación del hecho de que INIHEP estimule la proliferación de fibroblastos (embriones de 12 días) y no de células testiculares (embriones de 18 días) podría ser la edad de los embriones donantes en cada caso. Probablemente los receptores para estos factores del tipo IGF en el embrión de pollo abundan en etapas tempranas del desarrollo embrionario y que el número de estos sea menor conforme el embrión se acerca a la madurez. Otra posibilidad es que las células de testículo carezcan de los receptores para INIHEP a los 18 días de vida embrionaria.

Por el contrario, la insulina estimuló notablemente la proliferación de células del testículo, lo que sugiere la presencia de receptores para esta hormona en dichas células. Se ha mencionado que uno de los efectos a largo plazo de la insulina, es la estimulación de la síntesis de DNA y la proliferación celular sobre diferentes tipos celulares (Straus, 1981, 1984). La técnica de incorporación de timidina tritiada que se usó en este trabajo indica que la insulina estimuló la proliferación celular en el testículo del embrión de pollo. Sin embargo esta técnica

no permite discriminar qué células del testículo son estimuladas por la insulina. Estudios preliminares realizados por Bobes y col.,1998 en el mismo modelo muestran que en presencia de la insulina existe un incremento en el número de células positivas para la 3β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa. Este hecho sugiere que la hormona incrementa el número de células intersticiales, pero no descarta efectos sobre otros tipos celulares, como las células de Sertoli.

En el pollo recién nacido, el testículo es capaz de responder a la estimulación con gonadotropinas (Castro y Romano, 1994). Existen muchos estudios que demuestran la importancia de la presencia de la LH/hCG para la diferenciación y el buen funcionamiento de las células de Leydig (Saez, 1994). Como se observa en este trabajo las células testiculares responden de manera significativa a la adición de hCG al medio, indicando que se han preservado los receptores para hCG. Por otra parte resulta interesante el hecho de que las células del testículo del embrión de pollo puedan desensibilizarse a hCG aún cuando el efecto estimulador también es débil. Sería interesante valorar la producción de estrógenos.

En este trabajo se muestra también que la producción basal de testosterona se incrementó ligeramente aunque significativamente cuando las células fueron pretratadas con $10\ \mu\text{g/ml}$ de insulina durante una hora. Resultados similares pero más marcados se obtuvieron en testículos de pollo recién nacido pretratados con insulina por 1 hora (Bobes y col. 1998). Estos resultados muestran que la insulina

influye en la fisiología de los testículos de embrión de pollo de 18 días y que el estadio de desarrollo puede afectar la respuesta de las células a esta hormona. Al respecto es interesante el hecho de que células provenientes de testículo de feto de rata de 16.5 días incrementaron la producción basal de testosterona cuando se les adicionó insulina al medio por 3 días, pero no sucedió así con las células de embriones de 20.5 días (Roullier-Fabre, 1998):

Varios investigadores han estudiado el efecto de insulina sobre células adultas de rata y no hallaron ningún efecto de esta hormona sobre la producción basal de testosterona (Adashi y col., 1982; De Mellow y col., 1987). Por otra parte, Lin y col. (1986), reportaron una moderada estimulación de la producción basal de testosterona en cultivos de células de Leydig adultas estimuladas por 3 horas con insulina. Estos datos sugieren una vez más que la respuesta de las células testiculares a insulina depende del grado de desarrollo de las mismas y de la edad del donante.

Por otra parte, la insulina influyó claramente la respuesta a hCG de las células del testículo de pollo. La dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$ estimuló la respuesta a la hormona. Sin embargo dosis mayores causaron regulación negativa del efecto de hCG, es decir que disminuyó la producción de testosterona. Charreau (1978), demostró que los receptores a hCG están involucrados en la acción de la insulina sobre las células del testículo de rata. Es muy probable que, por otro lado, la insulina interactúe con hCG estimulando la actividad de las enzimas que participan

en la esteroidogénesis. Por otra parte, dosis más altas a partir de 100 $\mu\text{g/ml}$ provocaron regulación negativa. Este efecto de regulación negativa también se observó cuando células de testículo de pollo recién nacido fueron cultivadas en presencia del suero bovino fetal por 24 horas y más tarde fueron expuestas a la acción de hCG (Castro y Romano, 1994). Una interacción a nivel del receptor a hCG puede constituir la explicación de la regulación negativa que se observa a altas dosis de insulina. Sin embargo cabe también la posibilidad de que altas dosis de insulina pudieran provocar un efecto citotóxico en las células.

Estos resultados muestran entonces que la insulina modula la proliferación celular y la esteroidogénesis de las células del testículo de embrión de pollo de 18 días. Entre las células que conforman el testículo existe intercomunicación e interacción de tipo paracrino (que pueden incluir la regulación juxtacrina y cryptocrina) y también existen efectos autocrino (que incluye la comunicación intracrina) (Saez, 1994). En este trabajo se utilizó un cultivo de células de todo el testículo, por lo tanto, puede que el efecto de la insulina observado no se deba a un efecto directo de la insulina sobre las células de Leydig. En el testículo están presentes otros tipos celulares como las células de Sertoli y los fibroblastos, que secretan factores de crecimiento (IGF-I, TGF β , TGF α , EGF), citocinas, activina y hormona liberadora de la hormona de crecimiento (Saez, 1994), que intervienen en la regulación de las funciones de las células esteroidogénicas de forma positiva o negativa. Asimismo se sabe que las células de Sertoli responden a insulina

incrementando la secreción de la proteína de unión a andrógeno (Karl y Griswold, 1980).

En resumen, la insulina y el INIHEP regulan la proliferación celular y la función esteroidogénica de los modelos celulares embrionarios estudiados. La primera tiene un efecto estimulador en ambos modelos, lo que permite afirmar que la insulina juega un papel crítico en el desarrollo embrionario del pollo en su etapa perinatal, lo que se reafirma por resultados previos del laboratorio (Bobes y col., 1998) en pollos recién nacidos. La segunda, a pesar de ser aislada de un organismo invertebrado, estimuló de manera significativa la proliferación de fibroblastos de vertebrados como las aves, a través del estímulo de la síntesis de DNA. Este hecho explica en parte el efecto observado *in vivo* sobre el crecimiento del camarón, ya que posiblemente INIHEP sea un factor estimulador de la proliferación también en otros tipos celulares. Por lo tanto su aplicación aceleraría el crecimiento de estos invertebrados. Esto lleva a pensar en el papel que han tenido estos factores en el desarrollo evolutivo de los organismos. Factores como INIHEP probablemente se han conservado durante la evolución ya que intervienen en procesos vitales para el mantenimiento y desarrollo de los diferentes organismos, a través de la estimulación de la síntesis de DNA y proteínas, con la consiguiente estimulación de la proliferación y el crecimiento celular.

Por último es necesario destacar la importancia comercial que podría tener la utilización de la insulina y factores como INIHEP en la cría del camarón para países como México y Cuba entre otros que desarrollan desde hace algunos años

la cría artificial de este crustáceo. Asimismo, los resultados de esta tesis estimulan el estudio de la influencia de este factor derivado de la langosta, sobre el desarrollo de aves domésticas que son una importante fuente de nutrientes y de gran importancia comercial.

CONCLUSIONES

- . Se comprobó en nuestro modelo que la presencia del suero bovino fetal en el cultivo estimula la incorporación de timidina tritiada a los fibroblastos. La concentración de 10% fue la más efectiva y se eligió para usarse en las primeras 24 horas de cultivo.
- . La técnica de inmunofluorescencia confirmó que la población del cultivo de piel estaba conformada por un 95% de fibroblastos.
- . En los cultivos de fibroblastos de la piel del embrión de pollo, la insulina estimuló la proliferación celular a las 6 y 12 horas de incubación; sin embargo a las 24 horas se observó inhibición de la misma.
- . El INIHEP estimuló de manera significativa la proliferación de fibroblastos de la piel de embrión de pollo. El incremento varió con la dosis.
- . La insulina produjo un estímulo significativo de la proliferación de células de testículo de embrión de pollo de 18 días.
- . El INIHEP agregado a cultivos de células de testículo de embrión de pollo de 18 días no produjo una estimulación significativa de la proliferación celular.

. La producción de testosterona dependiente de hCG por células del testículo de embrión de pollo de 18 días, pretratadas durante una hora con diferentes concentraciones de insulina, aumentó significativamente a la dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$. A dosis mayores ocurrió una regulación negativa.

. Cuando la insulina estuvo en el medio de cultivo durante 18 horas, se produjo una significativa regulación negativa en respuesta a hCG.

. La producción de testosterona no se modificó en presencia de INIHEP.

. Los datos de esta tesis indican que el INIHEP estimula la proliferación de fibroblastos de piel, del embrión de pollo de 12 días. Sin embargo este factor no parece alterar ni la proliferación celular, ni la producción de testosterona en el testículo de 18 días de desarrollo.

Por otra parte la insulina se comportó como un potente estimulador de la proliferación de los fibroblastos y también de las células del testículo embrionarios. Asimismo modificó la producción de testosterona dependiente de hCG, sin alterar la producción basal de esta hormona.

REFERENCIAS

- .Adashi E, Cheryl F, Hsuch AJ.** 1982. Insulin augmentation of testosterone production in a primary culture of rat testicular cells. *Biol Reprod* 26: 270-280.
- .Adashi EY, Resnick CE, Rosenfeld RG.** 1990. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF II hormonal action in cultured rat granulosa cells: mediation via type I but not type II IGF receptors. *Endocrinology* 126: 216-222.
- .Aguiñar MC, Romano M, Pedernera E.** 1981. Ultrastructure of Leydig cell in the testis of chicken submitted to early embryonic surgical bursectomy. *J Anat* 133:543-553.
- .Alarcon C, Cheatman B, Lincoln B, Khan CR, Siddle K, Rhodes CJ.** 1994. A Kex2-related endopeptidase activity present in rat liver specifically process the insulin proreceptor. *Biochem J* 301: 257-265.
- . Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD.** 1994. *Molecular Biology of Cells.* Garland Publishing Inc, New York and London.
- .Araki E, Shimada F, Uzawa A, Mori M, Ebina Y.** 1987. Characterization of the promoter region of the human insulin receptor gene. *J Biol Chem* 262:16186-16191.
- .Bassas LI, De Pablo F, Lesniak MA, Roth J.** 1985. Ontogeny of receptors for insulin-like peptides in chick embryo tissue: early dominance of insulin-like growth factor over insulin receptors in brain. *Endocrinology* 117:2321.
- .Baxter RC.** 1986. The somatomedins: insulin-like growth factors. *Adv Clin Chem* 25: 49.
- .Bedolla TN, Ulloa-Aguirre A, Landeros VJ, Pérez-Palacios G.** 1984. Análisis de datos de control de calidad en el radioinmunoanálisis. I. Guía para la evaluación de los resultados. *Rev Invest Clin (Mex)* 36: 179-192.
- .Benahmed M, Morera AM, Chauvin ML.** 1987. Somatomedin C/insulin-like factor I as a possible intratesticular regulator of Leydig cell activity. *Mol Cell Endocrinol.* 59: 69-77.
- .Benecke H, Flier JS, Moller DF.** 1992. Alternatively spliced variants of the insulin receptor protein. Expression in normal and diabetic human tissues. *J Clin Invest* 8: 2066-2070.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

.Bently PJ. 1982. Comparative Vertebrate Endocrinology. 2ª Edic. Cambridge University Press. P. 15-123.

.Bernier M, Chatelain P, Mather JP, Saez JM.1986. Regulation of gonadotropin receptors, gonadotropin responsiveness, and cell multiplication by somatomedin-C and insulin in cultured Leydig cells. . Cell Physiol 129: 257-263.

.Bley MA, Simon JC, Estevez AG, de Asua LJ, Baranao JL. 1992. Effect of follicle-stimulating hormone on insulin-like growth factor-I-stimulated rat granulosa deoxyribonucleic acid synthesis. Endocrinology 131: 1223-1229.

.Bobes R, Miranda C, Castro I.J, Romano MC. 1998. Insulin modifies the development and function of chicken testis in culture. Xth International Congress on Hormonal Steroids. Québec City, June 17-21.

.Bohme K, Conscience Egli M, Tschan T, Winterhalter KH, Bruckner P. 1992. Induction of proliferation or hypertrophy on chondrocytes in serum-free culture: the role of insulin-like growth factor-I, insulin or thyroxine. J Cell Biol 116: 1035-1042.

.Braid DT. 1984. The Ovary. In: Austin CR, Short RV (EDS). Reproduction in Mammals. Libro 3, Hormonal Control of Reproduction. Cambridge University Press. P. 91-114.

.Cardinali DP, Tramezzani JH, Cuello AE and Rosner JM. 1970. Proc. 3rd Int. Congr. Hormonal Steroids, p. 231. Excerpta Medica Foundation, Amsterdam.

.Castro JI, Romano MC. 1994. The effects of fetal serum and gonadotropins on testosterone production by cultured chick testicular cells. Domestic Animal Endocrinology 11(13):261-269.

.Catt KJ, Baukel AJ, Davis TF. 1979. Luteinizing hormone releasing hormone-induced regulation of gonadotropin and prolactin receptors in the rat testis. Endocrinology 104:17-25.

.Charreau E, Calvo JC, Tesone M, de Souza Valle LB and Baraña JL. 1978. Insulin regulation of Leydig cell luteinizing hormone receptors. J Biol Chem 253:2504-2506.

.Cohick WS and Clemons DR. 1993. The insulin-like growth factors. Ann. Rev. Physiol. 55:131.

.Cooke BA, Lindh LM, Janszen HA. 1977. Role of Cyclic AMP in steroidogenesis in Leydig cells: "Discrepancies" Between Effects of Luteinizing Hormone and Cholera Toxin. FEBS Lett 73: 67-71.

.Czech MP. 1989. Signal transmission by the insulin-like growth factors. Cell 59:235-238.

.Cheatman B, Shoelson SE, Yamada K, Goncalves E, Kahn CR. 1993. Substitution of the erb B-2 oncoprotein transmembrane domain activates the insulin receptor and modulates the action of insulin and insulin-receptor substrate 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7336-7340.

.Chieffi G, Manelli H, Botte V, Matroia L. 1964. Diferenziamiento chimico dell' interrenale e dei tessuti somatici de lla gonade embrionale di pollo. *Acta Embryol Exp* 7:89-91.

.Chin JE, Dickens M, Tavare JM, Roth RA. 1993. Overexpression of protein kinase C: isoenzymes α , β 1, γ , and ϵ in cells overexpressing the insulin receptor. Effects on receptor phosphorylation and signaling. *J Biol Chem* 268: 6338-6347.

.Chou CK, Dull TJ, Russell DS, Gherzi R, Lebowitz D, Ullrich A, Rosen OM. 1987. Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack protein tyrosine kinase activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin. *J Biol Chem* 262: 1842-1847.

.D' Ercole AJ. 1987. Somatomedins/insulin-like growth factors and fetal growth. *J Dev Physiol* 9: 481.

.Dai Z, Stiles AD, Moats Staats B, Van Wyk JJ, D' Ercole AJ. 1992. Interaction of secreted insulin-like growth factor-I (IGF I) with cell surface receptors is the dominant mechanism of IGF-I's autocrine actions. *J Biol Chem* 267: 19565-19571.

.Dai Z, Takahashi SI, Van Wyk JJ, D' Ercole AJ. 1992. Creation of an autocrine model of insulin-like growth factor-I action in transfected FRTL-5 cells. *Endocrinology* 130: 3175-3183.

.Daughaday WH, Rotwein P. 1989. Insulin-like growth factor-I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structure serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 10:68.

.De Mellow JSM, Handelsman DJ, Baxter RC. 1987. Short-term exposure to insulin-like growth factors stimulates testosterone production by testicular interstitial cells. *Acta Endocrinologica (Copenh)* 115: 483-489.

.De Meyts P, Gu JL, Shymko RM, Kaplan BE, Bell GI, Whittaker J. 1990. Identification of a ligand-binding region of the human insulin receptor encoded by the second exon of the gene. *Mol Endocrinol* 4: 409-416.

.De Pablo F, de la Rosa EJ. 1995. The developing CNS: a scenario for the action of proinsulin, insulin and insulin-like growth factors. *TINS* 18: 143-150.

.De Pablo F, Scott LA and Roth J. 1990. Insulin and insulin-like growth factor1 in early development: peptides, receptors and biological events. *Endocr Rev*, 11:558.

.Delrio G, di Prisco CL and Chieffi. 1967. *G. Experientia* 23: 594.

.Devoren PR. 1962. The isolation of insuline from a single cat pancreas. *Biochem Biophys Acta* 63: 150-163.

.Dubois W, Callard GV. 1993. Culture of intact Sertoli germ cell units and isolated Sertoli cells from *Squalus testis*. II. Stimulatory effects of insulin and IGF-I on DNA synthesis in premeiotic stages. *J Exp Zool* 267: 233-244.

.Dufau ML, Cigorruga SB, Baukal JA, Sorrel S, Bator JM, Neubauer JF, Katt KJ. 1979. Androgen biosynthesis in Leydig cells after testicular desensitization by luteinizing hormone-releasing hormone and human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 105: 1321-1341.

.Dufau M. 1988. Endocrine regulation and communicating functions of Leydig cell. *Ann Rev Physiol* 50:483-508.

.Duve H, Thorpe A, Lazarus NR. 1979. Isolation of material displaying insulin-like immunological and biological activity from the brain of the blowfly *Calliphora vomitoria*. *Biochem J* 184:221-227.

.Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauser E, Ou J-H, Masiar F, Kan YW, Goldfine ID, Roth RA, Rutter WJ. 1985. The human insulin receptor cDNA: The structural basis for hormone activated transmembrane signalling. *Cell* 40: 747-758.

.Ebina Y, Araki E, Taira M, Shimada F, Mori M, Craik CS, Siddle K, Pierce SB, Roth RA, Rutter WJ. 1987. Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of the insulin receptor abolishes insulin-and-antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity. *Proc Nalt Acad Sci USA* 84: 704-708.

.Ellis L, Clauser E, Morgan DO, Edery M, Roth RA, Rutter WJ. 1986. Replacement of insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163 compromises insulin-stimulated kinase activity and uptake of 2-deoxyglucose. *Cell.* 45: 721-732.

.Epple A, Brinn JE, Young JB. 1980. Evolution of pancreatic islets functions. In: *Evolution of Vertebrate Endocrine Systems*. (P.K.T. Pang y A. Epple eds). Texas Tech. Univer., Lubbock, Texas, pp. 269-231.

.Falkmer S. 1972. Insulin production in vertebrates and invertebrates. *Gen Comp Endocrinol Suppl* 3:184-191.

.Falkmer S, Emdin S, Havu N, Lundgren G, Marques M, Ostberg Y, Steiner DF, Thomas NW. 1973. Insulin in invertebrates and cyclostomes. *Amer Zool* 13:625.

.Falkmer S Osterg Y. 1976. Production of islet hormones in invertebrates, cyclostomes and primitive erathostomes. In "The Evolution of Pancreatic Islets". Edited by T Grillo, L Leibson and A Epple. Pergamon Press Oxford.

.Feener EP, Backer JM, King GL, Wilden PA, Sun XJ, Kahn CR, White MF. 1993. Insulin stimulates serine and tyrosine phosphorylation in the juxtamembrane region of the insulin receptor. *J Biol Chem* 268: 11256-11264.

.Filson AJ, Louvi A, Efstratiadis A, Robertson EJ. 1993. Rescue of the T-associated maternal effect in mice carrying mutations in *Igf.2* and *Igf2r*, two reciprocally imprinted genes. *Development* 118: 731-736.

.Flier JS, Usher P, Moses AC. 1986. Monoclonal antibody to the type I insulin-like growth factor (IGF-I) receptor blocks IGF-I receptor-mediated DNA synthesis: clarification of the mitogenic mechanisms of IGF-I and insulin in human skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:664-668.

.Florini JR, Magri KA. 1989. Effects of growth factors on myogenic differentiation. *Am J Physiol* 256: C701-C711.

.Florini JR, Ewton DZ. 1990. Highly specific inhibition of IGF-I-stimulated differentiation by antisense oligodeoxyribonucleotide to myogenin mRNA. No effects on other actions of IGF-I. *J Biol Chem* 265: 13435-13437.

.Florini JR, Magri KA, Ewton DZ, James PL, Grindstaff K, Rotwein PS. 1991. "Spontaneous" differentiation of skeletal myoblasts is dependent upon autocrine secretion of insulin-like growth factor II. *J Biol Chem* 266: 15917-15923.

.Florini JR, Ewton DZ, Roof SL. 1991. Insulin-like growth factor-I stimulates terminal myogenic differentiation by induction of myogenin gene expression. *Mol Endocrinol* 5: 718-724.

.Follet BK, Scanes CG and Nicholl TJ. 1972. The chemistry and physiology of the avian gonadotrophins. In: "Hormones Glycoproteiques Hypophysaires". Paris: Colloque Inserm pp.193.

.Fraps RM, Hooker CW and Forbes TR. 1949. Progesterone in blood plasma of cocks and nonovulating hens. *Science* 109: 493.

.Fratfali AL, Treadway JL, Pessin JE. 1991. Evidence supporting a passive role for the insulin receptor transmembrane domain in insulin-dependent signal transduction. *J Biol Chem* 266: 9829-9834.

.Frattoni AL, Treadway JL, Pessin JE. 1992. Transmembrane signaling by the human insulin receptor kinase. *J Biol Chem* 267: 19521-19528.

.Frattoni AL, Pessin JE. 1993. Relationship between alpha subunit ligand occupancy and beta subunit autophosphorylation in insulin/insulin-like growth factor-1 hybrid receptors. *J Biol Chem* 268: 7393-7400.

.Fritsch H A R, Van Noorden S, Pearse A G E. 1976. Cytochemical and immunofluorescence investigations of insulin-like producing cells in the intestine of *Mytilus edulis* L. (Bivalvia). *Cell Tissue Res* 165:365-369.

.Galindo JG, Gallardo N, Medina A, Villagrana C. 1994. An immunoreactive insulin from lobster as a growth factor for the shrimp *Penaeus vannamei*. *Revista Italiana Acquacoltura* 30:159-162.

.Gallardo N, Sotomayor H, Rodríguez J, González R, Carrillo O, González-Suárez R. 1994. Insulina inmunoreactiva aislada de la langosta *Panulirus argus* para ser utilizada como factor de crecimiento en crustáceos. Publicado en soporte magnético por la empresa SOFTCAL: 1-6.

.Gallardo N. 1998. "Péptidos similares a las insulinas de los mamíferos en la langosta *Panulirus argus* Latrielle (Crustacea, Decapoda): Análisis de la actividad biológica y caracterización de los posibles receptores". Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas

.Galli FE and Wassermann GF. 1973. Steroid biosynthesis by gonads of 7-and-10-day-old chick embryos. *Gen Comp Endocrinol* 21: 77.

.Galli FE, Irusta O and Wassermann GF. 1973. Androgen production by testes of *Gallus domesticus* during postembryonic development. *Gen Comp Endocrinol* 21: 262.

.Garnier DH 1971. Variations de la testosterone du plasma peripherique chez le *Canard Pekin* au cours du cycle annuel. *Compt Rend, Series D.* 272:1665.

.Garnier DH and Attal J. 1970. Variations de la testosterone du plasma testiculare et des cellules interstitielles chez le *Canard Pekin* au cours du cycle annuel. *Compt Rend Acad Sci, Paris* 270:2472.

.Germain Lee EL, Janicot M, Lammers R, Ullrich A, Casella SJ. 1992. Expression of a type I insulin-like growth factor receptor with low affinity for insulin-like growth factor II. *Biochem J* 281: 413-417.

.Girbau M, Gomez JA, Lesniak MA, de Pablo F. 1987. Insulin and insulin-like growth factor I both stimulate metabolism, growth, and differentiation in the postneurula chick embryo. *Endocrinology* 121: 1477-1482.

.Girbau M, Lesniak MA, Gomez JA, de Pablo F. 1988. Insulin action in early embryonic life: anti-insulin receptor antibodies retard chicken embryo growth but not muscle differentiation "in vivo". *Biochem Biophys Res Commun* 153: 142-148.

.Giudice LC. 1992. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocr Rev* 13: 641-669.

.Goberna R. 1992. El páncreas endocrino. En: *Fisiología Humana*. J.A.F. Tresguerres (eds) p. 992.

.Goldstein BJ, Muller-Wieland D, Kahn CR. 1987. Variation in insulin receptor mRNA expression in human and rodent tissues. *Mol Endocrinol* 2: 759-766.

.Goldstein BJ, Kahn CR. 1989. Analysis of mRNA heterogeneity by ribonuclease H mapping: application to the insulin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 159:664-669.

.Goncalves E, Yamada K, Thatte HS, Backer JM, Golan DE, Khan CR, Shoelson SE. 1993. Optimizing transmembrane domain helicity accelerates insulin receptor internalization and lateral mobility. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5762-5766.

.Goren HJ, White MF, Kahn CR. 1987. Separate domains of the insulin receptor contain sites of autophosphorylation and tyrosine kinase activity. *Biochemistry* 26: 2374-2381.

.Graber JW, Frankel AI, Nalbandov AV. 1967. *Gen Comp. Endocrinol* 9:187.

.Guichard AL, Cedard L and Haffen K. 1973^a. Aspect comparatif de la synthèse de stéroïdes sexuels par les gonades embryonnaires de Poulet at différents stades du développement. *Gen Comp Endocrinol* 20: 16.

.Guichard AL, Cedard L and Haffen K and Scheib D. 1973^b. Métabolisme de la prégnénolone et de la progestérone radioactives par les gonades embryonnaires de caille (*Coturnix coturnix Japonica*) en culture organotypiques. *Gen Comp Endocrinol* 21: 478.

.Gustafson TA, Rutter WJ. 1990. The cysteine-rich domains of the insulin and insulin-like growth factor I receptors are primary determinants of hormone binding specificity. Evidence from receptor chimeras. *J Biol Chem* 265: 18663-18667.

.Gustafson TA, Rutter WJ. 1990. The cysteine rich domains of the insulin and the insulin-like growth factor I receptors are primary determinants of hormone binding specificity. *J Biol Chem* 262: 1842-1847.

.Hansson HA, Billig H, Isgaard J. 1989. Insulin-like growth factor I in the developing and mature rat testis: immunohistochemical aspects. *Biol Reprod* 40: 1321-1328.

.Haour F, Saez JM. 1977. Regulation by hCG of gonadotropin receptors in testicular Leydig cells. Evidence for a down regulation. *Mol Cell Endocrinol* 7:17-24.

.Hartmann H, Meyer Albert A, Braulke T. 1992. Metabolic actions of insulin-like growth factor II in cultured adult rat hepatocytes are not mediated through the insulin-like growth factor II receptor. *Diabetologia* 35: 216-223.

.Hedo JA, Khan CR, Hayashi M, Yamada KM, Kasuga M. 1983. Biosynthesis and glycosylation of the insulin receptor. Evidence for a single polypeptide precursor of the two subunits. *J Biol Chem* 258: 10020-10026.

.Hedo JA, Gorden P. 1985. Biosynthesis of the insulin receptor. *Horm Metab Res* 17: 487-490.

.Hedo JA, Simpson IA. 1985. Biosynthesis of the insulin receptor in rat adipose cells. Intracellular processing of the Mr-190 000 proreceptor. *Biochem J* 232:71-78.

.Hernández-Sánchez C, López-Carranza A, Alarcón C, de la Rosa E, de Pablo F. 1995. Autocrine/Paracrine role of insulin-related growth factors in neurogenesis: Local expression and effects on cell proliferation and differentiation in retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9834-9838.

.Hickman J, Mc Elduff. 1989. Insulin promotes growth of the cultured rat osteosarcoma cell line UMR-106-01: An osteoblast-like cell. *Endocrinology* 124: 701-706.

.Hill DJ and Milner RDG. 1985. Insulin is a growth factor. *Pediatr Res*, 19:879.

.Hirai K, Miyamasu M, Yamaguchi M, Nakajima K, Ohtoshi T, Koshino T, Takaishi T, Morita Y, Ito K. 1993. Modulation of human basophil histamine release by insulin-like growth factors. *J Immunol* 150: 1503-1508.

.Hong EO, Cheng SC. 1967. *Gen Comp Endocrinol* 8,1.

.Hsueh AJW, Dufau ML, Catt KJ. 1976. Regulation of luteinizing hormone receptors in testicular Leydig cells by gonadotrophins. *Biochem Biophys Res Comm* 72:1145-52.

.Huhtaniemi I, Katikinemi M, Catt KJ. 1981. Regulation of LH receptors and steroidogenesis in the neonatal rat testis. *Endocrinology* 109:588-595.

.Huhtaniemi WD, Warren DW, Catt JK. 1984. Functional maturation of rat testis Leydig cells. In (ed): Ann N. Y. Acad Sci: pp.283-303.

.Humbel RF. 1990. Insulin-like growth factors I and II. Eur J Biochem 190: 445.

.Jamerson Jr. EW. 1988. Vertebrate Reproduction p. 75. USA.

.Jones JI and Clemmons DR. 1995. Insulin-Like growth factors and their binding proteins: Biological Actions. Endocr Rev. 16:3-34.

.Kahn CR, Braid KL, Flier JS, Grunfeld C, Harmon JT, Harrison LC, Karlsson FA, Kasuga M, King GL, Lang U, Postkalny JM, Van Obberghen E. 1981. Insulin receptors, receptor antibodies, and the mechanism of insulin action. Recent Prog Horm Res 37:447-538.

.Karl AF and Griswold D. 1980. Actions of insulin and vitamin A on Sertoli cells. Biochem J. 186:1001-1003.

.Karsh FJ. 1984. The Hypothalamus and Anterior Pituitary Gland. En: Austin CR, Short RV (eds). Reproduction in mammals. Book 3, Hormonal Control of Reproduction. Cambridge University Press. P. 1-20.

.Kato H, Faria TN, Stannard B, Roberts CTJ, Le Roith D. 1993. Role of tyrosine kinase activity in signal transduction by the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor. Characterization of kinase-deficient IGF-I receptors and the action of an IGF-I mimetic antibody (ALPHA ir-3). J Biol Chem 268: 2655-2661.

.Khan S, Teerds K, Dorrington J. 1992. Growth factor requirements for DNA synthesis by Leydig cells from the immature rat. Biol Reprod 46: 335-341.

.Kiess W, Hasskell JF, Lee L. 1987. An antibody that blocks insulin like growth factor (IGF) binding to the type II IGF receptor is neither against nor an inhibitor of IGF stimulated biologic responses in L-6 myoblast. J Biol Chem 262: 12745-12751.

.Kjeldsen T, Andersen AS, Wiberg FC, Rasmussen JS, Schaffer L, Blaschmidt P, Moller KB, Moller NP. 1991. The ligand specificities of the insulin receptor and the insulin-like growth factor I receptor reside in different regions of a common binding site. Proc Natl Acad Sci USA 88: 4404-4408.

.Knobil E and Weill JD. 1988. The Physiology of Reproduction. Raven Press, New York. Vol. 1.

.Kooijman R, Willems M, Rijkers GT, Brinkman A, Van Buul Offers SC, Heijnen CJ, Zeegers BJ. 1992. Effects of insulin-like growth factors and growth hormone on the "in vitro" proliferation of T lymphocytes. J Neuroimmunol 38: 95-104.

.Kramer KJ, Child CN, Speirs RD and Jacobs RM. 1982. Purification of the insulin-like peptide insect hemolymph and royal jelly. *Insect Biochem* 12: 91-98.

.Lake PE and Furr JA. 1971. The Endocrine Testis in Reproduction. In: "Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl", Vol.3 (DJ Bell and BM Freeman; Eds.) New York: Academic Press, Chapter 62.

.Lake PE. 1957. The male reproductive tract of the fowl. *J Anat* 91: 116.

.Lee TS, Mc gregor LC, Fluharty SJ, King GL. 1989. Differential regulation of protein kinase C and (Na⁺, K⁺)- adenosine triphosphate activities by elevated glucose levels in retinal capillary endothelial cells. *J Clin Invest* 83: 90-94.

.Lee TS, Saltsman KA, Ohashi H, King GL. 1989. Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5141-5145.

.Le Roith D, Shiloach J, Roth J, Lesnik MH. 1980. Evolutionary origin of vertebrate hormones substance similar to mammalian insulins are native to unicellular eucaryotics. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:6184-6188.

.Le Roith D, Shiloach J, Roth J, Lesnik MH. 1981. Insulin or a closely related molecule is native to *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 256:6533-6536.

.Lewis RE, Cao L, Perregaux D, Czech MP. 1990. Threonine 1336 of the human insulin receptor is a major target for phosphorylation by protein kinase C. *Biochemistry* 29: 1807-1813.

.Lewis RE, Wu GP, Mac Donald RG, Czech MP. 1990. Insulin-sensitive phosphorylation of serine 1293/1294 on the human insulin receptor by a tightly associated serine kinase. *J Biol Chem* 265: 947-954.

.Lin T, Haskell J, Vinson N, Terracio L. 1986. Direct stimulatory effects of insulin-like growth factor-I on Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Biochem Biophys Res Commu* 137: 950-956.

.Lin T. 1996. Insulin-like growth factor-I regulation of the Leydig cell In: Payne A, Hardy M, Russell (eds) *The Leydig Cell*. Cache River Press, Vienna, Vol. 1:477-491.

.Linder HR. 1961. Androgens and related compounds in the spermatic vein blood of domestic animals. I. Neutral steroids secreted in the bull testes. *J Endocrinol* 23: 139.

.Lofts B and Murton RK. 1973. Reproduction in birds. In: "Avian Biology", Vol.3 (DS Farner and JR King, Eds). New York. Academic Press, Chapter 1.

.Lofts B, Bern HA. 1972. The functional morphology of steroidogenic tissues. In: "Steroids in Non-mammalian Vertebrates" (DR Idler, Ed.). New York: Academic Press, p.37.

.Lowe WL. 1991. Biologic actions of the insulin-like growth factors. In: Le Roith D (eds) *Insulin-Like Growth Factors: Molecular and Cellular Aspects*. CRC Press, Boca Raton, pp 49-85.

.Lu K, Campisi J. 1992. Ras proteins are essential and selective for the action of insulin-like growth factor 1 late in the G1 phase of the cell cycle in BALB/c murine fibroblast. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3889-3893.

.Maller JL, Koontz JW. 1981. A study of the induction of cell division in amphibian Oocytes by insulin. *Developmental Biol* 85: 309-316.

.Marinez de NR, Garcia MC, Salas M and Candela JLR. 1973. Proteins with insulin-like activity isolated from one oyster (*Ostrea edulis* L) Hepatopancreas. *Gen Comp Endocrinol* 20: 305-311.

.Mc Cauley VM. 1992. Insulin-like growth factors and cancer. *Br J Cancer* 65: 311-320.

.Mc Clain DA, Maegawa H, Lee J, Dull TJ, Ullrich A, Olefsky JM. 1987. A mutant insulin receptor with defective tyrosine kinase displays no biological activity and does not undergo endocytosis. *J Biol Chem* 262: 14663-14671.

.Merchav S, Silvan Drachler I, Tatarsky I, Lake M, Skottner A. 1992. Comparative studies of the erythroid-potentiating effects of biosynthetic human insulin-like growth factors-I and-II. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 447-452.

.Merchav S, Graif Z, Skottner A. 1993. In-vitro response of erythroid pregenitors from children with thalassaemia major to human growth hormone and insulin-like growth factor I. *Clin Endocrinol (Oxf)* 39: 207-211.

.Moore A, Morris ID. 1993. The involvement of insulin-like growth factor-I in local control of steroidogenesis and DNA synthesis of Leydig and non-Leydig cells in the rat testicular interstitium. *J Endocrinol* 138: 107-114.

.Morell B, Froesch ER. 1972. Fibroblast as an experimental tool in metabolic and hormone studies. II. Effects of insulin and Nonsuppressible Insulin-Like Activity (NSILA-S) on fibroblasts in culture. *Europ J Clin Invest* 3: 119-123.

.Morell B, Froesch ER. 1973. Fibroblast as an experimental tool in metabolic and hormones studies I. Growth and glucose metabolism of fibroblast in culture. *Europ J Clin Invest* 3: 112-118.

- .Morera AM, Chauvin MA, de Peretti E, Binoux M and Benehmed M.** 1987. Somatomedin C/insulin-like growth factor 1: An intratesticular differentiative factor of Leydig cells?. *Horm Res* 28: 50-57.
- .Mosthaf L, Vogt B, Harring HU, Ullrich A.** 1991. Altered expression of insulin receptor types A and B in the skeletal muscle of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4728-4730.
- .Mosthaf L, Eriksson J, Harring HU, Groop L, Widen E, Ullrich A.** 1993. Insulin receptor isotype expression correlates with risk of non-insulin dependent diabetes. *Proc Natl. Acad Sci USA* 90: 2633-2635.
- .Mottola C, Czech MP.** 1984. The type II insulin-like growth factor receptor does not mediate increased DNA synthesis in H-35 hepatoma cells. *J Biol Chem* 259: 12705-12713.
- .Muller-Wieland D, Taub RA, Tewari DS, Kriauciunas KM, Reddy SSK, Kahn CR.** 1989. The insulin receptor gene and its expression in patients with insulin resistance. *Diabetes* 38:31-38.
- .Myers MG, Backer JM, Siddle K, White MF.** 1991. The insulin receptor functions normally in Chinese hamster ovary cells after truncation of the C-terminus. *J Biol Chem* 266: 10616-10623.
- .Nakamura T and Tanabe Y.** 1972. In vitro steroidogenesis by testes of the chicken (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol* 59: 651.
- .Nalbandov AV.** 1945. *Endocrinology* 36,251.
- .Nalbandov AV.** 1959. In: *Comparative Endocrinology* (A. Gorbman, ed.) Wiley, New York p. 161.
- .Narbaitz R, Sabatini D.** 1963. Histochemical demonstration of cholesterol in differentiating gonads. *Z Zellforsch* 59:1-5.
- .Nicholls TJ and Graham GP.** 1972. Observations on the ultrastructure and differentiation of Leydig cells in the testis of the *Japanese quail* (*Coturnix coturnix Japonica*). *Biol Rprod* 6: 179.
- .Nielsen FC.** 1992. The molecular and cellular biology of insulin-like growth factor II. *Prog Growth Factor Res* 4: 257-290.
- .Nissley SP, Kiess W, Sklar MM.** 1991. The insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor. In: *Le Roith D (eds) Insulin-Like Growth Factors: Cellular and Molecular Aspects.* CRC Press. Boca Raton, pp11-150.

- .Pedernera E, Mendoza H, Aguilar MC, Romano M.** 1984. Postnatal development of Leydig cells in the testis of domestic fowl. *Ann N. Y. Acad Sci* 1987:340-343.
- .Penhoat A, Naville D, Jaillard C, Chatelain PG, Saez JM.** 1989. Hormonal regulation of insulin-like growth factor I secretion by bovine adrenal cells. *J Biol Chem* 264:6858-6862.
- .Perrard-Sapori MH, Chatelain PG, Jaillard C, Saez JM.** 1987. Characterization and regulation of somatomedin-C/insulin-like growth factor-I (Sm-C/IGF-I) receptors on cultured pig Leydig cells. *Eur J Biochem* 165: 209-214.
- .Pimentel B, de la Rosa E, de Pablo F.** 1996. Insulin acts as an embryonic growth factor for *Drosophila* neural cells. *Biochem Biophys Res Com* 226: 855-861.
- .Plisetskaya EM, Kazarov VK, Soltitskaya L, Leibson LG.** 1978. Insulin-producing cells in the gut of freshwater bivalve molluscs *Anodonta cygnea* and *Unio pictorum* and the role of insulin in the regulation of their carbohydrate metabolism. *Gen Comp Endocr* 35:133-145.
- .Quin JD.** 1992. The insulin-like growth factors. *Q J Med* 82: 81.
- .Rafaeloff R, Patel R, Yip C, Goldfine ID, Hawley DM.** 1989. Mutation of the high cysteine region of the human insulin receptor α -subunit increases insulin receptor binding affinity and transmembrane signaling. *J Biol Chem* 264: 15900-15904.
- .Rinderknecht E, Humbel RE.** 1976. Amino-terminal sequences of two polypeptides from human serum with nonsuppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities: evidence for structural homology with insulin B chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 4379-4381.
- .Rinderknecht E, Humbel RE.** 1978. Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett* 89: 283-286.
- .Rinderknecht E, Humbel RE.** 1978. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and II and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253: 2769-2776.
- .Rosen OM.** 1987. After insulin binds. *Science* 237:1452.
- .Roullier-Fabre V, Lecref L, Gautier C, Saez JM, Habert R.** 1998. Expression and effect of insulin-like growth factor-I on rat fetal Leydig cell function and differentiation. *Endocrinology* 139: 2926-2934.
- .Saez JM.** 1994. Leydig cells: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Endocr Rev.* 15:574-626.

- .Sanders B.** 1983^a. Insulin-like peptide in the lobster *Homarus americanus*. I. Insulin Immunoreactivity. *Gem Comp Endocrinol* 50: 366-373.
- .Sara VR, Hall K.** 1990. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev* 70: 591-614.
- .Schumacher R, Mosthaf L, Schlessinger J, Branderburg D, Ullrich A.** 1991. Insulin and insulin-like growth factor-1 binding specificity is determined by distinct regions of their cognate receptors. *J Biol Chem* 266: 19288-19295.
- .Seecof RL, Dewhurst S.** 1974. Insulin is a *Drosophila* hormone and acts to enhance the differentiation of embryonic *Drosophila* cells. *Cell Differentiation* 3: 63-70.
- .Seino S, Bell GI.** 1989. Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 159: 312-316.
- .Seino S, Seino M, Bell GI.** 1989. Human insulin-receptor gene. *Diabetes* 39:129-133.
- .Sharpe RM.** 1976. hCG-induced decrease in availability of rat testis receptors. *Nature* 264:644.
- .Soos MA, Field CE, Lammers R, Ullrich A, Zhang B, Roth RA, Andersen AS, Kjeldsen T, Siddle K.** 1992. A panel of monoclonal antibodies for the type I insulin-like growth factor receptor. Epitope mapping, effects on ligand binding, and biological activity. *J Biol Chem* 267: 12955-12963.
- .Stadmauer L, Rosen OM.** 1986. Increasing the cAMP content of IM-9 cells alters the phosphorylation state and protein kinase activity in the insulin receptor. *J Biol Chem* 261: 3402-3407.
- .Starcke ML, Engel JD, Wilson LW, Rechler MM, Liotta LA, Schiffmann E.** 1989. The type I insulin-like growth factor receptor is a motility receptor in human melanoma cells. *J Biol Chem* 264: 21544-21549.
- .Steele Perkins G, Turner J, Edman JC, Hari J, Pierce SB, Stouner C, Rutter WJ, Roth RA.** 1988. Expressions and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem* 263: 11486-11492.
- .Steele Perkins G, Roth RA.** 1990. Monoclonal antibody alpha IR-3 inhibits the ability of insulin-like growth factor II to stimulate a signal from the type I receptor without inhibiting its binding. *Biochem Biophys Res Commun* 171:1244-1251.
- .Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ and Meyer HG.** 1970. The unlabelled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-anti horseradish

peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18: 315-333.

.Straus DS. 1981. Effects of insulin on cellular growth and proliferation. *Life Sci*, 29:2131.

.Straus DS. 1984 Growth-stimulatory actions of insulin "*in vitro*" and "*in vivo*". *Endocr Rev*, 5:536.

.Stumpo DJ, Blackshear PJ. 1991. Cellular expressions of mutant insulin receptors interferes with the rapid transcriptional response to both insulin and insulin like growth factor I. *J Biol Chem* 266: 455-460.

.Sturkie PD. 1976. Reproduction in the Male, Fertilization, and Early Embryonic Development. In: *Avian Physiology*. 3^a de Springer-Verlag, New York.

.Tager HS, Marquese J, Kramer KJ, Speirs RD, Childs CN. 1976. Glucagon-like and insulin-like hormones of the insect neurosecretory system. *Biochem J* 156:515-520.

.Takayama S, White MF, Kahn CR. 1988. Phorbol ester-induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity. *J Biol Chem* 263: 3440-3447.

.Takayama S, White MF, Lauris V, Kahn CR. 1984. Phorbol esters modulate insulin receptor phosphorylation and insulin action in hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 7797-7801.

.Tahka KM. 1986. Current aspects of Leydig cell function and its regulation. *J Reprod Fert* 78: 367-380.

.Tavare JM, O'Brien RM, Siddle K, Denton RM. 1988. Analysis of insulin receptor phosphorylation sites in intact cells by two-dimensional phosphopeptide mapping. *Biochem J* 253: 783-788.

.Tavare JM, Ramos P, Ellis L. 1992. An assessment of human insulin receptor phosphorylation and exogenous kinase activity following deletion of 69 residues from the carboxyl-terminus of the receptor β -subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 188: 86-93.

.Tavare JM, Siddle K. 1993. Mutational analysis of insulin receptor function: Consensus and controversy. *Biochim Biophys Acta* 1178: 21-39.

.Tavare JM, Zhang B, Ellis L, Roth RA. 1991. Insulin-stimulated serine and threonine phosphorylation of the human insulin receptor. An assessment of the role of serines 1305/1306 and threonine 1348 by their replacement with neutral or negatively charged amino acids. *J Biol Chem* 266: 21804-21809.

.Taylor SI, Cama A, Accili D, Barbetti F, Quon MJ, de la Luz-Sierra M, Suzuki Y, Koller E, Levy-Toledano R, Wertheimer E. 1992. Mutations in the insulin receptor gene. *Endocr Rev* 13: 566-595.

.Thies RS, Ullrich A, Mc Clain DA. 1989. Augmented mitogenesis and impaired metabolic signaling mediated by a truncated insulin receptor. *J Biol Chem* 264: 12820-12825.

.Timsit J, Savino W, Safieh B, Chanson P, Gagnerault MC, Bach JF, Dardenne M. 1992. Growth hormone and insulin-like growth factor-I stimulate hormonal function and proliferation of thymic epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 183-188.

.Tingari MD, 1973. Histochemical localization of 3 β - and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in the male reproductive tract of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Histochem J* 5: 57.

.Tornqvist HE, Pierce MW, Frackelton AR, Nemenoff RA, Avruch J. 1987. Identification of insulin receptor tyrosine residues autophosphorylated *in vitro*. *J Biol Chem* 262: 10212-10219.

.Torqvist HE, Avruch J. 1988. Relationship of site-specific tyrosine autophosphorylation to insulin activation of the insulin receptor (tyrosine) protein kinase activity. *J Biol Chem* 263: 4593-4601.

.Treadway JL, Morrison BD, Soos MA, Siddle K, Olefsky J, Ullrich A, Mc Clain DA, Pessin JE. 1991. Transdominant inhibition of tyrosine kinase activity in mutant insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 214-218.

.Tsuruhara T, Dufau ML, Cigorruga S, Catt KJ. 1977. Hormonal regulation of testicular luteinizing hormone receptors. *J Biol Chem* 252:9002-9.

.Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petuzzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao Y-C, Tsubokawa M, Masson A, Seeburg PH, Grunfeld C, Rosen OM, Ramachandran J. 1985. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313: 756-761.

.Ullrich A, Schelessinger J. 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61:203-212.

.Vaeheri A, Ruoslahti E, Oivo T. 1974. Cell surface and growth control of chick embryo fibroblast in culture. In: *Control of Proliferation in Animal Cells*. Clarkson/Baserga (eds.). USA. p. 305.

.Webster NJG, Kong Y, Cameron KE, Resnik JL. 1994. An upstream element from the human insulin receptor gene promoter contains sites for C/EBP β and NF-1. *Diabetes* 43:305.

.Werner H, Woloschak M, Stannard B, Shen-Orr Z, Roberts Jr CT, Le Roith D. 1991. The insulin-like growth factor I receptor: molecular biology, heterogeneity, and regulation. In: Le Roith D (eds) *Insulin-Like Growth Factors: Molecular and Cellular Aspects*. CRC Press, Boca Raton, pp17-47.

.White MF, Shoelson SE, Keutmann H, Kahn CR. 1988. A cascade of tyrosine autophosphorylation in the β -subunit activates the insulin receptor. *J Biol Chem* 263: 2969-2980.

.Wilden PA, Backer JM, Kahn CR, Cahill DA, Schroeder GJ, White MF. 1990. Characterization of the insulin receptor with an *in vitro* mutation at tyrosine 1146: evidence for separate insulin receptor signals regulating cellular metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3358-3362.

.Wilden PA, Kahn CR, Siddle K, White MF. 1992. Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic function. *J Biol Chem* 267: 16660-16668.

.Wilden PA, Siddle K, Haring E, Backer JM, White MF, Kahn CR. 1992. The role of insulin receptor kinase domain autophosphorylation in receptor-mediated activities. *J Biol Chem* 267: 13719-13727.

.Williams RH. 1985. *Tratado de Endocrinología 7ª Edición*. Edit. Interamericana. Mexico. P. 80-128.

.Woods JE and Domm LV. 1966. A histochemical identification of the androgen producing cells in the gonads of the domestic fowl and albino rat. *Gen Comp Endocrinol* 7: 559.

.Woods JE, Podczaski ES, Erton LH, Rutherford JE, Mc Carter CF. 1977^a. Establishment of the adenihipophyseal-testicular axis in the chick embryo I. Testicular androgen levels. *Gen Comp Endocrinol* 32:390-394.

.Woods JE, Rutherford JE. 1977^b. Establishment of the adenohipophyseal-testicular axis in the chick embryo. *Am Zool* 17:229.

.Woods JE, Rutherford JE, Thomas RC. 1983. Functional development of the hypothalamic-ado-hipophyseal-testicular (HAT) axis in the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 50:235-241.

.Woods JE. 1987. Maturation of the hypothalamo-adenohypophyseal gonadal axe (HAG) in the chick embryo. *J Exp Zool (Suppl.1)*: 265-271.

.Xion L, Kasuya J, Li SL, Kato J, Fujita Yamaguchi Y. 1992. Growth stimulatory monoclonal antibodies against human insulin-like growth factor I receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5356-5360.

.Yamada K, Goncalves E, Kahn CR, Shoelson SE. 1992. Substitution of the insulin receptor transmembrane domain constitutively activates the insulin receptor kinase *in vitro*. *J Biol Chem* 267: 12452-12461.

.Yamaguchi Y, Flier JS, Benecke H, Ransil BJ, Moller DE. 1993. Ligand-binding properties of the two isoforms of the human insulin receptor. *Endocrinology* 132:1132-1138.

.Yamaguchi Y, Flier JS, Yokota A, Benecke H, Backer JM, Moller DE. 1991. Functional properties of two naturally occurring isoforms of the human insulin receptor in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology* 129:2058-2066.

.Yang Feng TL, Francke U, Ullrich A. 1985. Gene for human insulin receptor: localization to site on chromosome 19 involved in pre-B-cell leukemia. *Science* 228:728-781.

.Yip CC. 1992. The insulin-binding domain of insulin receptor is encoded by exon 2 and exon 3. *J Cell Biochem* 48: 19-25.

.Zapf J, Froesch ER. 1986. Insulin-like growth factors/somatomedins: structure, secretion, biological actions and physiological role. *Horm Res* 24:121.

.Zapf J, Froesch ER. 1986. Pathophysiological and clinical aspects of the insulin-like growth factors. *Horm Res* 24: 160.