



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

***“PARTICIPACIÓN DE LA INSULINA EN LA
PROLIFERACIÓN Y EN LA REGULACIÓN DE LA
SÍNTESIS DE TESTOSTERONA EN LAS CÉLULAS
DE LEYDIG DEL RATÓN Mus musculus”.***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

SALOMÓN SANTAMARÍA GONZÁLEZ



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Mauricio Rodríguez Dorantes
Vocal	José Pedraza Chaverri
Secretario	María Irma Villalpando Fierro
1er Suplente	Enrique Moreno Saenz
2º Suplente	Oscar Armando Pérez Méndez

Sitio donde se desarrollo el tema:

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Depto. de Fisiología y Biología Celular, UNAM.

Asesor:

Dra. María Irma Villalpando Fierro

Sustentante:

Salomón Santamaría González

No os dejéis corromper por un escepticismo estéril y deprimente; no os desalentéis ante la tristeza de ciertas horas que pasan sobre las naciones. Vivid en serena paz de los laboratorios; preguntaos primero: ¿qué he hecho por instruirme? y después, a medida que vayáis progresando: ¿qué he hecho por mi patria? Hasta que llegue el día en que podáis tener la íntima satisfacción de pensar en que habéis contribuido de alguna manera al progreso y bienestar de la humanidad.

Luis Pasteur

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Irma Villalpando, por haberme permitido la realización de este trabajo.

A la M en C Esmeralda Lira, por el tiempo dedicado y las enseñanzas dadas para la realización de este trabajo.

A la maravillosa Facultad de Química, por sus instalaciones, sin ellas, esta carrera sería aún mas complicada; y que con sus excelentes profesores, a los que les doy las gracias por los conocimientos y lecciones de vida transmitidos; y que juntos son parte fundamental de una gran institución, de las mejores del mundo, la UNAM, gracias por existir y mantenerte siempre a la vanguardia,

A todos mis profesores que han aportado algo para mi superación a lo largo de toda mi vida académica, gracias por dedicar ese tiempo para conmigo, ¡¡de algo sirvió!!!!

DEDICATORIAS

Para alguien o algo difícil de explicar, DIOS, una obra mas en mi vida, dedicada a ti.

Dedico esto, no como un trabajo, sino como la culminación de una importante etapa de mi vida, para aquellas personas que confiaron en mi, el Sr Salomón y la Sra Carmela, mis queridos padres, por todo el apoyo incondicional que me brindaron; Flavia y Guadalupe, carnalas para ustedes, por aguantarme todos estos años, y no olvidar a la colada de la prima Auria. Mis niñas, Janeth y Andrea, aunque no sepan leer, también esto va para ustedes, échelen ganitas, porque quiero que me superen. Dicho de paso, gracias por estar a mi lado, solo no lo hubiera podido conseguir.

A mis amigos de la vida y de la escuela, que leerán esto, a los compañeros, que espero se acuerden de mi, para ustedes, por los buenos momentos que hemos vivido, por el apoyo que me han brindado o por lo menos un bonito saludo, haciendo mas agradable el transcurso de los días.

ABREVIATURAS

CGPs	Células germinales primordiales
d. g.	Días de gestación
Sry	Región determinante sexual del cromosoma Y
HMG	Grupo de alta movilidad
IRS	Sustrato del receptor de insulina
Thr	Tirosina
Ser	Serina
Src	Proteína codificada por el oncogen src
SH	Dominio homólogo a Src
MAPK	Proteínas cinasas asociadas a mitógenos
PK	Proteína cinasa
GLUT	Transportador de glucosa
PBS	Solución amortiguadora de fosfato
BrdU	Bromodeoxiuridina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína

INDICE

I.	RESUMEN	9
II.	INTRODUCCIÓN	10
	1. DESARROLLO TESTICULAR	10
	1.1 Etapa de cresta genital	10
	1.2 Etapa de gónada indiferenciada	12
	1.3 Determinación sexual del testículo	14
	1.4 Genes que regulan la diferenciación sexual masculina	16
	2. CÉLULAS DE LEYDIG	18
	3. INSULINA	18
	3.1 Estructura y biosíntesis de la insulina	19
	3.2 Organización del gen y ubicación	21
	3.3 El receptor de insulina	22
	3.4 Formación y fosforilación del complejo insulina-receptor	23
	3.4.1 Sustrato del receptor de la insulina	23
	3.5 Mecanismo trasduccionales de la acción de la insulina	25
	3.5.1 Sistema adenilatociclasa	25
	3.6 Mecanismos postransduccionales de la acción de la insulina	25
	3.6.1 Efectos de la insulina sobre proliferación y diferenciación celular	26
	4. ESTEROIDES	27
	4.1 Biosíntesis	27
	4.2 Andrógenos	27
	4.3 Testosterona	28
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPOTESIS	31
IV.	OBJETIVOS	32
V.	MATERIAL Y MÉTODOS	33
	a) Material biológico	33
	b) Aislamiento del tejido	33
	c) Purificación de las células de Leydig	33
	d) Conteo de células	34

e) Cultivo celular	35
f) Fijación de las células	35
g) Inmunodetección	35
h) Fotografías	36
i) Extracción de esteroides	36
j) Radioinmunoanálisis	37
k) Análisis estadístico	37
VI. RESULTADOS	38
VII. DISCUSIÓN	47
VIII. CONCLUSIONES	51
IX. BIBLIOGRAFÍA	52
X. APÉNDICE	57

I. RESUMEN

La insulina es una hormona que regula diversas funciones en los mamíferos, tales como el metabolismo de la glucosa y la división celular, entre otras. Sin embargo, su función en la regulación de la proliferación de las células productoras de hormonas sexuales, como son Leydig, en la etapa embrionaria del ratón *Mus musculus*, no se ha descrito hasta la fecha. Por lo que el objetivo de la presente investigación fue determinar si la insulina induce la proliferación de las células de Leydig a los 14, 16 y 18 días de gestación (d.g.). Se emplearon ratones hembras gestantes de la cepa CD1. Se obtuvieron los embriones a los días mencionados anteriormente, se les extrajeron los testículos y se formaron grupos de 30 a 40. Se purificaron las células de Leydig por métodos enzimáticos. Se sembraron 3.5×10^3 células en medio D'MEM con BrdU con y sin 100 ng/mL de insulina, 24 h con 5% de CO₂. Las células marcadas se detectaron con un anticuerpo fluoresceínado. El medio de cultivo se guardó y se extrajeron los esteroides con éter (1:10) para la cuantificación de testosterona, por radioinmunoanálisis (RIA). Se observó que la insulina indujo la proliferación celular, con un aumento del 6% a los 14 d.g., del 16% a los 16 d.g. y del 26% a los 18 d.g. Las diferencias entre el grupo control y el experimental fueron significativas con la prueba *t* de student. Así mismo, se observó una regulación positiva de la insulina sobre la síntesis de testosterona a los 16 d.g. (significativo a $p < 0.05$) y negativa a los 14 y 18 d.g. (significativo a $p < 0.10$). Por lo que se propone que la insulina induce la proliferación a lo largo de todas las etapas estudiadas y regula positivamente la síntesis de testosterona dependiendo de la edad de desarrollo del embrión

I. INTRODUCCIÓN

1. DESARROLLO TESTICULAR

Las gónadas son órganos que desempeñan una doble función en el organismo: a) son las glándulas endocrinas encargadas de elaborar y secretar factores de crecimiento, de transcripción, así como proteínas involucrados en la diferenciación sexual durante el desarrollo y en el mantenimiento de las funciones reproductoras del organismo adulto; b) son sitios en los que se lleva a cabo la proliferación, diferenciación y maduración de los gametos (Villalpando, 2001).

Desde el punto de vista del desarrollo ontogénico, el establecimiento de las diferentes líneas celulares se lleva a cabo en diferentes tiempos, a partir de la proliferación y diferenciación del cigoto. El desarrollo testicular embrionario ocurre en tres etapas o fases importantes: cresta genital, gónada indiferenciada y determinación sexual. Las dos primeras fases son comunes a las hembras y machos; en la última, la gónada indiferenciada se desarrolla de acuerdo al sexo genético que se estableció en la fertilización, ya sea XX (hembra) o XY (macho) (Villalpando, 2001).

1.1 Etapa de cresta genital

Las gónadas se originan de una región alargada de mesoderma situado a lo largo del borde ventromedial del mesonefros. Las células de la parte craneal de esta zona se condensan para formar los primordios adrenocorticales, y las de la parte caudal se convierten en las crestas genitales. Estas se componen de dos

poblaciones principales de células: una derivada del epitelio celómico y la otra procedente de la cresta mesonéfrica (Carlson, 2004). Esta etapa corresponde de los 9.5 a los 10.5 d.g. en ratones. Siendo las CGPs las causantes de su formación. Se ha planteado que estas últimas derivan del ectodermo embrionario, pero son detectadas hasta el día 8 de la gestación, en esta misma especie, en la base de la alantoides. Las CGPs migran desde su sitio de determinación inicial, hasta la región urogenital donde se formarán las gónadas, por medio de dos tipos de movimientos: pasivo y activo. En el primero, las CGPs son transportadas con los tejidos que las rodean y que se desplazan de un lugar a otro, por crecimiento diferencial del embrión. El movimiento activo implica la capacidad motriz de la CGPs para desplazarse a través de los tejidos embrionarios por emisión de pseudopodos, lamelipodios o filopodios. Se han propuesto tres mecanismos para explicar la direccionalidad del desplazamiento de las células germinales primordiales (Villalpando, 2001):

El primero sería por un gradiente de concentración de algún factor secretado por las células del epitelio celómico situado en la región urogenital. En este caso se guiarían por un proceso de quimiotaxis, de manera que al pasar por la región urogenital atraviesan la pared de los vasos sanguíneos para dirigirse hacia el epitelio celómico. Actualmente se sabe que un posible factor quimiotáctico sería el factor de crecimiento transformante β . El segundo mecanismo posible es el denominado "guía por contacto", que implica la existencia de receptores específicos en la superficie de las células germinales primordiales, capaces de

adherirse colectivamente a moléculas presentes en la superficie de las células mesenquimáticas y en la matriz extracelular. El tercer mecanismo propuesto se refiere a la organización topográfica de las células somáticas del embrión en el momento del desplazamiento de las CGPs. Aquí las primeras, junto con los componentes estructurales de la matriz extracelular, estarían dispuestas en tal forma que las CGPs no podrían salirse del “túnel” que físicamente las dirigiría hacia la cresta genital (Merchant, 1993).

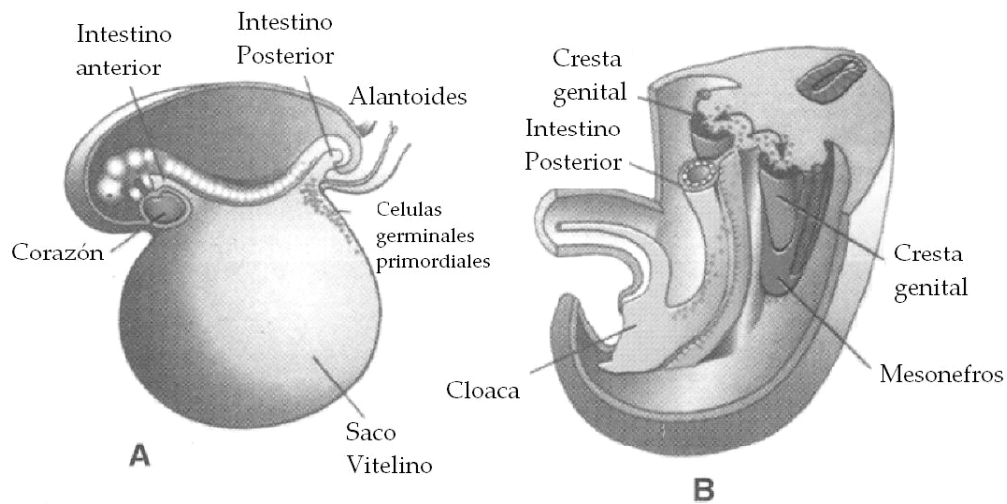


Fig.1. A. Embrión de 9-12 días de gestación. B. Camino que siguen las células germinales primordiales desde el intestino posterior hacia la cresta genital, (Sadler, 2004).

1.2 Etapa de gónada indiferenciada

Poco antes de la llegada de las CGPs y durante su arribo, el epitelio de la cresta genital prolifera y las células epiteliales penetran en el mesénquima subyacente. Aquí se forman varios cordones irregulares, que caracterizan a la gónada indiferenciada (Sadler, 2004). Esta etapa se observa en el ratón a los 11 y 11.5

d.g., hasta este momento del desarrollo gonadal es imposible diferenciar entre la gónada masculina y femenina (Villalpando, 2001).

Posteriormente, las CGPs alcanzan la región de la cresta genital, donde son rodeadas por células mesenquimáticas y mesoteliales con las que se asocian estrechamente, formando el primordio gonadal. En esta región se lleva a cabo una diferenciación tisular que antecede a la diferenciación de este órgano. Las células somáticas del primordio gonadal son de origen mesodérmico y son de tres tipos: mesenquimáticas, mesoteliales y endoteliales. Los dos primeros tipos celulares inician una gran actividad proliferativa al llegar las CGPs, de manera que forman un agregado compacto que se denomina “blastema gonadal”. Posteriormente, se inicia el depósito de una delgada lámina basal entre las células del primordio gonadal, que gradualmente lleva a la formación de los cordones sexuales de tipo epitelial (Merchant, 1993). Conforme los cordones sexuales se diferencian, se separan del epitelio superficial mediante una densa capa de tejido conectivo llamada túnica albugínea. Las porciones más profundas de los cordones sexuales testiculares están en contacto con las formaciones quinta a duodécima de las nefronas mesónéfricas (Carlson, 2004). Hacia el hilio de la glándula, los cordones se disgregan en una red de diminutos filamentos celulares que posteriormente darán origen a los túbulos de la *red de Haller* o *rete testis*. Durante el desarrollo ulterior, una capa compacta de tejido conectivo fibroso, la *túnica albugínea*, separa a los cordones del testículo del epitelio superficial. En este mismo tiempo comienzan a formarse los *conductos paramesonéfricos* o *de Müller*, que aparecen

inmediatamente laterales a los conductos mesonéfricos en ambos sexos (Sadler, 2004).



Fig. 2. Gónada indiferenciada de ratón 11.5 d.g. (Merchant , 1993).

1.3 Determinación sexual del testículo

En los mamíferos, la primera manifestación estructural de la diferenciación se detecta en la gónada de los machos. En el ratón, esta etapa ocurre entre los 12 y 13.5 d.g (Villalpando, 2001). Lo primero que se observa, es una separación de los cordones sexuales del epitelio superficial de la gónada derivada del mesotelio . El traslado de los cordones sexuales a la región medular de la gónada, es un movimiento morfogenético que implica cambios en la adhesividad de las células epiteliales (Merchant, 1993). Debido al arreglo topográfico celular de los cordones sexuales en la zona central del testículo, éstos son llamados ahora, por su posición, cordones seminíferos (Villalpando, 2001). Al producirse la regresión del

mesonefros, algunos túbulos excretores, los *túbulos epigenitales*, entablan contacto con la red de Haller y por último forman los conductillos eferentes del testículo, los *túbulos paragenitales*, no se unen con los cordones de la red de Haller. En conjunto, los vestigios de estos conductillos se denominan paradídimo. Los conductos mesonéfricos persisten, excepto por su porción más craneal denominada *apéndice del epidídimo* y forman los conductos genitales principales. Inmediatamente por debajo de la desembocadura de los conductillos eferentes, los conductos mesonéfricos se alargan y se arrollan sobre sí mismos, lo que da origen al *epidídimo*. Desde la cola del epidídimo hasta la evaginación de la vesícula seminal, los conductos mesonéfricos adquieren una gruesa túnica muscular y se convierten en el *conducto deferente*. Más allá de la vesícula seminal reciben el nombre de *conducto eyaculador* (Sadler, 2004).

Los cordones sexuales testiculares contienen en su interior a las CGPs, que se diferenciarán de proespermatozonias, espermatozoides y células de Sertoli, sintetizadoras de la hormona inhibidora de los conductos de Müller, entre otros péptidos (Villalpando, 2001). Por otra parte, en el tejido estromático que rodea a los cordones seminíferos, se encuentran los siguientes tipos celulares: células mioideas, muy cercanas a la lámina basal envolviendo a los cordones; vasos sanguíneos; fibroblastos y las células de Leydig (Merchant, 1993). Posteriormente, estas células sufren una regresión progresiva, de manera que en los últimos días de la gestación los testículos fetales poseen un tejido intersticial formado por un mesénquima laxo, capilares sanguíneos y algunos grupos de células de Leydig poco diferenciadas. Estas células desaparecen completamente durante los

primeros días después del nacimiento debido a la desaparición de las gonadotropinas provenientes de la placenta (Merchant, 1993).

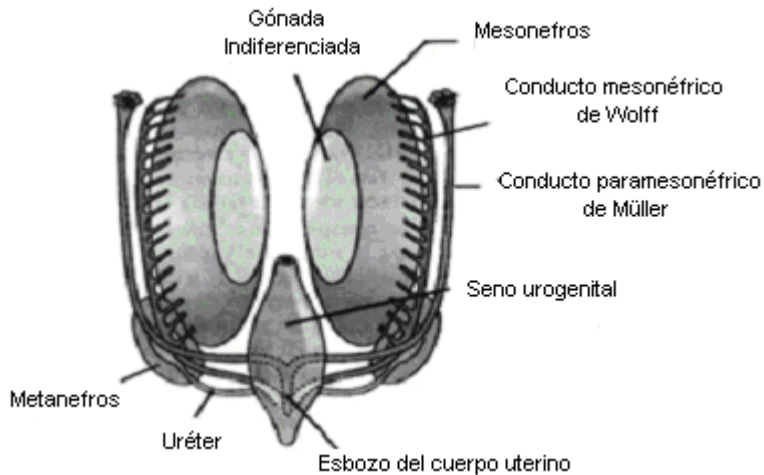


Fig. 3. Conductos de Müller y de Wolf, (Moore , 1999).

1.4 Genes que regulan la diferenciación sexual masculina

El principal factor determinante de la diferenciación testicular, es el denominado *SRY/Sry* en el humano y en otras especies de vertebrados, respectivamente. Este se localiza en la región llamada pseudoautosomal, situada arriba del brazo corto del cromosoma *Y* en los mamíferos. El gen *Sry*, en ratón, se encuentra presente en una sola copia de los individuos masculinos, y está constituido por un dominio central denominado caja HMG. Además, se ha visto que *Sry* requiere de la interacción con otros genes localizados en autosomas para dirigir la diferenciación testicular completa. Se han identificado varios genes en el ratón *Mus musculus* (fig. 4) además del denominado *Tda-1* (Testicular determining autosomal 1), el cual también interactúa con los genes autosomales. (Villalpando, 2001).

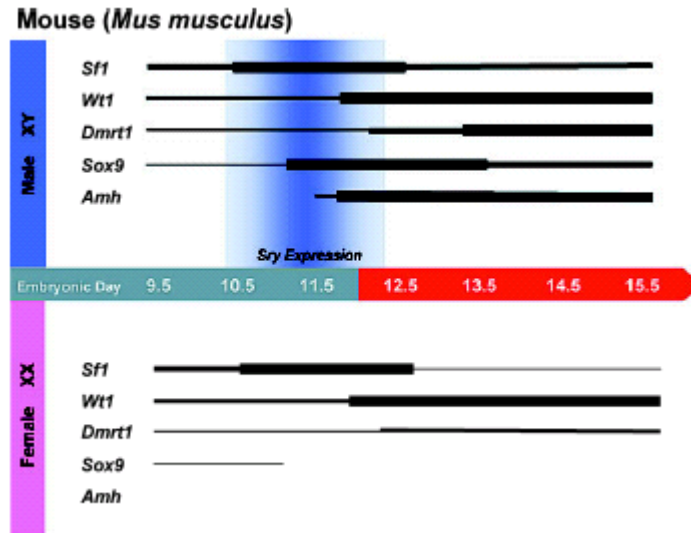


Fig. 4. Diagrama de los perfiles de expresión de los genes críticos para la determinación sexual durante la embriogénesis en ratón *Mus musculus* (Yao y Capel, 2005).

Gen	Sexo	Función
<i>Sry</i>	M	Participa en la diferenciación del testículo
<i>Wt1</i>	M F	Establecimiento de gónadas e hígado. Posible regulador del Sry
<i>Sox9</i>	M	Diferenciación de células de Sertoli y desarrollo del Testículo
<i>MIS</i>	M	Regresión de los conductos de Müller
<i>Dhh</i>	M	Desarrollo de células germinales
<i>Fgf9</i>	M	Proliferación en testículo
<i>DMrt1</i>	M	Mantiene a los tubos seminíferos después del nacimiento
<i>Igf1</i>	M F	Participa en la proliferación, diferenciación y producción de esteroides

Tabla 1. Genes que participan en el desarrollo gonadal. (Tilman y Capel, 2002)

2. CÉLULAS DE LEYDIG

Las células intersticiales de Leydig se desarrollan a partir del mesénquima original de la cresta gonadal, poco después de iniciada la diferenciación de los cordones testiculares, y se encuentran localizadas en ellos (Sadler, 2004). Dos diferentes poblaciones, morfológica y funcionalmente, pueden ser reconocidas en el testículo de roedor a distinta edad: células de Leydig fetales y células de Leydig adultas (Haider, 2004). Las células de Leydig cumplen dos principales funciones: son el sitio de producción de testosterona, y de la interacción parácrina con los túbulos seminíferos adyacentes; e influencia del proceso de espermatogénesis en las células de Sertoli (Norman, 1997).

La producción y secreción de testosterona de estas células está bajo control de la hormona luteinizante (LH) en adultos machos y por gonadotropina corionica en el desarrollo fetal masculino. La LH es una gonadotropina liberada por la glándula hipófisis anterior, se une a su receptor de LH en las células de Leydig y activa la adenilato ciclasa para formar monofosfato de adenosina cíclica (cAMP). La activación de las proteínas cinasas en las células de Leydig por cAMP induce estereasas de colesterol inactivas para que se tornen activas y biotransformen el colesterol libre de las pequeñas gotas lipídicas intracelulares para que se lleve a cabo la síntesis de andrógenos (Gaetner y Hiatt, 2002).

3. INSULINA

La insulina es una hormona anabólica, reguladora del combustible celular, así como de la distribución del flujo de sustratos a través de las células blanco. Esto

es llevado a cabo mediante la actividad de los transportadores de membrana, actividad enzimática intracelular y la expresión de una variedad de genes que codifican ciertas proteínas para el óptimo paso y almacenamiento de sustratos circulantes. Estos cambios celulares ocurren cuando la insulina se une a su receptor. De igual forma esta unión provoca varios cambios intracelulares, que le confieren a la insulina diversas funciones metabólicas, tal como la estimulación de síntesis de ADN, proteínas, glucógeno y lípidos. Por lo que esta proteína es considerada como un potente factor de crecimiento (Avruch,1998). La gónada es un órgano, en el cual la insulina podría ejercer su acción como factor de crecimiento. Estudios realizados en ratón XY mutado en sus receptores de la familia de tirosina cinasa, como el de la insulina, desarrollo ovarios con un completo fenotipo femenino, observando reducción en la expresión del gen *Sry* y del marcador *Sox9*, indican que las rutas de señales de la insulina es requerida para la determinación sexual masculina (Nef y col, 2003).

3.1 Estructura y biosíntesis de la insulina

La insulina es una hormona con características proteicas, compuesta de 51 aminoácidos arreglados en dos cadenas denominadas A y B unidas por dos puentes disulfuro, con un peso molecular de 5.8 kDa. Esta molécula es sintetizada, en los ribosomas del RER, por las células β del páncreas, en respuesta al incremento en los niveles de glucosa, en forma de un precursor, llamado preproinsulina de 109 aminoácidos. Ésta, al perder 23 aminoácidos de la secuencia líder, se convierte a proinsulina, que esta compuesta por 86 aminoácidos, de los cuales los residuos 1 al 32 corresponden a la cadena B y los

del 64 al 86 a la cadena A. Esta última contiene un puente disulfuro interno entre los residuos 71 y 76. Los residuos 33 al 64 en la molécula de proinsulina, los cuales enlazan las cadenas A y B, son los referidos como los conectores del péptido C. Este péptido es separado dentro de las células β del resto de la molécula por una hendidura proteolítica durante el proceso asociado con la maduración de la hormona y se acumulan en gránulos secretorios. Estos son liberados con participación de Ca^{2+} (Pimentel, 1994). De igual forma, diversas moléculas, como AMPc, la proteína cinasa C y acetilcolcolina, pueden actuar como mediadores involucrados en la liberación de la hormona. También existen moléculas, como la somatostatina, que es sintetizada dentro de los islotes y actúa de una manera parácrina como regulador negativo de la secreción de insulina (Zawalich y col,1989).

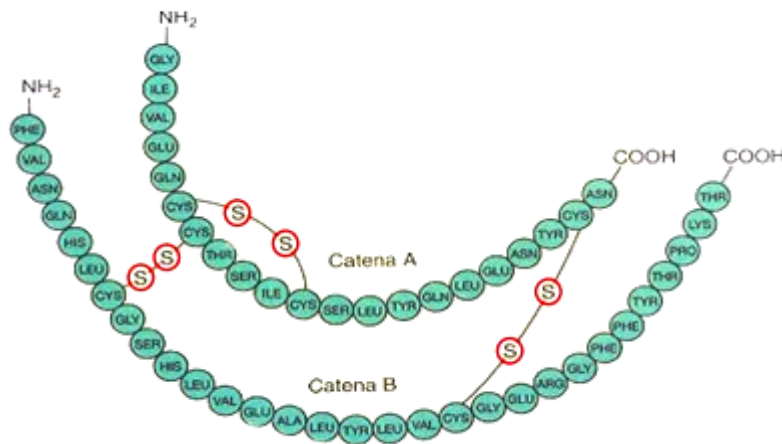


Fig. 5. Estructura de la insulina (Andrew, 1992).

3.2 Organización del gen y ubicación

El gen de la insulina se localiza sobre el brazo corto del cromosoma 11 humano, en la región conocida como 11p14.1. El gen está compuesto de dos exones y dos intrones y se encuentran asociados con elementos cortos de la familia *Alu* (menor a 400 pb) esparcidos en secuencias repetidas de ADN (Pimentel, 1994). El gen consta de tres exones y dos intrones, el exon 1 se localiza en la región 5' no traducible del gen. El segundo exon contiene la secuencia codificadora de la señal peptídica, la cadena B y parte del péptido C. Mientras que el exon 3 codifica el resto del péptido C, la cadena A, y la secuencia 3' no traducible. El intrón 1 es siempre más corto que el 2, y el intrón 1 se localiza en la región 5' no traducible, mientras que el intrón 2 interrumpe el gen entre los primeros y segundos nucleótidos del codón para el aminoácido 7 del péptido C (Ashcroft y col, 1992).

En otras especies como ratón, rata, y tres especies de peces, existen dos genes estructurales que codifican para insulina. Los genes *I* y *II* están localizados en el cromosoma 1 (Todd y col, 1985). El gen *I* de preproinsulina contiene un solo intron (Soares y col, 1985).

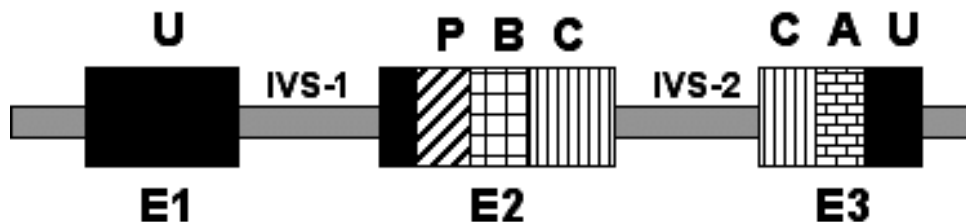


Fig. 6. estructura del gen, humano, de la insulina (modificado de Clark y Docherty, 1992).

3.3 El receptor de insulina

El receptor de insulina se clasifica dentro de aquellos receptores con actividad de tirosina cinasas debido a que fosforilan residuos de serina y tirosina en las proteínas. Se expresa en la superficie de la membrana celular. Es una proteína heterotetramera de 350 kDa, y está compuesta por dos subunidades α de 135 kDa y dos subunidades β de 95 kDa, unidos por grupos sulfhídricos. La subunidad α , de 719 ó 731 aminoácidos, que se encuentra en la parte externa de la membrana, comprende la porción amino terminal del precursor y contiene el dominio de unión a la insulina. La subunidad β , de 620 aminoácidos, corresponde a la porción del carboxilo terminal del precursor, incluyendo un dominio extracelular de 194 aminoácidos, un dominio transmembranal de 23 aminoácidos, y un dominio citoplasmático de 403 aminoácidos con los elementos estructurales requeridos para la actividad cinasa (Pimentel, 1994).

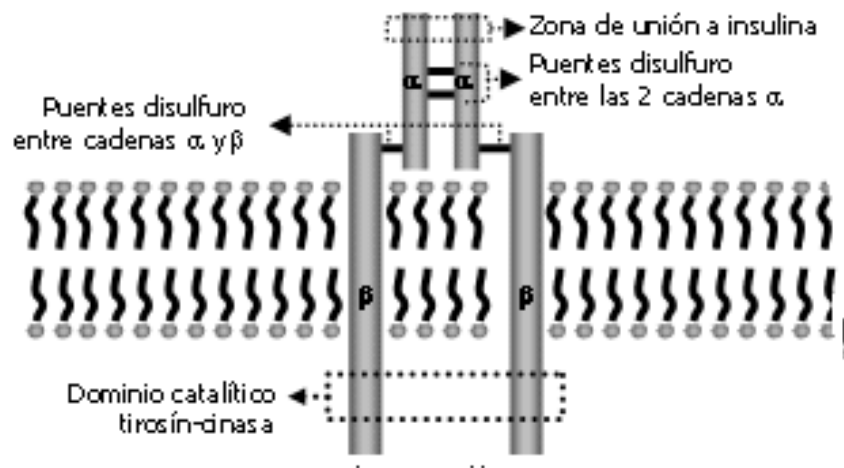


Fig. 7. Estructura del receptor de insulina (Tomado de Ulrich, 1985).

3.4 Formación y fosforilación del complejo insulina-receptor

El primer evento específico de la formación del complejo es la unión de la insulina a las cadenas α del receptor. La interacción de la insulina provoca un cambio conformacional en las cadenas α y la autofosforilación de las cadenas β (Cruz y col, 2001). Las tirosinas en la posición 1158, 1162 y 1163 son esenciales como mediadores de la actividad cinasa, las tirosinas 960 como sitio de regulación y la tirosina 972 para el anclaje y fosforilación del sustrato del receptor de insulina (IRS). Asimismo, dentro de esa región del receptor se encuentran las tirosinas 1328 y 1334 que sirven para activar a otras proteínas involucradas en la proliferación celular. Las tirosinas 1146, 1150 y 1151 participan en la internalización dependiente del ligando receptor (Cruz y col, 2001). También existen otros sitios de fosforilación, que son serina y treonina. Se ha observado fosforilación sobre *Thr-1348* en células de simio, así como *Ser-1305* y *Ser 1306* en esta misma línea celular (Tavaré y col, 1988).

3.4.1 Sustrato del receptor de la insulina

Después de la autofosforilación del receptor, se inicia la activación de las tirosinas de los IRSs. Se han identificado 11 sustratos intracelulares de IR con actividad cinasa. Seis de estos pertenecen a la familia de las proteínas IRS, denominados IRS1-6, siendo el IRS1 e IRS2 ampliamente distribuidos, mientras que el IRS3 esta limitado a adipositos y cerebro, y el IRS4 se expresa principalmente en tejido o líneas celulares embrionarias. Las proteínas IRS tienen un dominio homólogo a pleckstrina y un dominio de fosfotirosina cerca del amino terminal que le confiere

alta afinidad por el IR. El carboxilo central y terminal del IRS contienen mas de 20 sitios potenciales de fosforilación que, después de la fosforilación por el IR, se unen a moléculas intracelulares que contienen dominios SH2. Estudios han demostrado que las proteínas SH2 que se unen a los IRS son moléculas adaptadoras, como la subunidad reguladora de PI3K, o la molécula adaptadora Grb2, la cual se asocia con la actividad de la vía Ras-MAPK. Otro tipo de proteínas que se unen al IRS son enzimas, como la tirosina fosfatasa con dominio SH2 (SHP2), y tirosinas cinasas citoplasmáticas como Fyn. También existen algunas proteínas que se unen al IRS que no contienen dominio SH2, como la calcio ATPasa SERCA1 y 2. Interesantemente, SHP2, el cual se une al IRS sobre dos residuos de fosfotirosina en el carboxilo terminal, desfosforila la otra fosfotirosina que media la unión de PI3K y Grb2. IRS también sufre fosforilación sobre sitios de serina en respuesta a insulina. Hay alrededor de 70 sitios potenciales de fosforilación en IRS, y en general, estas fosforilaciones de serina confieren regulación negativa en las señales del IRS, aunque este mecanismo aún no esta claro. Todas estas fosforilaciones sobre las proteínas IRS están ligadas a la activación de dos vías principales de señalización: la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI-3K/AKT/proteína cinasa B), la cual es responsable de muchas de las acciones metabólicas como la participan en la regulación de triglicéridos, en mitosis, en los procesos de diferenciación, síntesis y degradación de carbohidratos, lípidos y proteínas, organización del citoesqueleto, señalización membranal y el transporte de glucosa mediada por insulina; y la vía Ras-MAPK, la cual regula la expresión de ciertos genes y coopera con la vía PI-3K en el control de crecimiento y diferenciación celular (Taniguchi y col, 2006).

3.5 Mecanismo transduccionales de la acción de la insulina.

3.5.1 Sistema adenilatociclasa

La precisa participación de la adenilato ciclasa en el mecanismo de acción de la insulina es poco entendido. Ambas rutas de AMPc-dependiente y AMPc-no dependiente están involucradas en el mecanismo de acción de la insulina como blanco de células de tejido adiposo. En estas células, la lipólisis es promovida por agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc y son antagonizada por agentes que decremantan la síntesis y/o incrementan la degradación de AMPc. La insulina es un potente inhibidor de la lipólisis, y esta acción puede ser mediada por la serina proteína cinasa que cataliza la fosforilación y activación de la AMPc fosfodiesterasa (Gabbay y Lardig, 1987).

3.6 Mecanismos postransduccionales de la acción de la insulina

La acción metabólica de la insulina no depende únicamente del transporte de glucosa hacia el interior de la célula, pero un importante blanco de la actividad tirosina cinasa del receptor es el transporte de glucosa. Dos tipos de transportadores de se han identificado, la familia de GLUT y los transportadores de Na⁺ dependientes de glucosa. Se reconocen 12 subtipos de transportadores de la familia GLUT. Estos a su vez se dividen en tres subfamilias, nombradas clase I (GLUT 1-4), clase II (GLUT 5, 7, 9, 11), y clase III (GLUT 6, 8, 10, 12). GLUT-1 se expresa en muchas células, particularmente en eritrocitos; GLUT-2 es predominantemente expresado en hígado y páncreas; GLUT-3 en células neuronales; GLUT-4 en músculo, corazón y tejido adiposo; GLUT-5 en intestino y pulmón; GLUT-6 predominantemente en cerebro y leucocitos periféricos; GLUT-8

en testículos adultos; GLUT-9 en hígado y pulmón; GLUT-10 en hígado y páncreas; GLUT-11 en corazón y músculo esquelético (Chen y Nagpal, 2003). También se ha detectado GLUT-3 en placenta; GLUT-2 y GLUT-3 en testículo de ratón y rata (Kokk y col, 2004). En ausencia de insulina, alrededor del 90% de los transportadores GLUT se encuentran secuestrados intracelularmente en vesículas que son llevadas hacia la membrana plasmática por la activación previa del complejo proteico PI 3-cinasa, las proteínas PKB/Akt, la PKC y la cinasa JNK. Así la glucosa podrá ser introducida al interior de la célula, donde será metabolizada y empleada en diversos procesos celulares (Cruz y col, 2001).

3.6.1 Efectos de la insulina sobre proliferación y diferenciación celular

La acción de la insulina es fuertemente asociada con la iniciación de la síntesis de ADN en diferentes tipos de células y tejidos. La presencia de insulina es requerida para un óptimo crecimiento y desarrollo de algunos tejidos *in vivo*, especialmente tejidos fetales, como gónada. Estudios hechos en testículo embrionario de pollo se observó este efecto. También estudios han revelado que la insulina tiene cierto efecto sobre la síntesis de la hormona sexual testosterona, aunque el mecanismo por el cual esto se lleva a cabo, aún no se conoce (Bobes y col, 2001).

4. ESTEROIDES

4.1 Biosíntesis

Los principales tejidos encargados de la síntesis de esteroides son la corteza adrenal, ovarios y testículos. También durante la preñez, la placenta puede servir como un reservorio de estrógenos y otras hormonas. Seis enzimas P450 (tabla 2) son asociadas con la producción de hormonas esteroideas, que a su vez depende de una estimulación específica por parte de la célula de origen (Norman, 1997).

4.2 Andrógenos

Los andrógenos son todos aquellos esteroides que induce la diferenciación y maduración del órgano reproductor masculino, el desarrollo de las características sexuales secundarias y en las manifestaciones conductuales en el papel masculino de la reproducción. Son producidos por machos en los testículos, y por hembras en los ovarios y placenta. Presentan el mismo anillo de esterano, al igual que los demás esteroides, pero se caracterizan por la presencia de 19 carbonos en su estructura y por la ausencia de una cadena de dos carbonos sobre el carbono 17 y la presencia de un oxígeno funcional sobre el carbono 3 y 17. Se conocen dos rutas metabólicas generales para la síntesis de andrógenos, que van desde la pregnenolona hasta la testosterona, las vías Δ^5 y Δ^4 . Esteroides intermediarios de la vía- Δ^5 pueden ser convertidos al correspondiente esteroide de la vía- Δ^4 por oxidación del 3β -hidroxil a cetona por la 3β -esteroide dehidrogenasa, seguido por la migración de un doble enlace del C_{5-6} al C_{4-5} por la

Δ^5 , Δ^4 –isomerasa (Norman, 1997). El colesterol es el sustrato de la síntesis de todas las hormonas esteroideas, este es transportado de los depósitos celulares al interior de la membrana mitocondrial por una proteína cinasa A. Se sabe de dos proteínas transportadoras envueltas en el transporte del colesterol hacia la membrana mitocondrial: la proteína reguladora aguda esteroideogénica (StAR) y el receptor periférico tipo benzodiazepina (PBR). Existe una dinámica de interacción proteína-proteína entre estas dos proteínas y la proteína cinasa A para el adecuado transporte del colesterol, sin embargo el mecanismo por el cual se lleva a cabo aun no se sabe (Haider, 2004).

4.3 Testosterona

Los dos andrógenos más importantes son la testosterona y la 5α dihidrotestosterona, por lo que su biosíntesis sigue las dos rutas anteriormente mencionadas. En roedores la vía Δ^4 es la que predomina. Esta hormona es necesaria para el funcionamiento normal de las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales, así como para la aparición y conservación de las características sexuales secundarias masculinas. La molécula es metabolizada en el hígado en dos compuestos 17-ceto, androtestosterona y eticolanolona, los cuales son conjugadas a su respectivo ácido glucorónico o sulfato, que son solubles en agua y excretados en orina (Norman, 1997).

La forma hormonalmente activa de la testosterona en machos es la 5α -dihidrotestosterona (5α -DTH). Existen evidencias de la producción de 5α -DTH por

testículos, piel y glándulas submaxiliares, pero es formada especialmente en blancos glandulares como la próstata. La enzima responsable para la conversión de testosterona a dihidrotestosterona es un ana Δ^3 -cetosteroide-5 α -oxidoreductasa que requiere NADPH como cofactor (Norman, 1997).

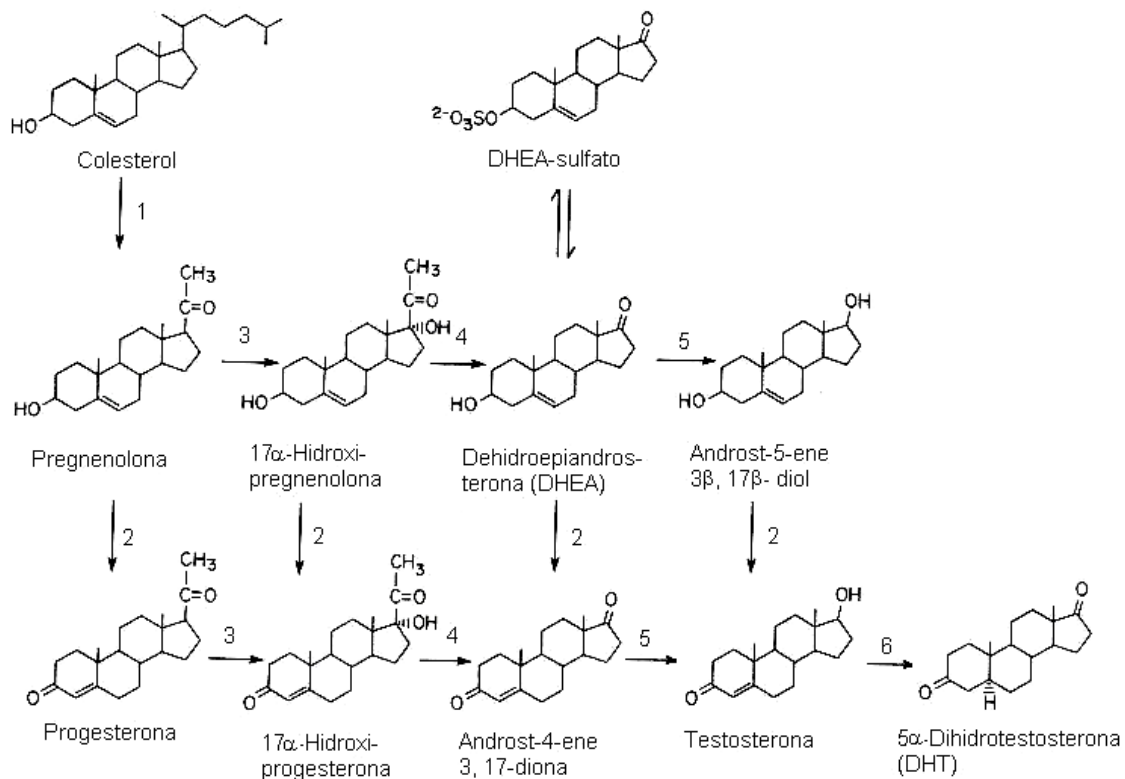


Fig. 8. Ruta de biosíntesis de testosterona (Norman A, 1997).

Reacción	Nombre de la enzima	Localización subcelular
1	Desmolasa	Mitocondria
2	3 β - Esteroides deshidrogenasa/ Δ^5 , Δ^4 -isomerasa	Retículo Endoplásmico
3	17 α -Hidroxilasa	Retículo Endoplásmico
4	C-17 – C-20 Liasa	Retículo Endoplásmico
5	17-cetoesteroide reductasa	Retículo Endoplásmico
6	5 α -Reductasa	Membrana Nuclear

Tabla 2. Enzimas participantes en la biosíntesis de la testosterona (Norman A, 1997).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

La insulina es una proteína que regula la homeostasis del organismo de los mamíferos a través de diversas funciones metabólicas. Además, la insulina participa en la proliferación de distintos tipos de células como fibroblastos en cultivo (Mukherjee y col, 1999) y en testículo embrionario de pollo (Bobes y col, 2001). Sin embargo, la función de esta proteína no se ha determinado en las células de Leydig, encargadas de la producción de hormonas sexuales, en la fase embrionaria, durante la etapa que ocurre la diferenciación testicular y a lo largo del desarrollo embrionario del testículo. Asimismo, el efecto de la insulina sobre la síntesis de testosterona s ha sido estudiado en el humano (Kristiansen y col, 1997), rata (Lin y col, 1986) y pollo (Bobes y col, 2001), pero en el testículo del ratón en la etapa embrionaria no se ha descrito hasta el momento.

Hipótesis

1. La administración de insulina endógena induciría la proliferación de las células de Leydig del ratón *Mus musculus* en la etapa prenatal.
2. De igual forma esta proteína regularía, positiva o negativamente la producción de testosterona del testículo embrionario del ratón *Mus musculus*.

IV. OBJETIVOS

1. Evaluar el efecto de la insulina en las células de Leydig durante el desarrollo testicular, a los 14 d. g. (etapa de crecimiento), 16 d. g. (etapa fetal) y 18 d. g. (etapa perinatal) del ratón *Mus musculus*, cepa CD 1.
2. Determinar si la insulina regula positiva o negativamente la producción de testosterona durante el desarrollo testicular del ratón, en la misma cepa, en las etapas antes mencionadas.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

a) Material biológico

Se utilizaron ratones hembras adultas gestantes de la cepa CD1, las cuales se mantuvieron a una temperatura de 18°C, con ciclo de luz/oscuridad de 12/12 y 47% de humedad relativa en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Los animales mantuvieron una dieta con alimento estéril Harlan Tekland México LM-485 y con agua estéril acidificada.

b) Aislamiento del tejido

Los ratones hembras gestantes fueron sacrificadas por dislocación cervical a los 14, 16 y 18 d.g., inmediatamente después se realizó una incisión abdominal en forma de “V” para la extracción de los embriones, los cuales se transfirieron a una caja de Petri estéril aplicándoseles eutanasia mediante decapitación. Posteriormente se separaron los embriones machos y se les extrajeron los testículos para su posterior empleo.

c) Purificación de las células de Leydig

Se aislaron un promedio de 30-40 gónadas de cada edad experimental (14, 16 y 18 dg). Se colocaron en tubos Eppendorf y se lavó el tejido 2 veces con PBS (Apéndice 1) a temperatura ambiente. Se preparó a 4°C una mezcla de 965 µL de PBS, 10 µL de Colagenasa (0.2 mg/ml) y 20 µL de DNAasa (0.01 mg/ml). Se incubó durante 3 min. el tejido a 37°C más 3 min. de disgregación manual. Después de este tiempo se agregó 110 µL de Inhibidor de Tripsina al 0.2 %. Se mezcló para homogeneizar y detener completamente la reacción y se agregó 390 µL de PBS filtrado. Se centrifugó a 3000 rpm. por 15 min. Se decantó el

sobrenadante. Se lavó con 500 µL de PBS y se centrifugó a 3000 rpm. por 2 min, dos veces. Se resuspendieron las células en 1 mL de PBS filtrado. Se dejó reposar 12 min en una gradilla a temperatura ambiente. Los túbulos que contienen células de Sertoli se precipitan al fondo y las células de Leydig se mantienen en la superficie, en el sobrenadante. Este se separó con una pipeta silicónizada y se centrifugó lo recuperado a 3000 rpm. por 5 min. para la obtención de las células. El sobrenadante se decantó, y el botón, que contiene las células de Leydig se resuspendió en 500 µL de medio de cultivo suplementado.

d) Conteo de células

Después de la purificación de la línea celular se realizó el conteo de las células viables para su cultivo, este se realizó empleando una cámara de Neubauer. Para lo cual se preparo una solución 1:1 de la suspensión celular y colorante azul de Evans al 0.2% (v/v). Se tomaron 10 µL de la suspensión celular y 10 µL del colorante y se mezclaron perfectamente, después se adicionó un volumen de 10 µL de esta mezcla a la cámara. Se contaron las células contenidas en los cuatro cuadrantes externos de la cámara, observándolas en un microscopio óptico modelo Galen Tm III. Se calculó el total de células contenidas por mililitro, con la siguiente ecuación:

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

e) Cultivo celular

Conociendo el número de células que hay en un mililitro, se realizó el cálculo para obtener un volumen en el cual se tuviera una cantidad de 35, 000 células que fueron sembradas en cada pozo, para lo cual se emplearon cajas de plástico de 96 pozos (Nuclon). Se realizaron dos grupos por experimento, el control y el experimental. El primero correspondió a las células de Leydig sembradas en Medio Esencial Dulbeco Modificado (D'MEM, Apéndice 2) mas el marcador (BrdU) Bromodeoxy uridina (Roche) en concentración de 1mg/mL dilución 1:1000 en este medio. El segundo grupo correspondió a las células de Leydig sembradas en medio D'MEM suplementado mas BrdU (1mg/mL) e insulina porcina (Sigma) en concentración de 100 mg/mL. El cultivo celular se dejó 24 h a 37 °C con 5% de CO₂.

f) Fijación de las células

Después de 24 horas se retiró el medio de cultivo de cada pozo y se guardo para su posterior uso. Se agregó una gota de PBS a cada pozo para eliminar el exceso de medio. Se retiró la gota sacudiendo firmemente. Se agregó 200 µL del fijador, glutaraldehído al 0.3% (Apéndice 3) a cada pozo por 10 min. con agitación leve. Transcurrido el tiempo se retiró el glutaraldehído y se secó cada pozo sacudiendo firmemente.

g) Inmunodetección

Se lavó cada pozo con 200 µL de PBS a temperatura ambiente por 5 min, dos veces. Se retiró el PBS y se incubó con Solución bloqueadora de albúmina al 5% (Apéndice 4) durante 1 hora. Después de este tiempo se realizaron tres lavados con 200 µL de PBS caliente (<80°C) 10 min. cada uno. Posteriormente se incubó

con anticuerpo primario, 50 μ L de anti-BrdU (elaborado en ratón, Roche) en dilución 1:10 en buffer de incubación por 1 hora a TA. Se lavó 3 veces con PBS a TA por 5 min. Se incubó con anticuerpo secundario, 50 μ L de anti-mouse FITC (elaborado en cabra de Zymed), en dilución 1:10 en PBS, en oscuridad por 1 hora a TA. Finalmente se lavó con PBS a TA 3 veces. Se secaron los pozos sacudiendo firmemente. Las cajas fueron cubiertas con papel aluminio y se mantuvieron a -20°C para su protección.

h) Fotografías

Las células marcadas fueron observadas y fotografiadas en un microcopio invertido de epifluorescencia modelo Zeiss. Posteriormente sobre las fotografías se realizó el conteo de las células, tanto en controles como experimentales.

i) Extracción de esteroides

Se empleo el medio recuperado del cultivo celular de cada fecha, tanto controles como experimentales. Se tomo 1mL de este medio y se le agrego 9 mL de éter etílico (1:10) en tubos de ensayo. Se agitaron en vórtex por tres minutos. Posteriormente las fase acuosa se congela a -60°C , colocando los tubos en hielo seco con alcohol absoluto, mientras que la fase etérea fue decantada en tubos y evaporada en baño maría a 40°C . Posteriormente se lavaron los tubos con 200 μ L de éter resbalándolos por las paredes del tubo, tres veces para bajar y concentrar los esteroides, evaporando este a baño maría. Se lavo nuevamente con 100 μ L de éter resbalándolos por las paredes, dos veces, y evaporando a baño maría. Finalmente, los tubos que contenían los esteroides concentrados tanto de

controles como de experimentales fueron lavados con 100 μL de medio de cultivo que se emplearon para el ensayo de RIA

j) Radioinmunoanálisis (RIA)

En tubos, debidamente etiquetados, se añadieron 50 μL de testosterona, en concentraciones de 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 y 20.0 ng/mL para la curva estándar; y 50 μL de las muestras control y experimental a sus respectivos tubos. Los tubos para unión inespecífica se le adiciono 150 μL del estándar de testosterona de 0 ng/mL. Se agregó 500 μL de testosterona marcada con I^{125} a cada tubo. Posteriormente se añadió 100 μL de anticuerpo anti-testosterona a cada tubo, excepto al de unión inespecífica. Los tubos se agitaron en vórtex y se incubaron en un baño a 37°C durante 70 minutos. Terminando el tiempo de incubación se añadió 1 mL de reactivo para precipitar, anti-gamaglobulina, a todos los tubos. Se agitó en vórtex y se incubó por 15 min. a TA. Se centrifugaron los tubos durante 20 min. a 3000 rpm. Se decanto todos los tubos y se secaron con papel absorbente para eliminar toda gota que pudiera estar adherida. Los tubos se colocaron en un contador gamma OAKFIELD SD12 por un minuto. Los reactivos que se emplearon pertenecen al Kit Testosterone RIA DSL-4100 (Medidores médicos e industriales).

k) Análisis estadístico

Los resultados experimentales fueron analizados estadísticamente utilizando la prueba t – student con un nivel de significancia del 95.0%, ($p < 0.05$) para los ensayos de proliferación celular, y del 90.0%, ($p < 0.1$) para el efecto sobre la síntesis de testosterona, en las edades de 14 y 18 d.g.

VI. RESULTADOS

1. Ensayos de proliferación

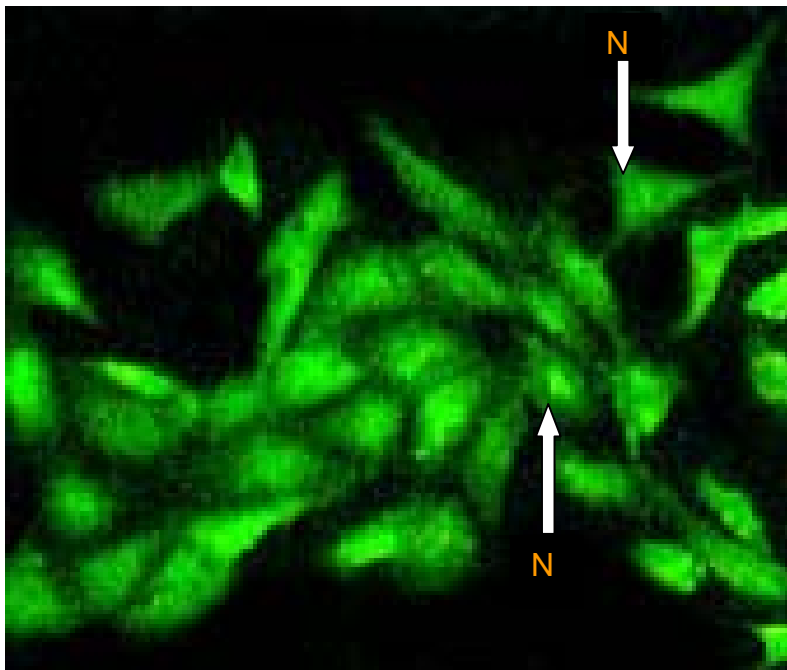


Fig.9. Detección inmunocitoquímica de las células en división. La flecha indica el núcleo (N) marcado con BrdU en las células de Leydig. 20X.

a) Etapa de crecimiento

La figura 10 muestra los resultados obtenidos a los 14 d.g. A esta edad se observó el efecto de la insulina sobre la proliferación de las células de Leydig. El porcentaje de proliferación fue mayor en el grupo tratado con insulina con respecto al grupo control. Se encontró que hay 47% de proliferación de las células de Leydig en el grupo control, mientras que en el grupo experimental el porcentaje fue de 53%. Las diferencias observadas fueron significativas con la prueba *t* de student a $p < 0.05$.

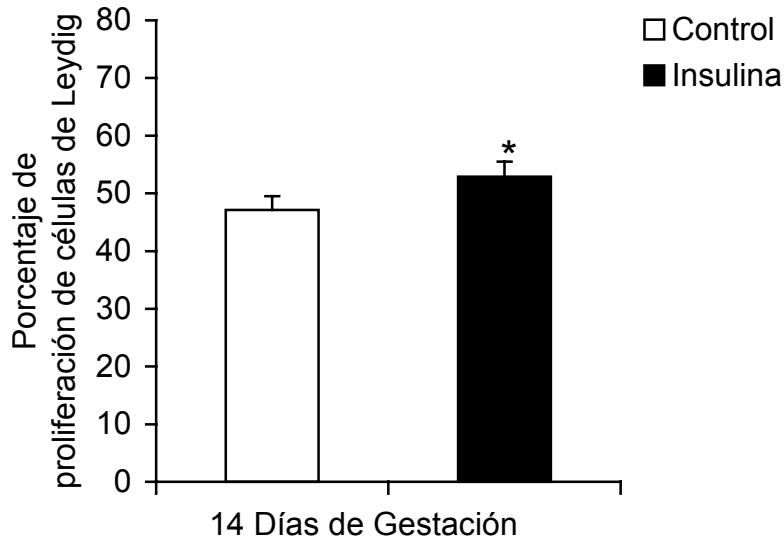


Fig. 10. Efecto de la insulina sobre la proliferación en células de Leydig a los 14 d.g. Las barras muestran la media (n=16) y el error estándar para controles y experimentales. * *t*-student $p < 0.05$.

b) Etapa fetal

La figura 11 muestra los resultados obtenidos a los 16 d.g. Etapa en la que se puede observar el efecto que la insulina tuvo sobre la proliferación de las células de Leydig, ya que el porcentaje de proliferación fue mayor en el grupo tratado con insulina con respecto al grupo control. Se encontró que se produjo un 41% de proliferación para el caso del control, mientras que en el grupo experimental fué de 58%. Las diferencias observadas entre el grupo control y el experimenta fueron significativas con la prueba *t* de student a $p < 0.05$.

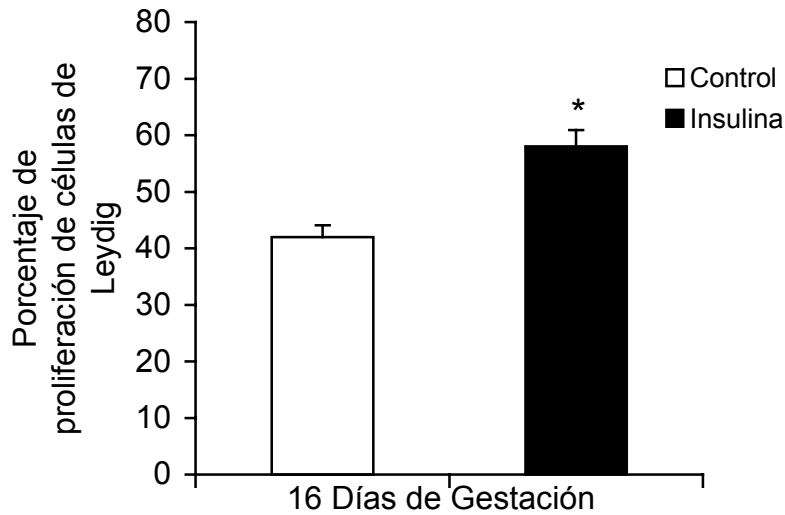


Fig.11. Efecto de la insulina sobre la proliferación en células de Leydig a los 16 d.g. Las barras muestran la media (n=20) y el error estándar para controles y experimentales. * *t*-student $p < 0.05$.

c) Etapa perinatal

La figura 12 muestra los resultados obtenidos a los 18 d.g., donde se pudo observar el efecto de la insulina sobre la proliferación de las células de Leydig. En este caso también el porcentaje de proliferación detectado es mayor en el grupo tratado con insulina que en el control. Se encontró que el porcentaje de proliferación en el grupo control fue de 37%, mientras que en el grupo experimental fue de 63%. Las diferencias observadas entre el grupo control y el experimental fueron significativas con la prueba *t* de student a $p < 0.05$.

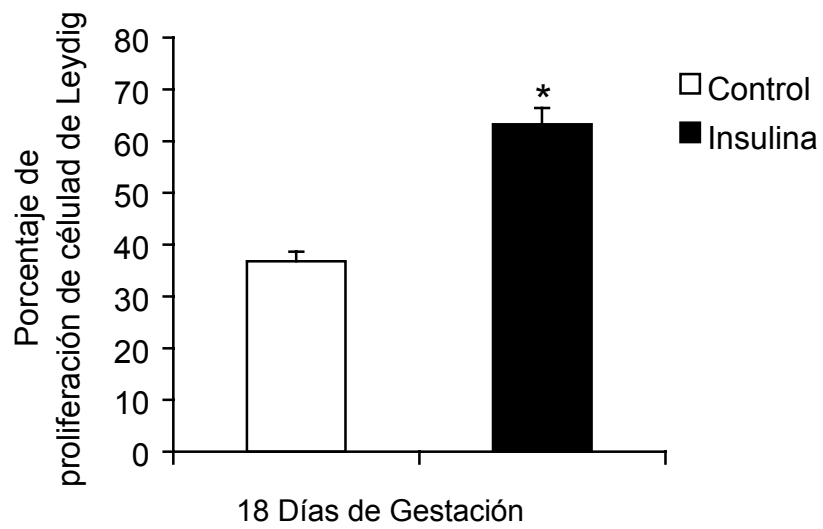


Fig.12. Efecto de la insulina sobre la proliferación en células de Leydig a los 18 d.g. Las barras muestran la media (n=20) y el error estándar para controles y experimentales. * *t*-student $p < 0.05$.

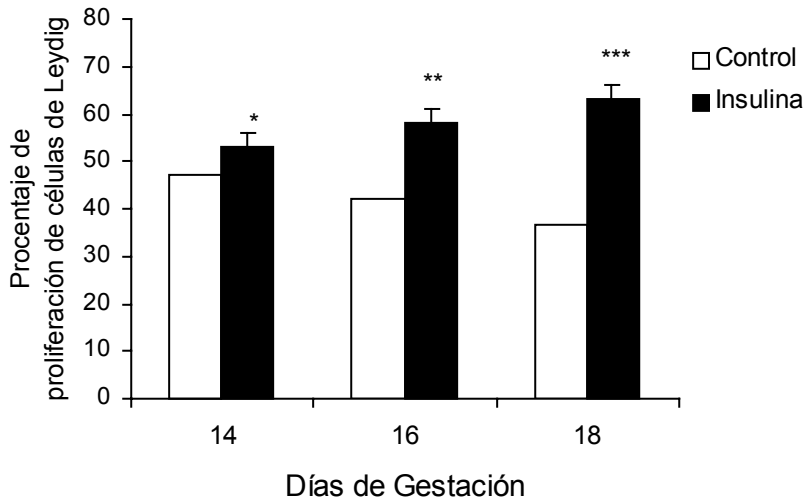


Fig. 13. Efecto de la insulina sobre la proliferación de las células de Leydig durante todas las etapas estudiadas. Las barras muestran las medias y el error estándar. * Experimental vs control 14 d.g. *t*-student $p < 0.05$. ** Experimental vs control 16 d.g. *t*-student $p < 0.05$.
 *** Experimental vs control 18 d.g. *t*-student $p < 0.05$.

2. Síntesis de testosterona

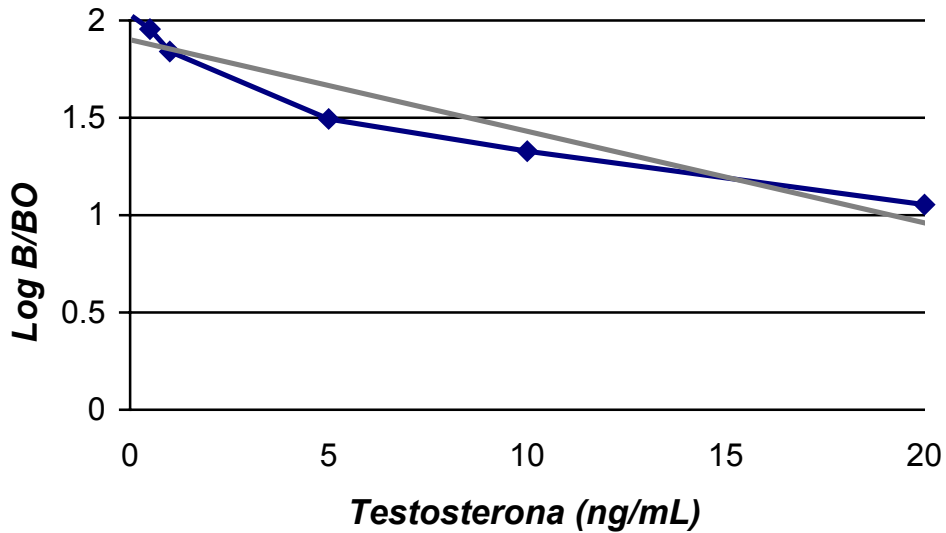


Fig. 14. Gráfico estándar de testosterona.

Ecuación de la recta empleada para la cuantificación de testosterona mediante RIA.

$$y = -0.047x + 1.9013$$

$$R^2 = 0.9062$$

a) Etapa de crecimiento

La figura 15 muestra los resultados obtenidos de la regulación de la insulina sobre la esteroidogénesis a los 14 d.g., en la cual se observó regulación negativa, ya que la cantidad de testosterona producida en el grupo tratado con insulina fue menor a la producida por el grupo control. Se obtuvo una concentración de 13 ng/mL para en el grupo experimental y 16 ng/mL para el control. Las diferencias encontradas entre el grupo control y el experimental fueron significativas con la prueba *t* de student a $p < 0.10$.

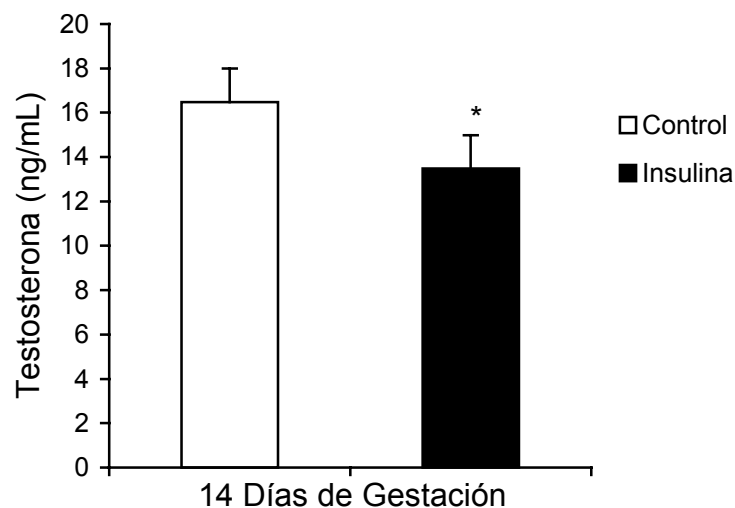


Fig. 15. Efecto de la insulina sobre la síntesis de testosterona a los 14 dg. Las barras muestran la media (n=3) y el error estándar para controles y experimentales. * *t*-student $p < 0.10$.

b) Etapa fetal

La figura 16 muestra los resultados obtenidos de la regulación de la insulina sobre la esteroidogénesis a los 16 d.g., en la cual se observa una regulación positiva, ya que la cantidad de testosterona producida en el grupo tratado con insulina fue mucho mayor a la producida por el control. Se obtuvo una concentración de 32 ng/mL para en el grupo experimental y 22 ng/mL para el control. Las diferencias encontradas entre el grupo control y el experimental fueron significativas con la prueba *t* de student a $p < 0.05$.

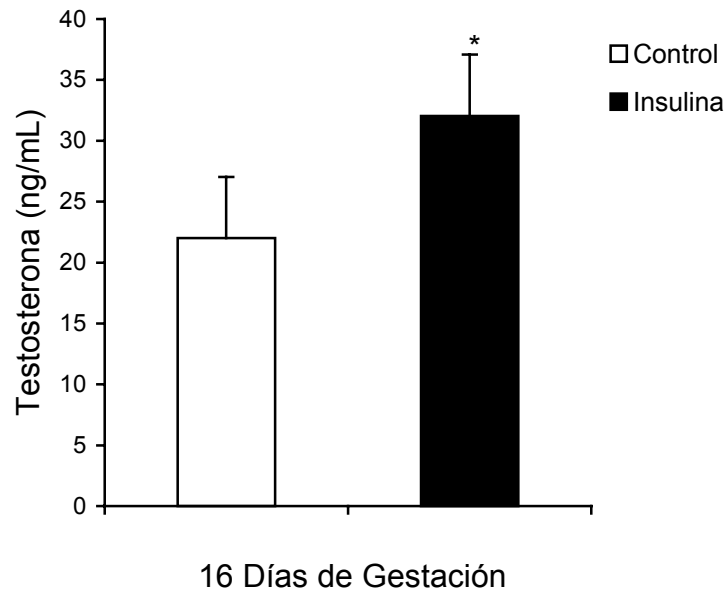


Fig. 16. Efecto de la insulina sobre la síntesis de testosterona a los 16 dg. Las barras muestran la media (n=3) y el error estándar para controles y experimentales. * t-students $p < 0.05$.

c) Etapa perinatal

La figura 17 muestra los resultados obtenidos de la regulación de la insulina sobre la esteroidogénesis a los 18 d.g., en la cual se observa una regulación negativa, ya que la cantidad de testosterona producida en el grupo tratado con insulina es menor a la producida por el grupo control. Se obtuvo una concentración de 15 ng/mL para en el grupo experimental y 26 ng/mL para el control. Las diferencias encontradas entre el grupo control y el experimental fueron significativas con la prueba *t* de student a $p < 0.10$.

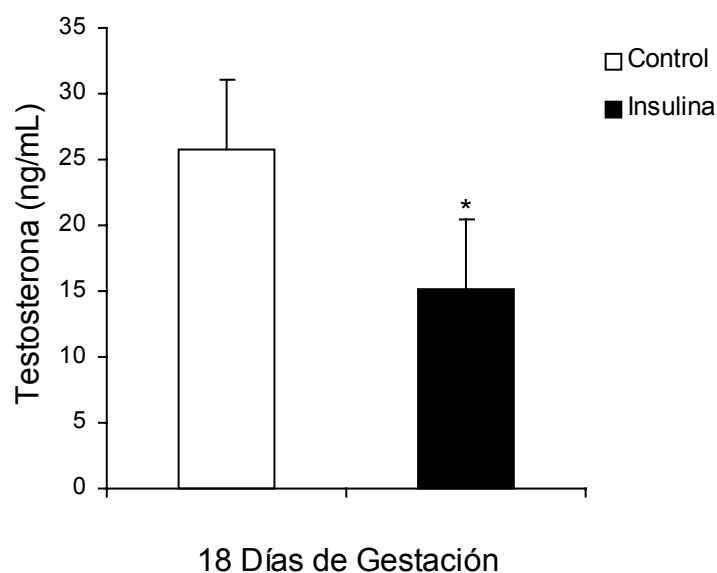


Fig.17. Efecto de la insulina sobre la síntesis de testosterona a los 18 dg. Las barras muestran la media (n=3) y el error estándar para controles y experimentales. * *t*-students $p < 0.10$.

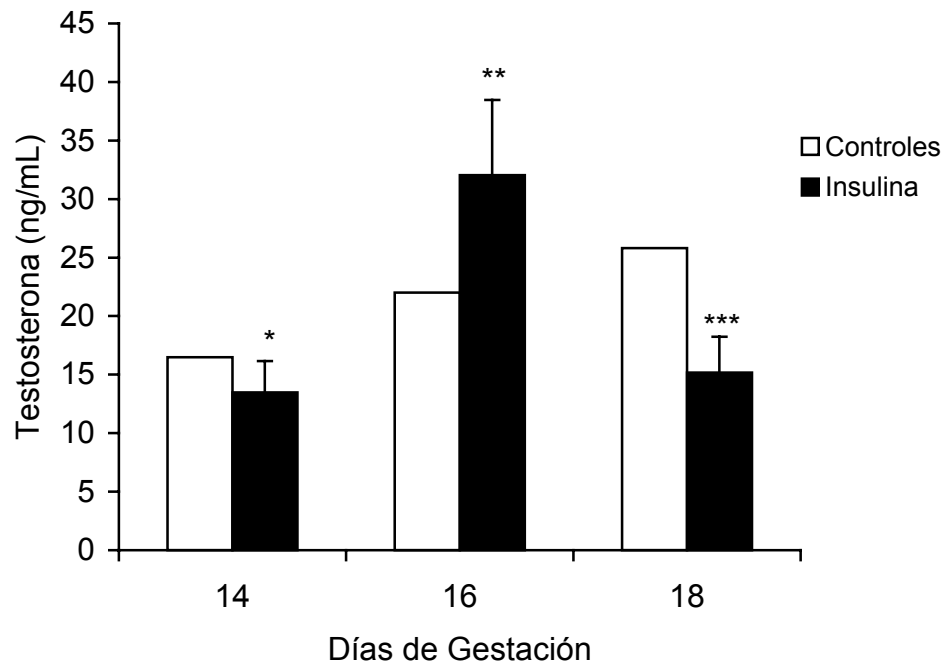


Fig. 18. Efecto de la insulina en la síntesis de testosterona a lo largo de todas las etapas estudiadas.

Las barras muestran medias y el error estándar. * Experimental vs control 14 d.g. *t*-student

$p < 0.10$. ** Experimental vs control 16 d.g. *t*-student $p < 0.05$.

*** Experimental vs control 18 d.g. *t*-student $p < 0.01$.

VII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudio el efecto de la insulina sobre la proliferación de las células de Leydig en cultivo, así como su participación en la esteroidogénesis en el testículo del ratón *Mus musculus* en la etapa prenatal.

Se sabe que la insulina es la hormona reguladora de la concentración de glucosa, pero esta no es su única función (Cruz y col, 2001). Estudios anteriores demostraron que esta hormona tiene funciones de regulación del ciclo celular en distintos tipos de células *in vitro* como fibroblastos en cultivo celular (Mukherjee y col, 199), hepatocitos de rata adulta (Kimura y Ogihara, 1997), células intersticiales del ovario humano adulto (Duleba A y col, 1998) y testículo embrionario de pollo (Bobes y col, 2001). Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan las investigaciones anteriores, debido a que las células de Leydig del testículo embrionario de ratón aumentaron su proliferación en presencia de insulina, lo cual fue detectado por la incorporación del marcador Bromodeoxiuridina (BrdU) en el núcleo de las células. Los resultados muestran mayor número de células marcadas en los grupos experimentales que en los controles a lo largo de todas las edades estudiadas (14, 16 y 18 d.g.). Se ha descrito que el receptor de la insulina media la mayoría de las funciones de esta hormona, a través de la actividad tirosina cinasa, lo cual es desencadenada por la unión con la proteína que lleva a cabo una serie de fosforilaciones sobre distintos sitios denominados sustratos de receptor de insulina (IRSs), de los cuales se conocen alrededor de 11. El IRS-1 e IRS-2 son los que se encuentran

principalmente presentes en la mayoría de las células y que desencadena diversas cascadas de señalización intracelulares como la vía de fosfoinositol-3 cinasa y la vía MAPK (Taniguchi y col, 2006). Estas vías activan diversos procesos metabólicos como el transporte de glucosa y la división celular. Para la activación de la vía de las proteínas cinasas con actividad mitogénica (MAPK) es necesario la fosforilación de una pequeña proteína adaptadora denominada Shc, la cual forma un complejo con el IRS que dispara la actividad de la proteína Ras para la siguiente activación de las cascadas de MAPK, vía encargada de la proliferación celular (Metzler, 2001). Al ser una vía altamente conservada, es probable que también se encuentre presente en las células de Leydig. Además, por trabajos realizados recientemente donde se inhibió a las proteínas cinasas MEK 1 y 2, empleando 1,4-diamino-2,3-diacino-1,4-bis[2-aminofeniltio]butadieno y el factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF1) como inductor de la proliferación, se observó que la proliferación de las células de Leydig disminuyó a causa del inhibidor (Villalpando y col, 2006. Datos sin publicar). El receptor IGF1 es miembro de la familia de receptores con actividad cinasa, al igual que el de la insulina, por lo que también, a la unión con la proteína, desencadena aquellas vías de señalización intracelulares (Hubbard y Till, 2000). Por lo cual se propone que las células de Leydig emplean la vía MAPK para regular su proliferación.

Observamos que la insulina juega un papel dual en la función testicular, particularmente en la producción de testosterona. Estudios realizados sobre la regulación del metabolismo de esteroides por parte de la insulina en rata adulta (Lin T y col, 1986) y embriones de pollo (Bobes y col, 2001) muestran una

regulación positiva. Nuestros datos apoyan estas observaciones. A los 16 d.g., etapa fetal donde el empleo de la testosterona es requerida para diversas funciones embrionarias, como el mantenimiento de los genitales internos, se observa una regulación positiva por la mayor concentración del andrógeno detectado en el grupo experimental respecto al grupo control. Estos datos apoyan la hipótesis planteada de que la insulina regula positivamente la producción de testosterona. Con esto se infiere que en la etapa de mayor síntesis de testosterona durante la gestación, la insulina participa como uno de los reguladores positivos para la síntesis de hormona sexuales. El mecanismo por el cual la insulina ejerce su efecto de regulación positiva aun no se ha descrito.

A los 18 d.g., etapa perinatal, se observa una regulación negativa en la síntesis de testosterona por la insulina. Este efecto sobre la regulación puede deberse al efecto de inhibición de síntesis de testosterona por altos niveles de expresión de factores de crecimiento. Por lo que estudios realizados en cultivos de células de rata, han demostrado que un inhibidor de la esteroidogénesis es el factor de crecimiento transformante beta (TGF β) (Gautier y col, 1997). Además se ha descrito la presencia de este factor en las células prenatales de Leydig en rata (Gautier y col, 1997). Considerando lo anterior, podemos elucidar la conservación de este factor en el ratón y su expresión a esta edad, provocando la inhibición de la esteroidogénesis a los 18 d.g.

En las células embrionarias del testículo de ratón a los 14 d.g. se observó una regulación negativa, ya que las concentraciones obtenidas fueron de 13 ng/mL para el grupo experimental y 16 ng/mL para el control. Por la falta de respuesta a esta edad, podríamos elucidar causas posibles. La primera debido a que hay pocos receptores a insulina expresados en la membrana de las células de Leydig a esta edad. La presencia de los receptores a insulina en etapa embrionaria se ha propuesto por estudios realizados, en los que encontraron que la determinación testicular requiere de la función de la familia de receptores de insulina (Nef y col, 2003). La segunda, aunada con la primera, podría deberse a que, por medio de los pocos receptores presentes, los efectos por la activación de las vías intracelulares del receptor de insulina, desencadenados por esta hormona, estén totalmente dirigidos a regular la proliferación celular.

En resumen, los resultado muestran mayor proliferación celular en los grupos tratados con insulina en todas las etapas estudiadas, con esto se acepta la primer hipótesis propuesta. También nuestros resultado muestran que en el ratón la insulina puede regular positiva o negativamente la esteroidogénesis, por lo que la segunda hipótesis planteada también se acepta.

VIII. CONCLUSIONES

- La insulina es inductor de la proliferación de las células de Leydig durante las etapas estudiadas, 14, 16 y 18 d.g. del ratón *Mus musculus in vitro*.
- La insulina ejerce regulación tanto positiva como negativa en la síntesis de testosterona en la etapa prenatal del ratón *Mus musculus*.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Ashcroft, Frances M, Stephen H J. 1992. Insulin: Molecular biology to pathology. IRL Press. Pag 37-46.

Avruch J. 1998. Insulin signals transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem* 182: 31-48

Bobes R J, Castro R I, Miranda C, Romano M C. 2001. Insulin modifies the proliferation and function of chicken testis cells. *Poult Sci* 80: 637-642.

Carlson B. Embriología humana y biología del desarrollo. 2ª edición. Editorial Mosby. Pag 378-283.

Chen Y, Nagpal M L, Lin T. 2003. Expression and regulation of glucose transporter 8 in rat Leydig cells. *Journal of Endocrinology* 179: 63-72.

Cruz M, Velasco E, Kumate J. 2001. Señales intracelulares que intervienen en el control de la glucosa. *Gac Méd Méx* 137: 135-146.

Duleba A, Spaczynski R, Olive D. 1998. Insulin and insulin-like growth factor 1 stimulate the proliferation of human ovarian theca-interstitial cells. *Fertil Steril* 69: 335-340.

Gabbay A R, Lardig A H. 1987. Insulin-inhibition of hepatic cAMP dependent protein kinase: decreased affinity of protein kinase for cAMP and possible differential regulation of intrachain site 1 and 2. *Proc Nat Acad Sci USA* 84: 2218-222.

Gaetner L, Hiatt J. 2002. Texto Atlas de Histología. 2ª edición. Mac Graw-Hill Interamericana. Pag 473-474.

- Gautier C, Levacher C, Saez J, Habert R.** 1997. Transforming growth factor β 1 inhibits steroidogenesis in dispersed fetal testicular cells in culture. *Mol Cell Endocrinol* 131: 21-30.
- Haider S.** 2004. Cell biology of Leydig cells in the testes. *Int Rev Citol* 233: 181-209.
- Hubbard S, Till J.** 2000. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* 69: 373-398.
- Kim S, Psk Y.** 2005. Caveolin-2 regulation of cell cycle in response to insulin in Hirc-B fibroblast cell. *Biochem Biophys Res Commun* 33: 88-96.
- Kimura M, Ogihara M.** 1997. Proliferation of adult rat hepatocytes in primary culture induced by insulin is potentiated by cAMP-elevating agents. *Eur J Pharmacol* 327: 87-95.
- Kokk K, Vesäj nkorva E, Wu X, Tapfer H, P ldoja E, P ll nen P.** 2004. Immunohistochemical detection of glucose transporters class I subfamily in mouse, rat and human testis. *Medicina* 40: 156-160.
- Kristiansen S, Endoh A, Casson P, Buster J, Hornsby P.** 1997. Induction of steroidogenesis enzyme gene by insulin and IGF-1 in cultured adult human adrenocortical cells. *Steroids* 62: 258-265.
- Lin T, Haskell J, Vinson N, Terracio L.** 1986. Characterization of insulin and insulin-like growth factor 1 receptor of purified Leydig cells and their role in steroidogenesis in primary culture. A comparative study. *Endocrinology* 119: 1641-1647.

- Merchant H.** 1993. El sexo gonadal, *Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas*, UNAM. 451-460.
- Metzler D.** 2001. Biochemical, the chemical reactions of the living cells, second edition. Academic Press, vol 1, pag. 569-579.
- Moore K, Persaud T.** 1999. Embriología Clínica. McGraw-Hill Interamericana Editores.
- Mukherjee j, Huang J, Getman C, Kiss Z.** 1999. Bombesin promotes synergistic stimulation of DNA synthesis by ethanol and insulin in fibroblast. *Biochem Biophys* 362: 183-189.
- Nef S, Verma-Kurvari S, Merenmies J, Vassalli J D, Efstratiadis A, Accili D, Parada L.** 2003. Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature* 426: 291-295.
- Nordqvist K.** 1995. Sex differentiation – gonadogenesis and novel genes. *J Dev Biol* 39: 727-736.
- Norman A, Litwack G.** 1997. Hormones. 2ª edición. Academic Press. Pag 65-72, 341-351.
- Pimentel E.** 1994. Handbook of growth factors, peptide growth factors. Volume II. CRC Press. Pag 1-27.
- Sadler.** 2004. Embriología médica con orientación médica. 9ª edición. Editorial Médica Panamericana. Pag 354-365.
- Saucier J, Dube, Tremblay R.** 1980. Specific insulin binding sites in rat testis: characterization and variation. *Endocrinology* 109: 2220-2225.
- Smith C J, Vasta V, Degerman E, Belfrage P, Manganiello V C.** 1991. Hormone-sensitive cyclic GMP- inhibited cyclic AMP phosphodiesterase in rat

adipocytes. Regulation of insulin and cAMP-dependent activation by phosphorylation. *J Biol Chem* 266: 13385-13390.

Soares M B, Schon E, Henderson A, Karathanasis S K, Cate R, Zeitlin S, Chirgwin J, Efstratidis A. 1985. RNA-mediated genes duplication: the rat preproinsulin 1 genes is a functional retroposon. *Mol Cell Biol* 5: 2090-2103.

Tanigushi C, Emanuelli B, Kahn R. 2006 Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:85-96.

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

Tilman C, Capel B. 2002. Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. *The Endocrine Society Recent Prog Horm Res* 57: 1-18.

Todd S, Yoshida M C, Fang X E, Mc Donal L, Jacobs J, Heinrich G. Bell G I, Naylor S L, and Sakagushi A Y. 1985. Genes for insulin I and II, parathyroid hormone, and calcitonin are on rat chromosome 1. *Biochem Biophys Res Commun* 131: 1175-1180.

William J L. 2003. Embriología humana. 3ª edición. Editorial Churchill Livingstone. Pag 276-283.

Yao H, Capel B. 2005 Temperature, genes and sex: a comparative view of sex determination in *Trachemys scripta* and *Mus musculus*. *J Biochem* 138: 5-12.

Zawalich WS, Diaz VA, Zawalich KC. 1988. Influence of cAMP and Calcium on [³H] inositol efflux, inositol phosphate accumulation, and insulin release from islet of rat islet. *Diabetes* 57: 1478-1483.

X. APÉNDICE

1. Solución PBS (1:10)

Para 100 mL

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

2. Medio D'MEM suplementado

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

3. Glutaraldehído al 0.3% (fijador)

Para 10 mL

- 125 μ L de glutaraldehído al 25% (Merck)
- cbp 10 mL de PBS .

4. Solución bloqueadora de albúmina al 5%

Para 10 mL

- 9870 μ L de PBS
- 0.5 g de Albúmina Sérica Bovina
- 100 μ L de Gelatina