



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE
TESTOSTERONA EN LA CÉLULA DE
LEYDIG DEL TESTÍCULO 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:

CHRISTIAN ISRAEL VELÁZQUEZ CASTRO





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.

MÉXICO D.F.

2007

Jurado Asignado:

Presidente:

Carmen Giral Barnes

Vocal:

José Pedraza Chaverri

Secretario:

Maria Irma Villalpando Fierro

1er Suplente:

Maria Elena Ibarra Rubio

2º Suplente:

Eleazar Martínez Barajas

Sitio donde se realizo el tema:

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Laboratorio de embriología y biología molecular, UNAM

Asesor

Dra. Maria Irma Villalpando Fierro

Supervisor Técnico

Biólogo: Esmeralda Lira Romero

Sustentante

Christian Israel Velázquez Castro

Las formas equivalentes de la vida son inesperadas, llegan cuando menos las esperas, todo aquello por lo que luchamos se pierde y por lo tanto jamás vuelve. La lluvia cae, los campos florecen, los animales llenos de melancolía retroceden un poco para ver la vida pasada, llena de todas estas cosas como si la hubieran vivido ya... Surge en mi la interrogante conocida por algunos... ¿Qué hago aquí?.

Velázquez Castro Héctor Alejandro

La célula es un sistema que fue diseñado a prueba de errores, la cual

es capas de fallar en cualquier momento.

José Rodrigo Barquera Lozano

Agradecimientos

Quiero agradecer:

A mis padres, Juan Velázquez Hernández y Olga Castro López, que siempre han estado a mi lado, y nunca me dejaron de apoyar en todo momento para que me volviera un hombre de bien.

A Dios, por darme la oportunidad de estar en este mundo y conocer todo lo que en el se encuentra.

A mis hermanos, Héctor Alejandro Velázquez Castro, que siempre esta conmigo y nunca me abandona; A Juan Jesús Velázquez Castro, que es mi hermano más grande.

Al resto de mi familia, la cual sabe que la quiero y estimo mucho.

A la Dra. Irma Villalpando Fierro por todo la paciencia, cariño, dedicación que me tubo en el momento del trabajo y por todos los conocimientos que ella me proporciono.

A la Bióloga Esmeralda Lira Romero, la cual me sirvió de apoyo en los momentos de duda y confusión, así como a mis compañeros de laboratorio que me sirvieron de compañía.

A mis colegas de la facultad de química, ya que los considero como mis hermanos del alma: Omar Reyes, Mayel Soto, Rogelio Ibarra, Marco Antonio, Edgar Daniel, Roberto

AGRADECIMIENTOS

Garfias, Amanda Ochoa, Isaura Hernández, Víctor Gamero, Carmina Selene, Liliana Torres, Victoria Cervantes, Karina Nava, Rodrigo Barquera, Abraham Vega, Guadalupe Ponce, Adrián Zúñiga, Elizabeth Zavala, Eunice González, Mabel Carranza, Aracne Huerta, Lizeth Meza, Rodrigo Gutiérrez, Omar Rojas.

A mis profesores, ya que sin ellos yo no estaría en el lugar que me encuentro, a ellos con muchos respeto.

Desde el cielo donde se encuentra mi abuelita Cipriana López Flores, la cual me crió en los momentos más difíciles de una persona, su niñez, nunca la olvidaré.

A mi abuelito Leopoldo Castro Camacho, el cual siempre me inspiro respeto, esfuerzo y cariño que me viva mil años más.

A mis abuelos Juan Velázquez y María Hernández, que aunque no los conocí, se que desde el cielo donde se encuentran cuidan de mi y siguen mis pasos, a ellos con mucho amor.

A Claudia Ivonne García Salas, la cual me acompaña en todo momento, me da consejos y me motiva a ser una persona mejor cada día, a ella le doy mis más grandes agradecimientos, la quiero mucho.

Finalmente agradezco a mi Máxima Casa de Estudios: La UNAM, debido a que me permitió estudiar en la Facultad de Química, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas y por todas la facilidades que mostró para la realización de esta Tesis, muchas gracias.

Christian Israel Velázquez Castro

Por mi raza hablará el espíritu.

CONTENIDO

I.	Resumen.....	8
II.	Antecedentes.....	9
1)	Desarrollo testicular de mamíferos.....	9
a)	Formación de la cresta genital.....	9
b)	Fase de gónada indiferenciada.....	13
c)	Diferenciación testicular.....	15
2)	Gen determinante de la diferenciación testicular.....	16
3)	Genes autosomales.....	18
4)	Insulina.....	22
a)	Estructura.....	22
b)	Participación de la insulina en el metabolismo.....	25
c)	Localización del gen en el ratón.....	26
d)	Gen de la insulina.....	26
5)	Modelos de estudio sobre diabetes experimental.....	27
a)	Ratón.....	28
6)	Regulación de la esteroidogénesis del testículo postnatal.....	28
a)	Testosterona.....	29
b)	AMPc.....	31
c)	Citocalacina B.....	33
d)	D-glucosa.....	34
e)	Transportadores de Glucosa.....	35
III.	Planteamiento del problema e hipótesis.....	38
IV.	Objetivos.....	39
V.	Materiales y métodos.....	40
a)	Generación de hembras preñadas.....	40
b)	Obtención de embriones.....	40
c)	Aislamiento de células de Leydig.....	40
d)	Determinación del número de células.....	42
e)	Cultivo celular.....	42
f)	Extracción de esteroides.....	43
g)	Radioinmunoanálisis.....	43
h)	Análisis estadístico.....	44
VIII.	Resultados.....	45
a)	Establecimiento de la curva estándar.....	45
b)	Regulación de la producción de testosterona.....	45
i.	Efecto de citocalacina B.....	46
ii.	Papel de la insulina.....	47
iii.	Análisis Comparativo.....	48
IX.	Discusión.....	49
X.	Conclusiones.....	53
XI.	Bibliografía.....	55
XII.	Apéndice.....	60

I. Resumen

La diabetes mellitus provoca daño en las células secretoras de Leydig en los testículos adultos de ratón, sin embargo, se desconoce si los niveles altos de glucosa afectan la producción de testosterona en los testículos fetales de los hijos de madres diabéticas. Así mismo, no se sabe si el citoesqueleto de las células de Leydig participa en el transporte de glucosa en la célula de Leydig del testículo fetal. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la glucosa alta (50 mM), insulina (100 ng/mL) y citocalacina B (10 mM) en la producción de testosterona en las células de Leydig a los 18 días de gestación *in vitro* en el ratón *Mus musculus*. Se emplearon ratones hembras gestantes de la cepa CD1, se obtuvieron los testículos, se formaron grupos de 40–50 gónadas de 18 días de gestación y se purificaron las células de Leydig con tripsina al 0.2%. Se sembraron 5.0×10^4 células en medio Eagle Modificado Dulbecco. Las células se incubaron 24 h con 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C. El medio de cultivo se guardó a -20°C y posteriormente se extrajeron los esteroides con éter a una proporción 1:10. La cuantificación de testosterona se realizó por radioinmunoanálisis. Se observó que la glucosa inhibe la producción de testosterona en las células de Leydig del testículo en el ratón a los 18 días de gestación. La citocalacina B también inhibió la producción de testosterona. Se observó que la insulina regula negativamente la producción de testosterona. Se propone que la síntesis de testosterona en el testículo fetal del ratón es regulada negativamente por glucosa e insulina.

I. Antecedentes

El mecanismo por el cual el sexo de los mamíferos es determinado, es una de las preguntas más relevantes en biología que hasta la fecha se conoce parcialmente (1). Actualmente se sabe que durante la fecundación, el macho puede aportar dos tipos de espermatozoides; uno con un cromosoma "X" y otro con un cromosoma "Y" (1). Por otra parte, se sabe que los ovocitos solo producen cromosomas "X", debido a esto si un espermatozoide "X" fertiliza al ovocito se desarrolla una hembra con dos cromosomas "X". Si por el contrario el ovocito es fecundado por un espermatozoide "Y" los individuos desarrollan testículos, de esta manera se establece el sexo gonadal (2, 3). Posteriormente ocurre la diferenciación gonadal y los individuos "XX" desarrollarán ovarios y los "XY" testículos, así la diferenciación gonadal se describe a continuación.

Desarrollo testicular de mamíferos

a) Formación de la cresta genital

La cresta genital se forma por la interacción de diferentes líneas celulares, las cuales son: células del mesénquima adyacente, proveniente del mesonefro. Sin embargo, el origen embriológico de este tipo celular es tema de controversia hasta el presente. Así mismo, en la formación del presunto ovario o testículo también participan las células del epitelio celómico que bordean la cavidad celómica (5).

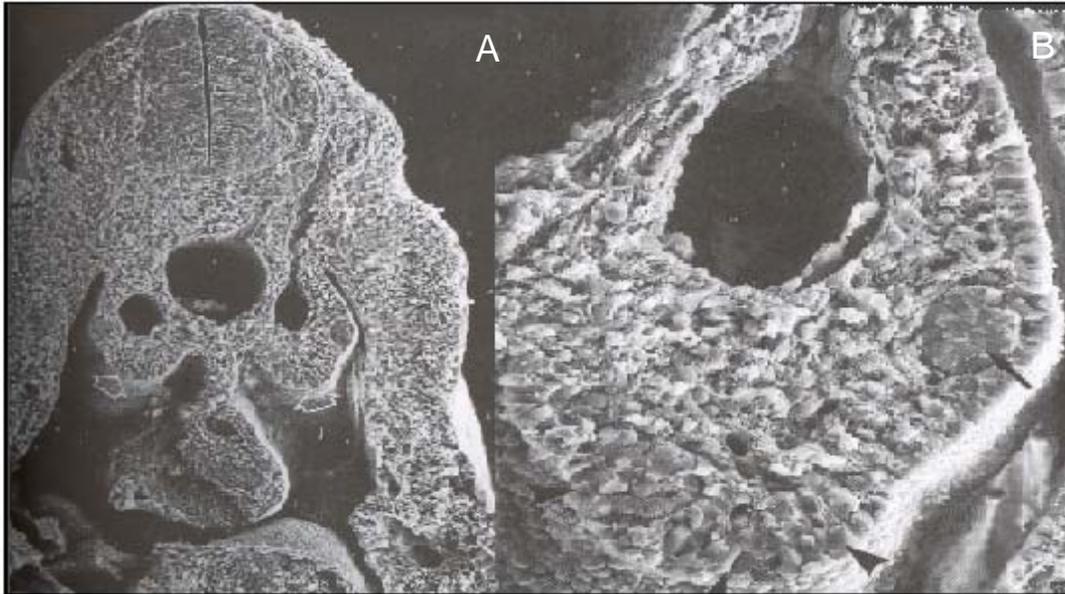


Fig. 1. Corte transversal que muestra la migración de las células germinales primordiales hacia la cresta genital; "A". Aumento de la cresta genital; "B" (Lagman, 2000).

Tanto las células del mesénquima como las células del epitelio celómico, tienen un alto índice de proliferación, lo cual origina la cresta genital (5).

En los mamíferos, en particular en el ratón se ha planteado que las células germinales primordiales derivan del endodermo embrionario, pero son detectadas histoquímicamente hasta el día 5-8 de gestación en la base de la alantoides (4). Experimentos realizados en el ratón demostraron que las células germinales primordiales (CGPs) tienen un origen extraembrionario (5). La migración de las CGPs se lleva a cabo por dos tipos de movimientos: pasivo y activo (6). En el primero las CGPs son arrastradas por el propio crecimiento diferencial del embrión (4, 5, 7). En el segundo movimiento se implica la capacidad motriz de las CGPs que se detectan inicialmente en la base del alantoides. Posteriormente las CGPs

son transportadas al intestino posterior, quedando entre las células epiteliales de este órgano (4, 7).

En su camino migratorio las CGPs tienen la necesidad de atravesar la lámina basal que cubre el intestino (1, 4). Las CGPs requieren de un movimiento activo que se manifiesta por emisión de pseudópodos y enzimas proteolíticas capaces de romper la lamina basal del intestino para después continuar su camino hacia las futuras crestas genitales a través de las células mesenquimáticas (7, 24). Se han propuesto tres mecanismos por los cuales se puede explicar la direccionalidad del desplazamiento de las CGPs: Uno a través de un gradiente de concentración de un factor secretado por las células del epitelio celómico situado en la región urogenital (3, 4, 7, 9). En este caso las CGPs se guiarán por un proceso de quimiotaxis, muy similar al que se lleva a cabo entre los leucocitos y macrófagos que se dirijan hacia un sitio de infección bacteriana. Actualmente en el ratón se sabe que el factor quimiotáctico es el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (8).

El segundo mecanismo propuesto es el que se denomina guía por contacto en el cual implica la existencia de receptores específicos en la superficie de las CGPs, capaces de adherirse a las moléculas presentes en la superficie de las células mesenquimáticas y en la matriz extracelular. Por este mecanismo, las células reproductoras, seguirán un camino predeterminado ya que sólo las células somáticas distribuidas en el camino hacia la cresta genital sintetizarán y depositarán en su superficie las moléculas de adhesión específica (4, 7). El tercer mecanismo propuesto describe una organización topográfica de las células

somáticas del embrión en el momento del desplazamiento de las CGP. Aquí las primeras juntos con los componentes estructurales de la matriz extracelular, estarían dispuestas de tal forma que las CGPs no podrían salirse del túnel que físicamente las dirige a la “cresta genital” (4, 5).

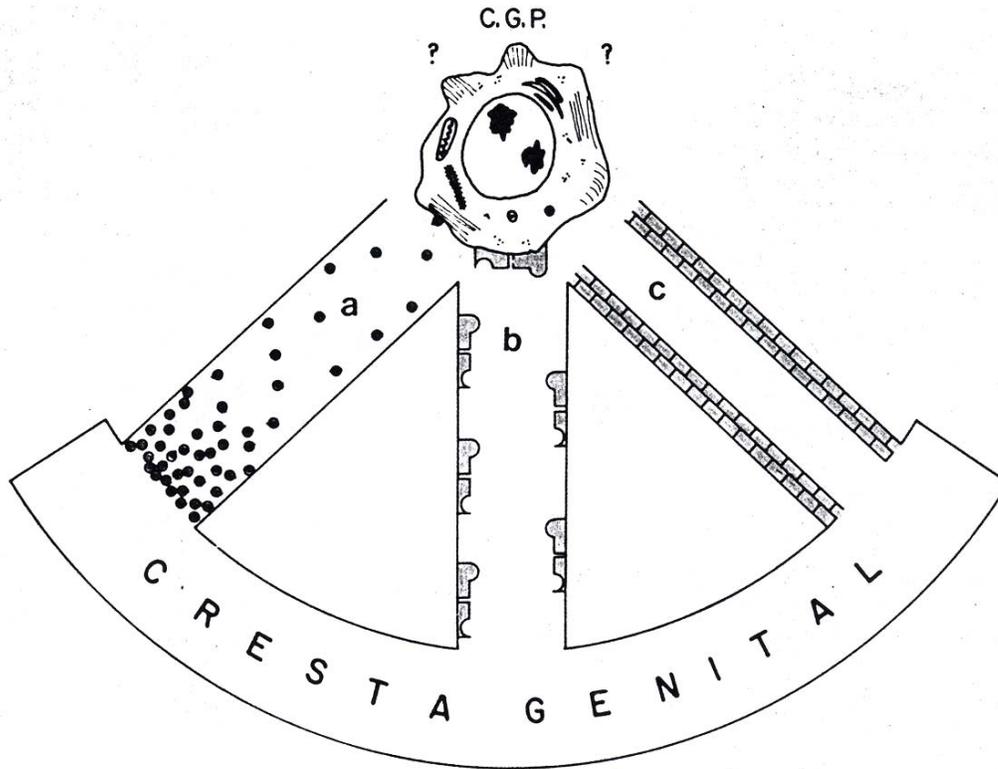


Fig.2. Mecanismos que guían a las CGPs hacia la cresta genital. a) gradiente de concentración; b) guía por contacto; c) arreglo topográfico (Merchant, 2004).

Al llegar las CGPs a la región urogenital, se encuentran con diferentes tipos de células somáticas de origen mesodérmico, entre ellas las células mesoteliales, mesenquimáticas, mesonéfricas y endoteliales. Los dos primeros tipos celulares son los que participan directamente en la formación de la gónada indiferente como células precursoras. Las células mesonéfricas y endoteliales, son parte de los

tejidos ya diferenciados, que directamente participan en la morfogénesis de la gónada (1, 5).

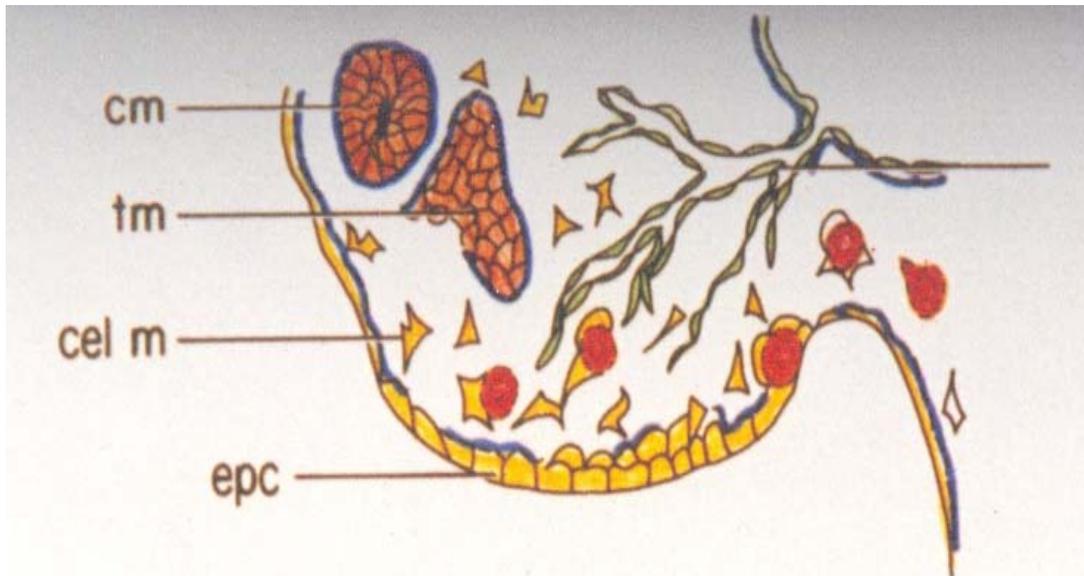


Fig. 3. Esquema que muestra la organización de la cresta genital, (cm) conducto mesonéfrico, (tm) túbulo mesonéfrico (Cel m) Células mesenquimáticas y (epc) epitelio celómico o mesotelio (Merchant, 2004).

A pesar, de los estudios que se han realizado, en los que se ha observado el comportamiento de las células germinales primordiales *in vitro*. Se sabe poco sobre los mecanismos que guían a estas células hasta su ubicación final en las crestas genitales (4).

b) Fase de gónada indiferenciada

Después de la formación de la cresta genital, se establece la gónada indiferenciada la cual se detecta a los 11-11.5 d. g. en el ratón. En esta etapa, las células comienzan a condensarse y a separarse del epitelio celómico por la

invasión de los vasos sanguíneos; de esta manera se forman dos compartimientos, estromático y el epitelial (1, 4, 7, 24).

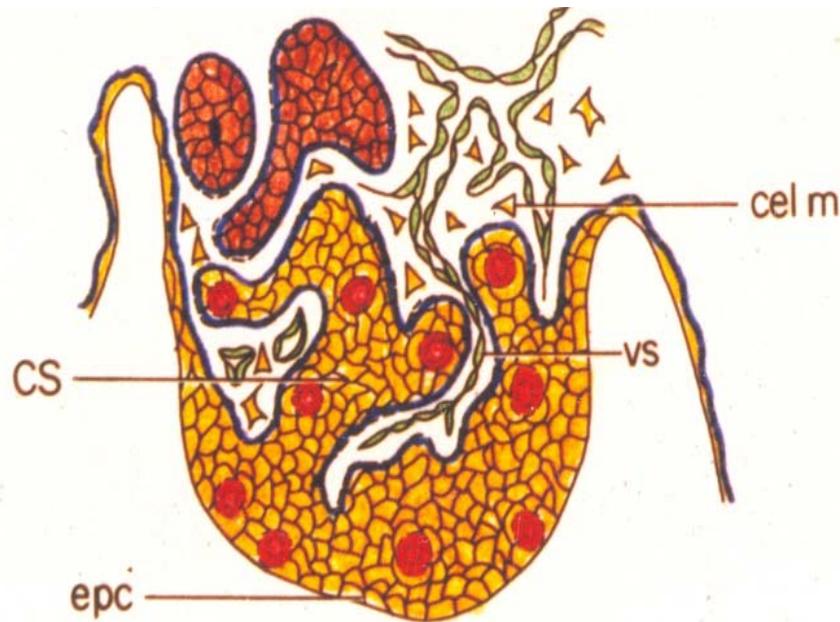


Fig. 4. Esquema de la gónada indiferenciada. Se muestra los vasos sanguíneos y las células mesenquimáticas ubicadas entre los cordones sexuales que están unidos al epitelio celómico (Merchant, 2004).

En el primer compartimiento se muestran las células epiteliales y las CGPs que formarán los cordones sexuales. En el segundo observamos las células mesenquimáticas, vasos sanguíneos y fibroblastos los cuales darán origen al componente intersticial. Tanto en los machos como en las hembras, los cambios morfológicos que ocurren para el establecimiento de la cresta genital, blastema gonadal y la gónada indiferenciada son los mismos (4). Independientemente del sexo genético que posea la etapa de la cresta genital comprende de los 9.5 a los 10.5 d.g. en ratones, de tal forma que la proliferación de cada uno de los tipos

celulares mencionados da origen a los cordones sexuales que caracterizan a la gónada indiferenciada (4, 5).

c) Diferenciación testicular

La diferenciación sexual testicular en los ratones ocurre entre los 12 a 13.5 d.g. dependiendo de la especie de roedor en estudio. El rearrreglo topográfico e histológico del testículo es inducido por la presencia del gen *Sry* que se expresa desde los 10.5 d.g. (5). Una vez que se ha establecido la gónada indiferenciada, el paso siguiente en la diferenciación del testículo es la invasión de vasos sanguíneos y las células mesenquimáticas que separan el epitelio celómico de los cordones sexuales, así como la relocalización de estos en la parte central del futuro testículo (5). Debido al reacomodo de éstos en la parte central del testículo, los cordones sexuales reciben ahora el nombre de cordones seminíferos. En su interior estos contienen a las CGPs, que se diferenciarán de proespermatogonias a espermatozoides y a células de Sertoli (4, 5). Estas regulan a las células germinales (3). Al contrario del ovario, los testículos tienen la habilidad de diferenciarse en ausencia de células germinales, resaltando la importancia de las células de Sertoli y Leydig en este proceso. Fuera de los cordones se encuentran las células mesenquimáticas que tienen función de soporte y nutrición éstas se diferencian a células de Leydig, fibroblastos y células mioideas (5). Aunado a la formación de las gónadas se desarrollan un par de conductos que dan origen a los genitales internos, son dos sistemas de conductos los cuales están presentes en las etapas iniciales del desarrollo gonadal en ambos sexos los cuales son: Los

conductos de Wolf (mesonéfricos) y los conductos de Müller (paramesonéfricos) (11). La diferenciación de los genitales internos y externos es producida por dos hormonas, la testosterona que potencia la diferenciación de los genitales internos y la 5α -dihidrotestosterona que promueve la diferenciación de los genitales externos (5, 11).

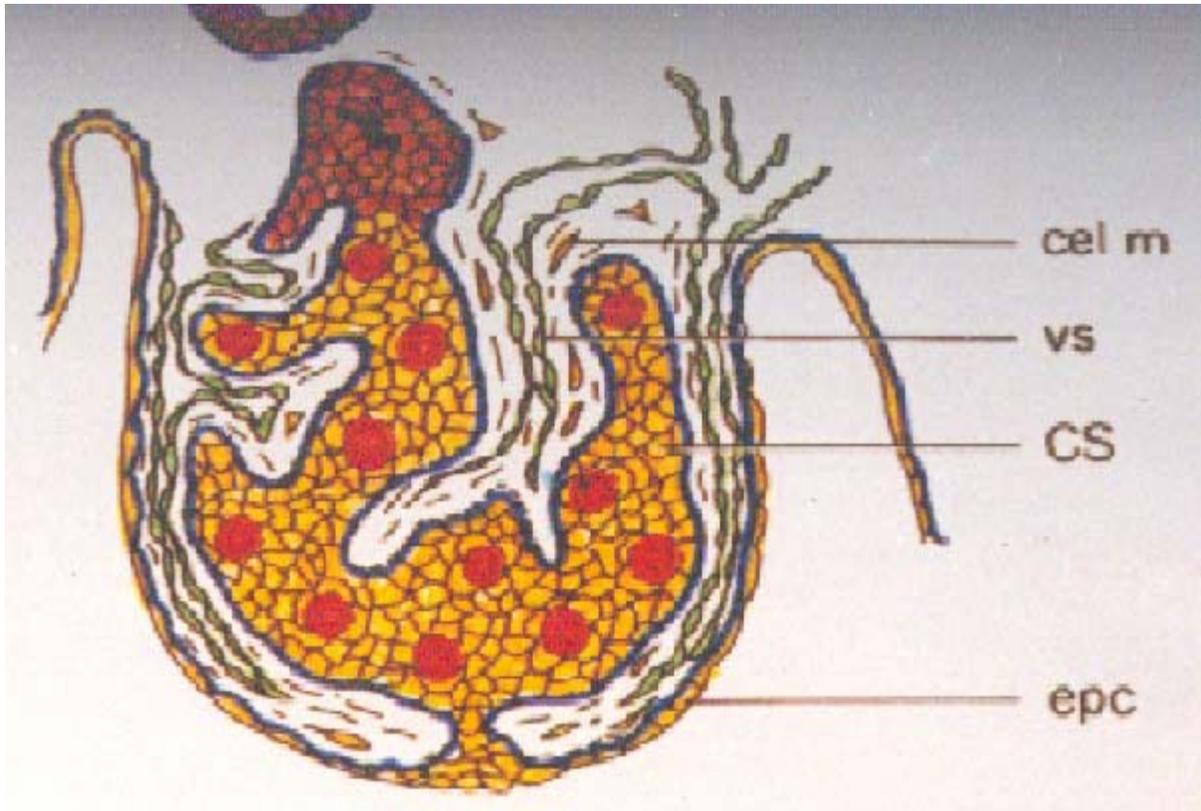


Fig. 5. Aquí se muestra la diferenciación del testículo. Una invasión activa de mesénquima (cel m) y vasos sanguíneos (vs) que separan a los cordones sexuales (cs) del epitelio celómico. (epc). (Merchant, 2004).

Las células de Leydig son las productoras de esteroides y se originan en el mesénquima. Su morfología muestra células poliédricas y grandes agrupadas cerca de los vasos sanguíneos del intersticio presente entre los túbulos seminíferos (11).

Gen determinante de la diferenciación testicular

En los seres humanos y en los ratones, el gen determinante de la diferenciación sexual y testicular se localiza en el brazo corto del cromosoma Y (12). Este gen se denomina *SRY* (Sex-Determining Region on the Y Chromosome) en el humano; y en otras especies se nombró *Sry*. Este gen está relacionado con la presencia de los testículos presentes en los machos XY. El gen *Sry* se expresa en las células somáticas de la gónada bipotencial del ratón antes de su diferenciación hacia el testículo y durante este proceso.

La evidencia más importante de que el gen *Sry* es el factor determinante testicular viene de los ratones transgénicos (13). En los roedores la presencia de este gen se detecta a los 10.5 d.g. aunque los niveles más altos de expresión del *Sry* pueden ser detectados a los 12 d.g. También se ha observado en etapas posteriores a los 13 d.g. en embriones y en testículo de ratón adulto. Hasta el momento no se han establecido todas las características de la proteína que codifica el gen *Sry*, aunque se sabe que esta constituida por 223 aminoácidos y que contiene tres regiones de 79 a.a. cada una (14).

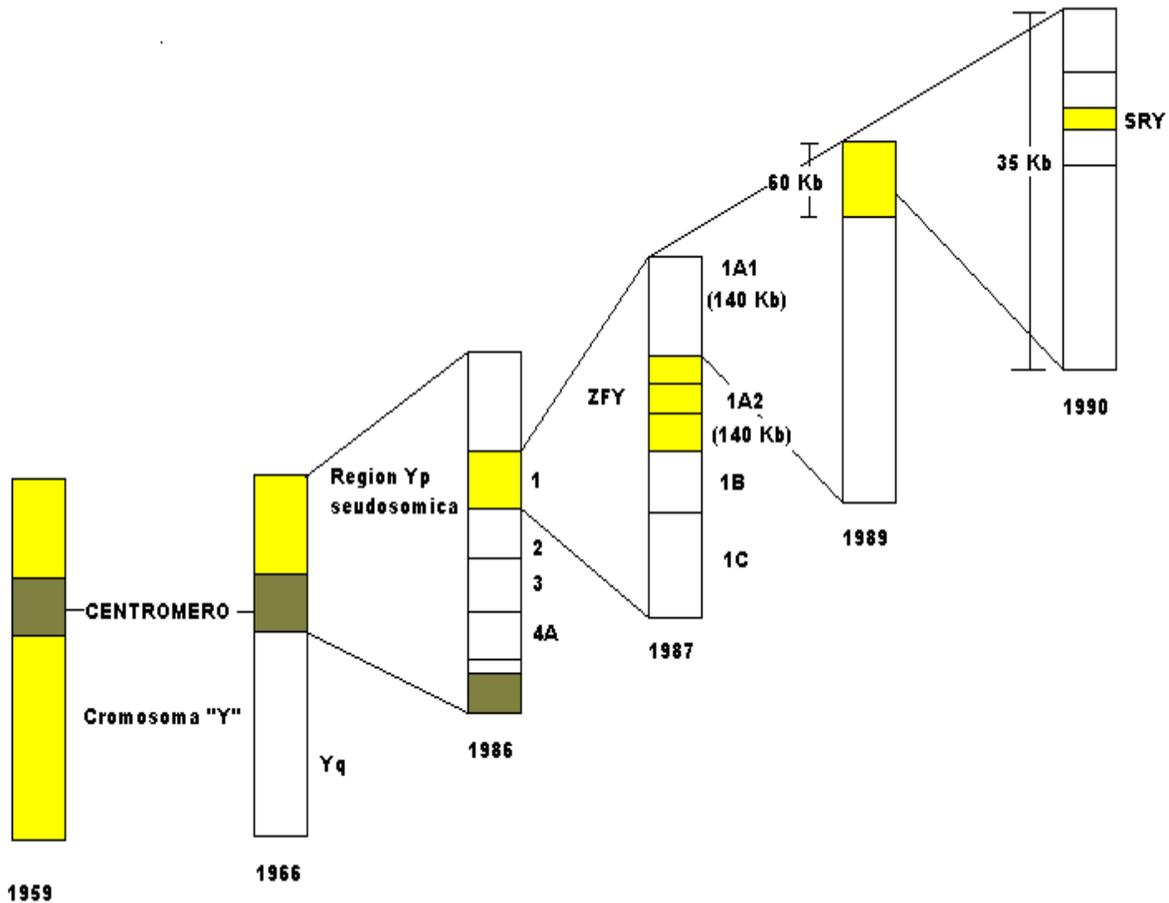


Fig.6. Esquema que muestra la localización del gen de la determinación sex ual testicular en el cromosoma "Y" (Carlson,2004).

Genes autosomales

Se han identificado diferentes genes que juegan un papel importante en la determinación sexual tanto masculina como femenina.

Sox9

Los genes autosomales que participan en la cascada de diferenciación sexual gonadal, denominados SOX9/Sox9 en el humano y en otros vertebrados inferiores, son miembros de la familia de genes relacionados con el dominio HMG. La expresión del gen y de la proteína se observa en los lugares donde ocurre la

formación del hueso, también en la gónada desde los 10.5 d.g. Posteriormente, en los machos solo se detecta en las células de Sertoli a los 13.5 d.g (14). *Sox9* en machos participa en la diferenciación de la célula de Sertoli y desarrollo del testículo (9, 16).

El *gen Sox9* es solo uno de la familia de genes conocida como genes *Sox* (SRY-related HMG box). Uno de estos genes es el que juega un papel muy importante en la determinación sexual: el *Sox9*. Además, el *gen Sry* ha mostrado interferir en la determinación sexual masculina debido a una mutación (9). El *Sox9* es un gen autosómico que también puede inducir la formación testicular. Se ha propuesto que el *Sox9* puede reemplazar al *Sry* en la formación testicular. Esto es, mientras que *Sry* es asociado específicamente a los mamíferos, *Sox9* se localiza en otros vertebrados. Por lo tanto, el *Sry* puede actuar como un activador para el *gen Sox9* y la proteína *Sox9* iniciar la formación testicular (19). En ratones la expresión de *Sox9* está regulado en gónadas XY después del inicio de la expresión de *Sry* (17, 18). La inactivación de *Sox9* en embriones XY promueve una reversión sexual femenina. Además, la expresión exógena de *Sox9* en gónadas XX puede inducir la formación testicular en ausencia de *Sry* (19). *Sox9* migra hacia el núcleo en el momento de la determinación sexual. Aquí se une un sitio promotor sobre el *gen* para el factor inhibidor de Müller proporcionando un enlace que será crítico para la manifestación del fenotipo masculino (17, 20).

MIS

Otro tipo de componente implicado en esta diferenciación sexual es la Hormona Inhibidora de los Conductos de Müller, la cual tiene como función provocar la regresión de los conductos femeninos de Müller. Por esto es el primer producto

identificado de la célula de Sertoli, de tal manera, aparece poco después del inicio de la expresión de *Sry*. Se ha propuesto que *SOX9* y *SF1* están involucrados en su regulación. Se sabe que la hormona inhibidora de los conductos de Müller no es un eslabón integral en el camino de la determinación masculina como lo muestra el desarrollo de testículos normales en ratones sin AMH (9).

SF1

Otra proteína que puede ser activada directa o indirectamente por el *Sry* es el factor *Sf1* (factor esteroideogénico 1). Este es un componente de importancia en el desarrollo gonadal y de la suprarrenal además de regular la biosíntesis de esteroides masculinos (9). *Sf1* juega tres importantes papeles en el desarrollo sexual, primero en el establecimiento temprano de la gónada previo a la expresión de *Sry*. Más tarde en la diferenciación masculina regulando la *Amh* y también en la regulación de la síntesis de esteroides en células de Leydig y de la teca (9). *Sf1* es necesario para generar la gónada bipotencial pero mientras que los niveles de *Sf1* disminuyen en la cresta genital de los embriones de ratón XX, el gen *Sf1* permanece sobre el testículo en desarrollo. *Sf1* parece ser activo en la masculinización de las células de Leydig y de las células de Sertoli (17, 21). En las células de Sertoli, el gen *Sf1* funciona en colaboración con *Sox9*, es necesario para elevar los niveles de transcripción de *AMH* (17, 22). En las células de Leydig *Sf1* activa a los genes que codifican las enzimas que producen testosterona (12). La transcripción de *Sf1* está presente en la gónada de ambos sexos en ratones entre 9 y 12 d.g.

Wt1

El gen *WT1* inicialmente fue aislado analizando a pacientes con tumor de Wilms,

un tumor de riñón embrionario producido por una proliferación anormal del blastema metanéfrico. La primera indicación del papel esencial de *Wt1* en el desarrollo urogenital se obtuvo con el análisis de su expresión; el cuál mostró ser específico en el desarrollo de riñones y gónadas. Se ha mostrado que mutaciones en diferentes puntos del gen *Wt1* producen leves anormalidades en el sistema genital, incluyendo hipospadias y criptorquidismo (21). *Wt1* juega un papel importante en la maduración de la cresta genital, quizá por establecer un medio ambiente en el cuál *Sry* pueda actuar sobre las células para masculinizarlas. Se ha planteado que *Wt1* actúa como regulador de la expresión de *Sry* (9).

LIM1

Otro gen involucrado en este proceso es el llamado *LIM1*, este regula la producción de moléculas de organización en muchas especies. El bloqueo en el sitio de unión del gen *Lim1*, en ratones, provoca la ausencia de estructuras de la cabeza y muerte temprana, pero los fetos sobrevivientes mostraron falta de riñón y gónadas. Por esto se puede asumir que *LIM1*, así como *WT1* y *SF1*, están involucrados en la maduración de la cresta genital, pero juegan un papel importante en la inducción gonadal (9).

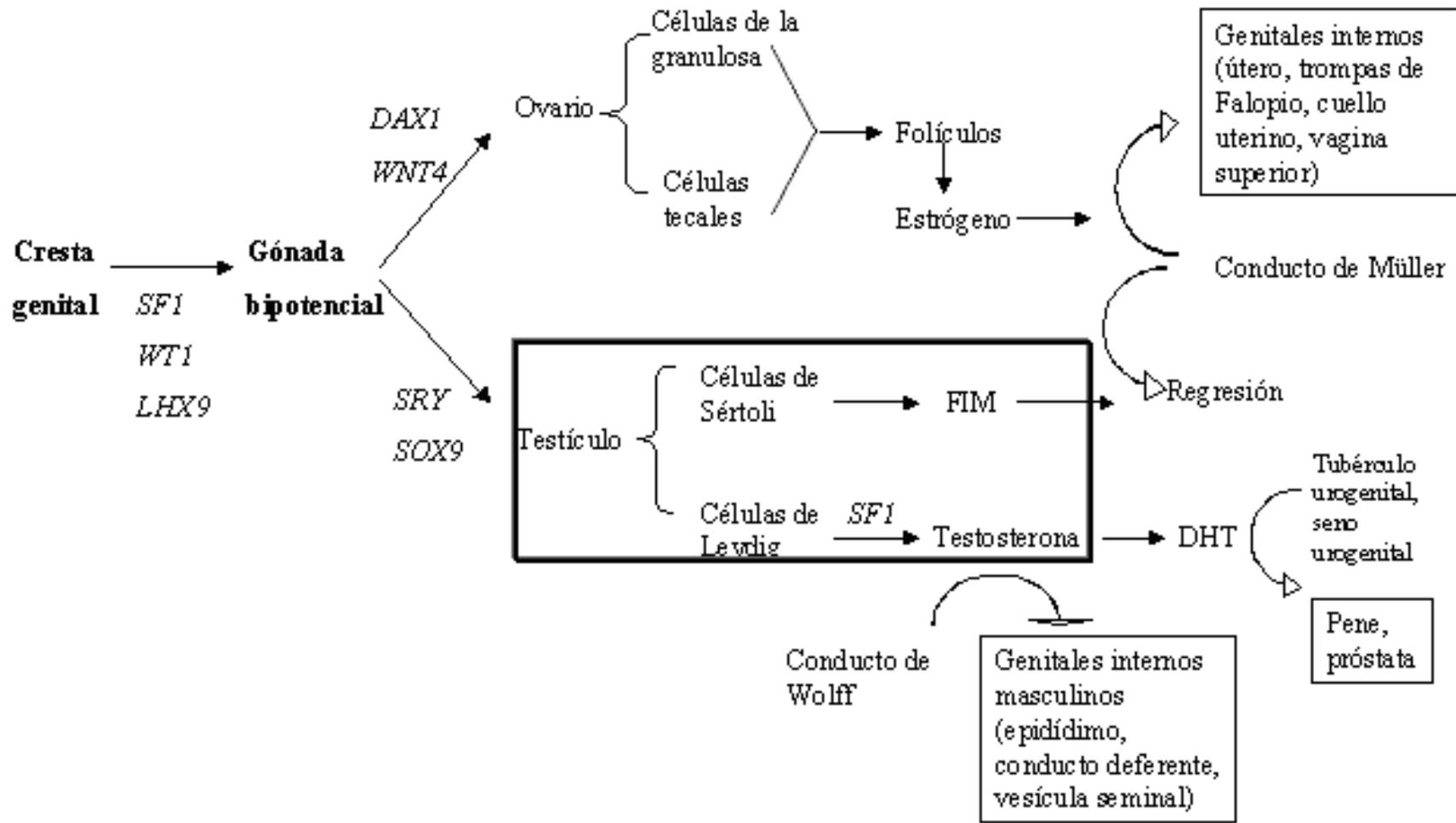


Fig. 7. Cascada postulada que conducen a la formación de las gónadas sexuales en los mamíferos (Gilbert, 2003)

Cuadro 1. Genes que participan en el desarrollo gonadal (Villalpando, 2001, Capel, 2002).

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

4) Insulina

a) Estructura

La insulina es una hormona de características proteicas, que funciona como un mensajero molecular extracelular (24). Esta molécula está compuesta de 51 aminoácidos organizados en dos cadenas denominadas A y B unidas por dos puentes disulfuro, con un peso molecular de 5.8 kDa. La insulina es sintetizada por las células β del páncreas en forma de un precursor, llamado preinsulina. Este precursor pierde 23 aminoácidos de la secuencia líder y se convierte a proinsulina, que está compuesta por 86 aminoácidos, de los cuales los residuos 1 al 32 corresponden a la cadena B y los residuos 64 al 86 de 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 (25).

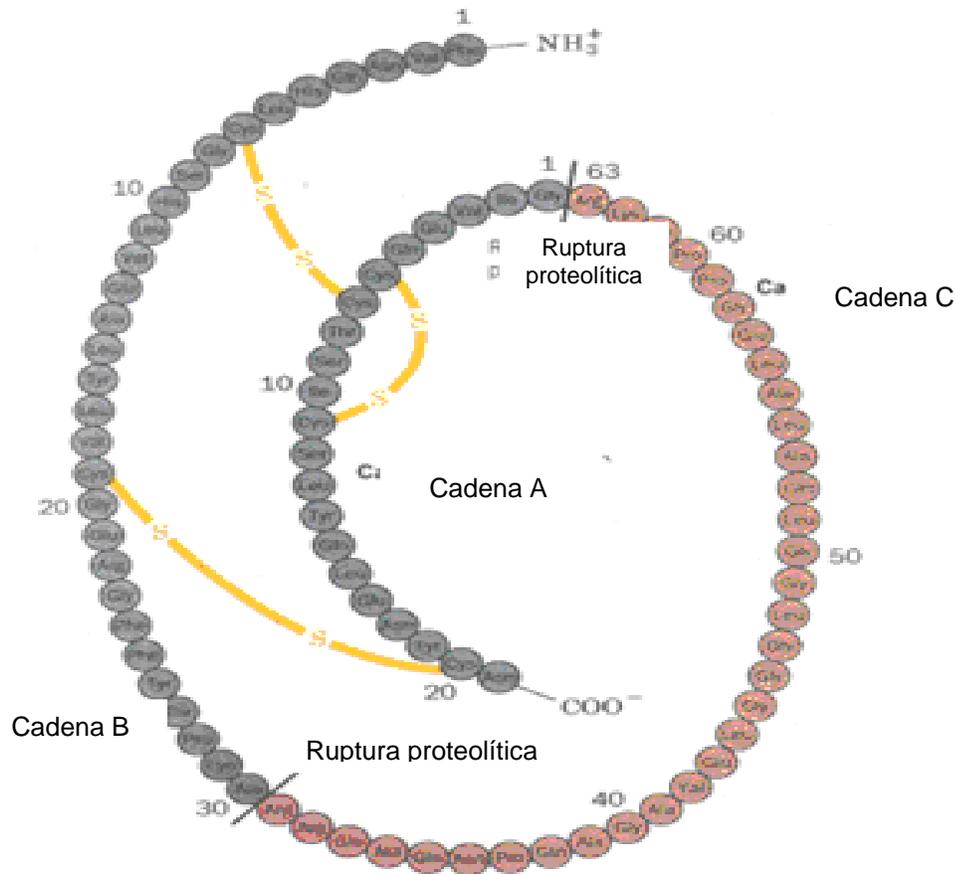


Fig. 8. Estructura primaria de la insulina. Su cadena C se escinde por proteólisis y se separa de sus cadenas A y B para formar la hormona madura (Voet, 2001).

Este péptido es separado dentro de las células β del resto de la molécula por una ruptura proteolítica durante el proceso asociado con la maduración de la hormona (25). La insulina es sintetizada y secretada por las células β de los islotes de Langerhans en el páncreas en respuesta al incremento en los niveles de glucosa (24, 26, 27). La hormona de crecimiento puede actuar como un factor de desarrollo para la diferenciación de las células β , promoviendo la proliferación y producción

de insulina en estas células (28, 29). La molécula de adenosin-3', 5' monofosfato (AMPc) y Ca^{2+} , así como metabolitos de fosfolípidos y la proteína cinasa C, pueden actuar como mediadores de factores extracelulares involucrados en la regulación de secreción de insulina (30, 31). El ácido araquidónico también puede tener función de segundo mensajero en la inducción por glucosa para la secreción de insulina (25, 32). La somatostatina sintetizada dentro de los islotes actúa de una manera parácrina como un regulador negativo de la secreción de insulina y glucagón. IL-1 produce en los islotes cierta influencia en la velocidad de la secreción de insulina (26, 32).

También el sistema nervioso autónomo puede contribuir a la regulación de la secreción de insulina a través de la liberación de epinefrina, acetilcolina y otros neurotransmisores (26, 32).

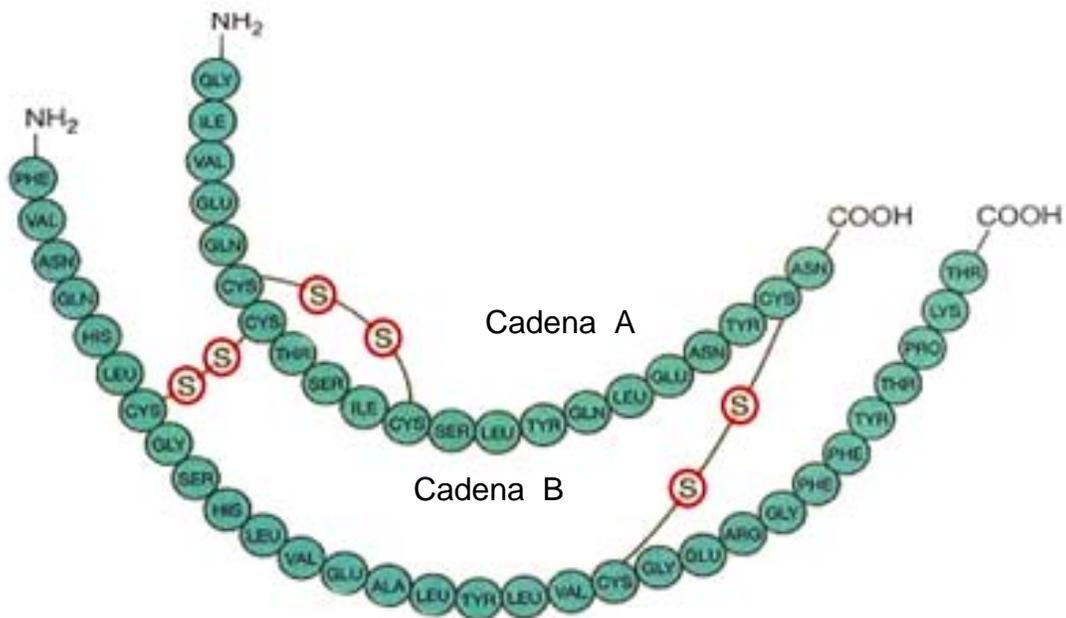


Fig. 9. Estructura de la insulina (Andrew, 1997).

b) Participación de la insulina en el metabolismo.

La participación de la adenilato ciclasa en el mecanismo de acción de la insulina es poco entendido. Se sabe que hay rutas de AMPc-dependiente y AMPc-no dependiente que 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 antagonizadas por agentes que disminuye la síntesis y/o incrementan la degradación de AMPc. La insulina es un potente inhibidor de la lipólisis, y esta acción es mediada por la serina proteína cinasa que cataliza la fosforilación y activación de la AMPc fosfodiesterasa (20) Además, la insulina puede actuar a nivel de AMPc-dependiente de proteína cinasa por decremento de su afinidad por el AMPc (43). Se ha propuesto que después de la unión de la insulina a su receptor, varios mediadores intracelulares específicos de insulina pueden ser formados, posiblemente por procesos proteolíticos limitados. Estos mediadores podrían ser péptidos de un peso molecular de 1000 a 3000 Da actuando sobre varios sitios intracelulares e involucrados en el control de diferentes actividades enzimáticas (44). 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. La insulina regula la expresión de los transportadores de glucosa GLUT. En ausencia de insulina, alrededor del 90% del GLUT se encuentra secuestrado 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. La glucosa es introducida al interior de la célula, donde será metabolizada y empleada en diversos procesos celulares (45).

c) Localización del gen de la insulina en el ratón

En otras especies como ratón, rata, y tres especies de peces, existen dos genes estructurales que codifican para insulina (33). El locus I del ratón es un polimorfo doble que puede presentar o no un elemento repetido de aproximadamente 3.0 Kb en una región corriente arriba de la secuencia codificada. Un elemento regulador negativo que suprime la actividad transcripcional fue identificado en la región 5' del gen de preproinsulina I. Este elemento, llamado "silenciador". Es un miembro de una familia de larga secuencia esparcidas repetitivas en el genoma de la rata (34, 35).

d) Gen de la insulina

La estructura del gen de la insulina está altamente conservada entre varias especies. Este gen consta de tres exones y dos intrones (37). El exón 1 se encuentra localizado en la región 5' no traducible del gen, el exón 2 contiene secuencias que codifican para el péptido señal, la cadena B de la insulina y una

parte del péptido C, mientras que el exón 3 codifica para el resto del péptido C, la cadena A de la insulina y secuencias 3' no traducibles. La secuencia y longitud de los intrones es muy variable entre especies. Sin embargo, la longitud relativa (el intrón 1 es mas corto que el 2) y las posiciones están altamente conservadas (37).

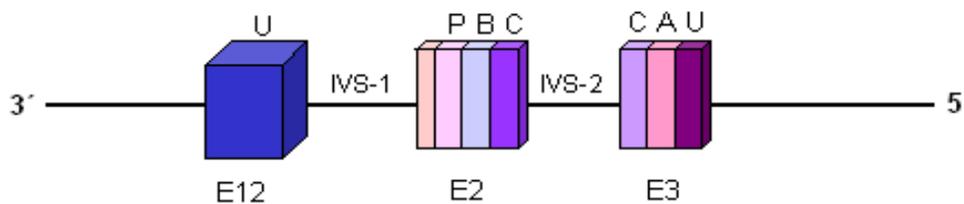


Fig. 10. Estructura del gen de la insulina. E1-E3: exones IVS-1 e IVS-2: intrones U: denota las extremidades 3' a 5' de la región del RNAm; P,B,C, y A: zonas que codifican los pre-péptidos (Clark, Docherty, 1992).

El gen de la insulina está presente como una sola copia en muchos vertebrados incluyendo al hombre. Sin embargo, en la rata y el ratón existen dos genes de la insulina no alélicos, el tipo I y II, que son sintetizados casi en la misma proporción; 52 y 48% respectivamente (36, 37). El intrón 2 está ausente en el gen tipo I de la rata y el ratón. Los genes I y II de preproinsulina de rata se encuentran separados uno del otro por 100,000 Kb en el cromosoma 1 (34). El gen de la insulina humana se localiza cerca del final del brazo corto del

cromosoma 11 (35).

5) Modelo de estudio sobre diabetes experimental

Los modelos animales utilizados en las investigaciones sobre la diabetes mellitus, ayudan al estudio y comprensión de los mecanismos patogénicos que conducen al entendimiento de esta enfermedad, acompañada de severa o moderada hiperglucemia, intolerancia a la glucosa y otras alteraciones metabólicas relacionadas con la misma. Estos modelos biológicos nos dan la oportunidad de explorar nuevos tratamientos y formas de prevenir esta enfermedad (38).

a) Ratón

La investigación de la diabetes mellitus en ratones no está muy estudiada ya que el modelo es muy difícil de manipular. Para este tipo de estudios se realiza inducción química de la diabetes con estreptozotocina así como el modelo de rata a una dosis diferente (dosis de 250 mg/100 g de peso por vía intravenosa) (41).

La diabetes en el ratón se caracteriza por una hiperglucemia moderada (< 20 mmol/L) y ausencia de cetosis, comúnmente se asocia a obesidad, hiperfagia, hiperplasia de las células β , hiperinsulinemia y resistencia a la insulina (39).

En diferentes estudios realizados se demostró el efecto de la diabetes mellitus en ratones y el análisis fisiológico se logró observar que el peso del ratón decrece con respecto a la cantidad de daño provocado por la estreptozotocina indujo químicamente diabetes mellitus. También se observa que el ratón presenta un cuadro de hipertensión provocada por esta patología (41).

6) Regulación de la esteroidogénesis del testículo

La regulación de la esteroidogénesis se lleva a cabo mediante la producción de andrógenos. Los andrógenos a todas aquellas moléculas que pueden provocar por su presencia dentro de un organismo vivo la diferenciación y maduración del órgano reproductor masculino (6). Éstos son producidos en los testículos como en los ovarios. Estos presentan un esqueleto esterano en común, al igual que los demás esteroides el esqueleto de colesterol (6).

a) Testosterona

Los principales órganos encargados en la síntesis de esteroides son la corteza adrenal, ovarios y testículos. Se conocen 6 enzimas P450 que están asociadas con la producción de hormonas esteroideas (42).

La testosterona es una hormona androgénica que es considerada una prohormona ya que para realizar su acción fisiológica o farmacológica debe reducirse en posición 5- α -dihidrotestosterona, que es la hormona activa. Sin embargo, este término es considerado tema de discusión en la actualidad. La testosterona es un andrógeno, esteroide derivado del ciclopentenperhidrofenantreno, que tiene 19 átomos de carbono, un doble enlace entre C4 y C5, un átomo de oxígeno en C3 y un radical hidroxilo (OH) en C17. Esta estructura es necesaria para el

mantenimiento de la actividad androgénica. Los estrógenos del testículo son producidos por la célula de Leydig pero también son sintetizados en otros tejidos a partir de andrógenos circulantes (42).

Las células de Leydig del testículo son el lugar de síntesis principal de la testosterona a partir de colesterol. También se puede sintetizar de la corteza suprarrenal y en las células tecales del ovario.

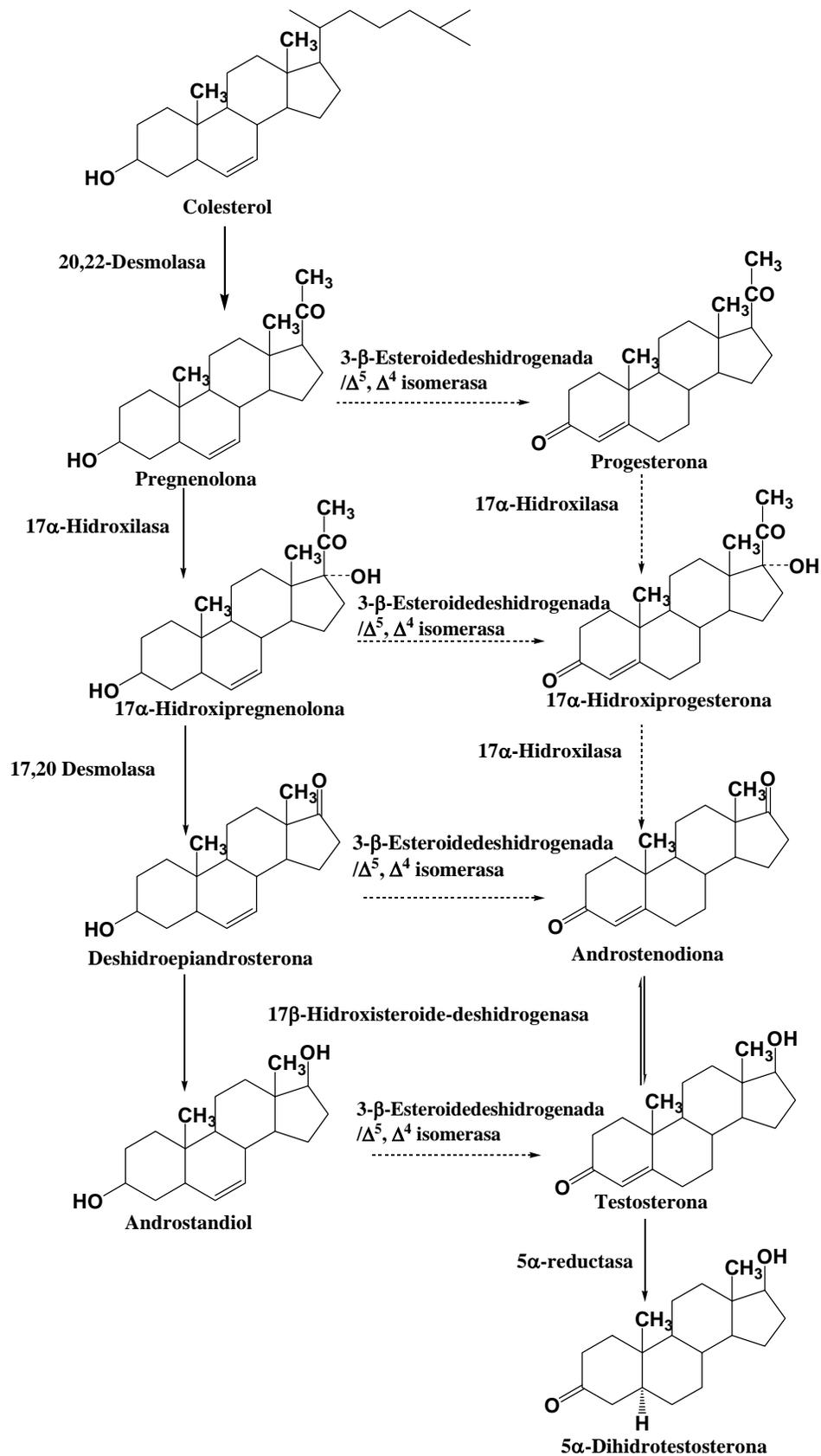


Fig. 11. Biosíntesis de andrógenos (Mathews, 2005)

b) AMPc

Existen receptores membranosos que activan a proteínas G y a enzimas como la adenilato ciclasa. Las proteínas G (*GTP-binding-protein*) se localizan en la zona citosólica de la membrana plasmática. Están compuestas por tres subunidades llamadas α , β y γ . La subunidad α posee actividad de GTPasa y contiene un GDP o un GTP, por su parte, el dímero β - γ mantienen a la proteína G unida a la membrana (46).

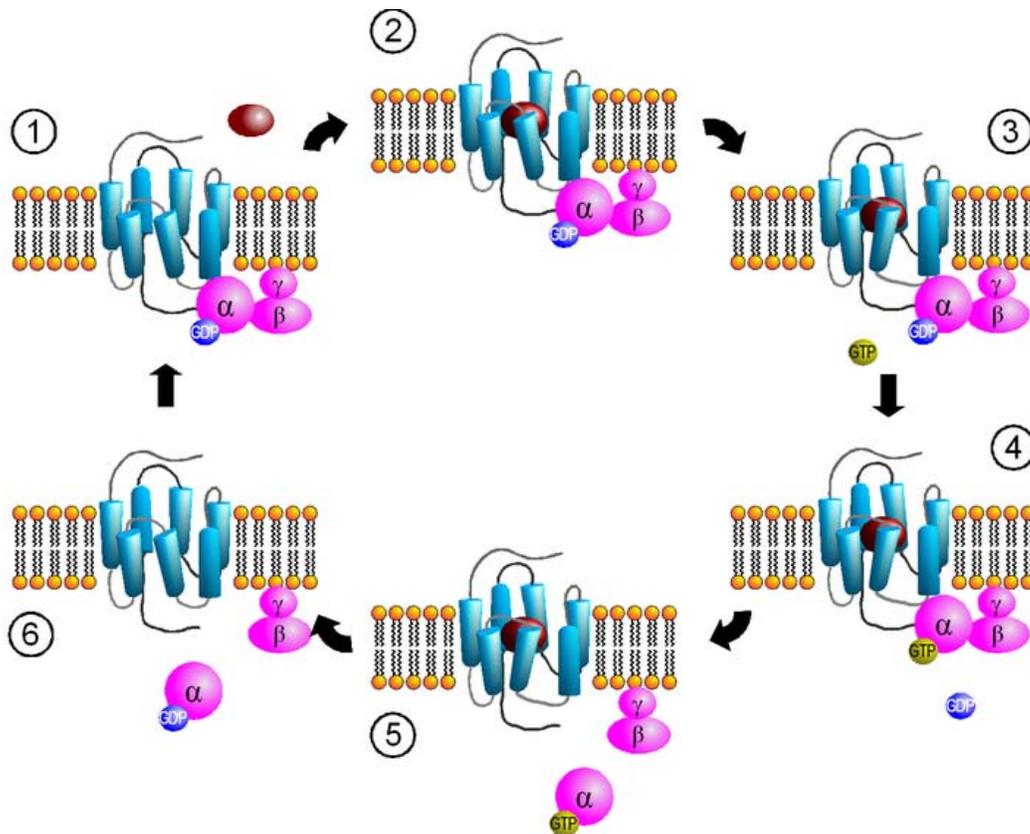


Fig. 12 Receptor de membrana que activa a proteína G, junto con las subunidades α , β y γ así como su activación con GTP y GDP (Kroeze, 2003).

El AMPc es producido por la adenilato ciclasa que es una enzima unida al lado interno de la membrana citoplasmática. Esta enzima convierte ATP en AMP cíclico en presencia de iones Mg^{2+} (32, 47). La concentración de AMPc en el citoplasma es a su vez controlada por una segunda enzima, la fosfodiesterasa que cataliza la hidrólisis de AMPc en 5'-AMP. El AMPc activa una proteína cinasa (24, 25). La proteína cinasa nativa está compuesta de dos subunidades: catalítica y regulatoria. La subunidad regulatoria suprime la actividad de la proteína cinasa nativa por su asociación con la subunidad catalítica. La activación de la proteína cinasa ocurre después que se ha liberado la subunidad catalítica de la subunidad regulatoria, por la unión del AMPc a la subunidad regulatoria de la proteína cinasa (32).

Existen dos vías iniciales de transmisión de señales a partir de proteína G. Una utiliza adenosina monofosfato cíclico (AMPc) y otras comprende la formación de dos moléculas, el diacilglicerol (DAG).

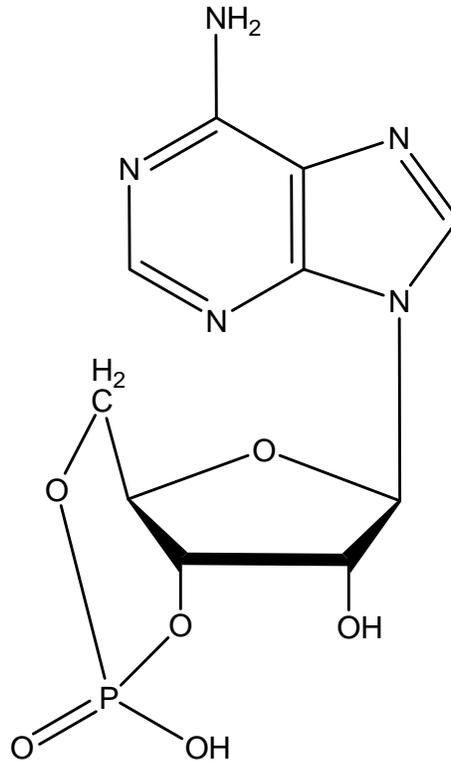


Fig. 13. Proyección molecular del AMPc (Hein, 1999).

c) Citocalacina B

La citocalacina B, un alcaloide procedente de los hongos, que se une a los filamentos de actina en el extremo (+), o de crecimiento. Esta reacción bloquea la unión de los monómeros de actina al filamento y conduce a la desagregación de este (48, 49).

Hay evidencias de que el ensamblaje y desmontaje de los filamentos de actina juega un papel importante en procesos de motilidad celular, tales como la locomoción ameboide, la fagocitosis, la citocinesis y la extensión y retracción de

varias protuberancias celulares, tales como las microvellosidades y los axones neuronales.

Estas evidencias se obtuvieron por la utilización de fármacos que intervienen en la agregación de la actina. Por ejemplo la citocalacina B, que paraliza la polimerización de la actina (50). El ATP acelera la polimerización de la actina activando a la actina G para que se una preferentemente a un extremo determinado del filamento de actina en crecimiento. Finalmente, el ATP se hidroliza, pero no antes de que la polimerización haya concluido. Este proceso vectorial asegura una cierta concentración crítica de actina G, a la cual las unidades monoméricas activadas se unen predominantemente a su extremo preferido del filamento de actina, que las unidades monoméricas se disocian predominantemente del extremo opuesto a la misma velocidad del filamento (51).

En estas condiciones, el filamento de actina ni se alarga ni se acorta; alcanza más bien un estado estacionario en el que, gracias a este proceso que podríamos llamar de escalera mecánica, las unidades monoméricas de actina son trasladadas continuamente de un extremo al otro del filamento de actina (52).

Otro de los usos que presenta la citocalacina B es inhibir el transporte de glucosa a nivel membranal (53, 54).

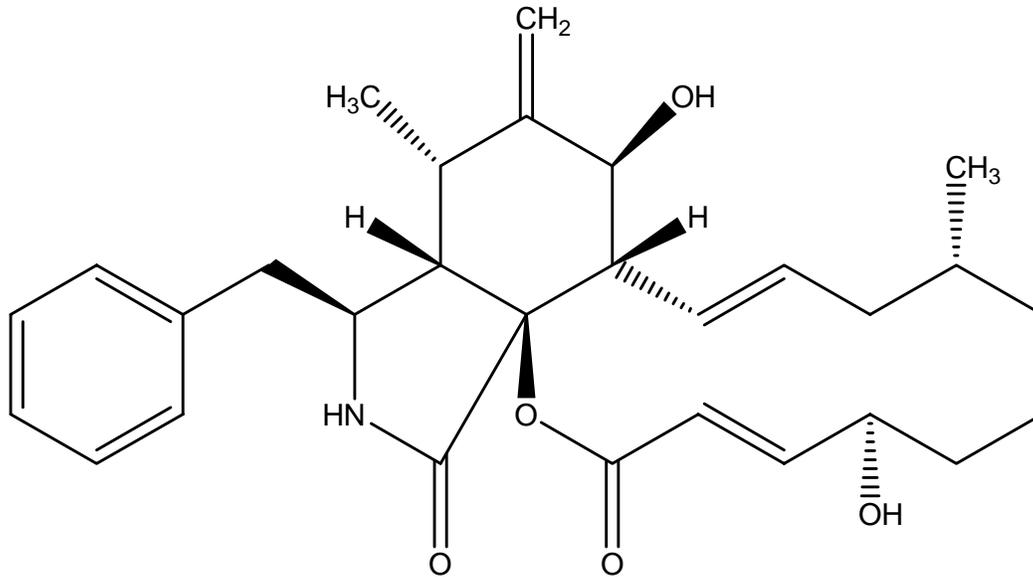


Fig. 14. Imagen molecular de Citocalacina B (Voet, 2001).

d) D-Glucosa

Los glúcidos son compuestos orgánicos que están formados por los bioelementos carbono, hidrógeno y oxígeno. También reciben el nombre de carbohidratos debido a que su fórmula mínima es $(\text{CH}_2\text{O})_n$, es decir, como si cada carbono estuviera hidratado, así como azúcares o sacáridos. Estas moléculas son las sustancias más abundantes de la tierra (64). La glucosa es el compuesto orgánico más abundante de la naturaleza (57). El monosacárido más importante de los conocidos probablemente es la D-Glucosa, la cual aparece como tal en la sangre de todos los animales y en la savia de las plantas; es también la unidad estructural de prácticamente todos los polisacáridos. La D-(+)-glucosa es uno de los compuestos más importantes para los seres vivos, incluyendo a seres humanos (25, 57). La D-glucosa en solución existe en gran parte en forma de compuesto

cíclico en equilibrio con una pequeña cantidad de la correspondiente forma lineal (57).

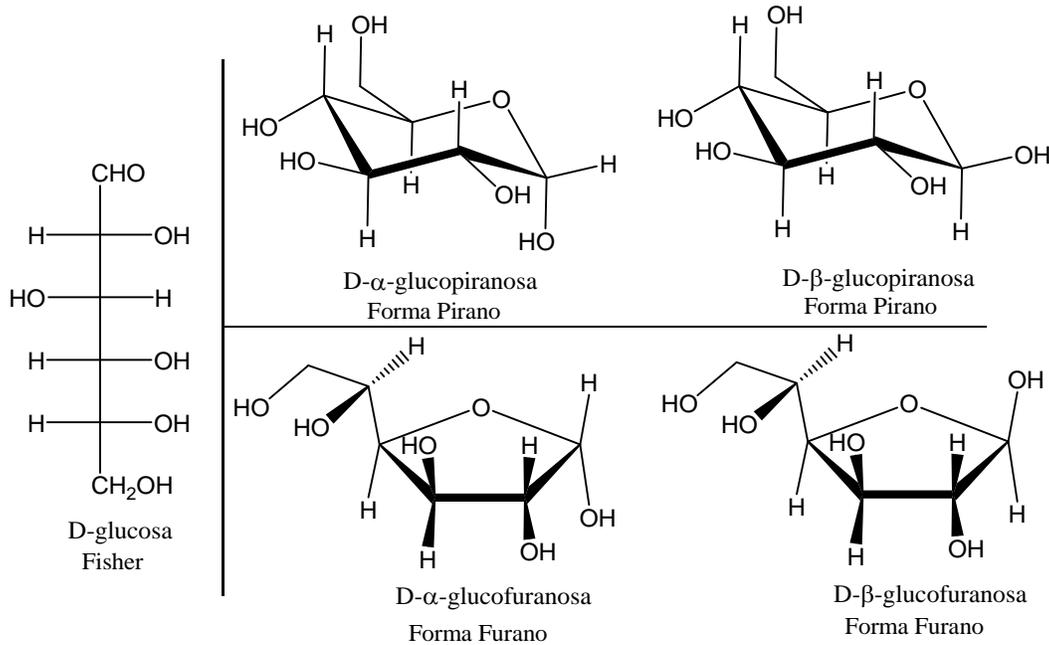


Fig. 15. Proyecciones de la glucosa en su forma Fisher, Pirano y Furanosa (Stanley, 2000).

e) Transportadores de Glucosa

La existencia y naturaleza de transportadores que facilitan la difusión de glucosa se conoce desde hace muchos años. Sin embargo, hasta el final de la década de los 80 se conocía poco de estos transportadores a escala molecular (63). La aparición de pruebas con anticuerpos específicos para los transportadores y el ADN para las diferentes isoformas de la familia de transportadores de glucosa (GLUT) ha llevado a la reaparición de estudios del transporte de la glucosa y su

regulación (65). Los primeros estudios del movimiento *in vivo* fueron realizados por transferencia difusional simple (64). El uso de métodos de perfusión *in vitro* confirmó la naturaleza de la transferencia de glucosa mediada por transportadores así como la selectividad y estereoespecificidad de estos (64).

Se ha demostrado que los transportadores de glucosa en varias células y tejidos, están regulados por una diversidad de factores, los más comunes son la glucosa, substratos glucolíticos, insulina e IGF-1(66).

Cuadro 2. Transportadores de glucosa (GLUT) y sitio de expresión (Reyna-Villasmil, 2005)

Transportador	Sito de expresión
GLUT1	Placenta, cerebro, riñón, colon y músculo esquelético.
GLUT2	Hígado, intestino delgado y células-β.
GLUT3	Muchos tejidos, incluyendo cerebro, placenta y riñón.
GLUT4	Músculo esquelético, cerebro y tejido adiposo.
GLUT5	Transporte de fructosa-intestino delgado (yeyuno).
GLUT6	No expresado por que codifica para un pseudogen.
GLUT7	Hígado.
GLUT8/GLTUX1	Testículos.
GLUT9	Cerebro y leucocitos.
GLUT10	Hígado y páncreas.
GLUT11	Músculo esquelético y cerebro.
GLUT12	Músculo esquelético y tejido adiposo.

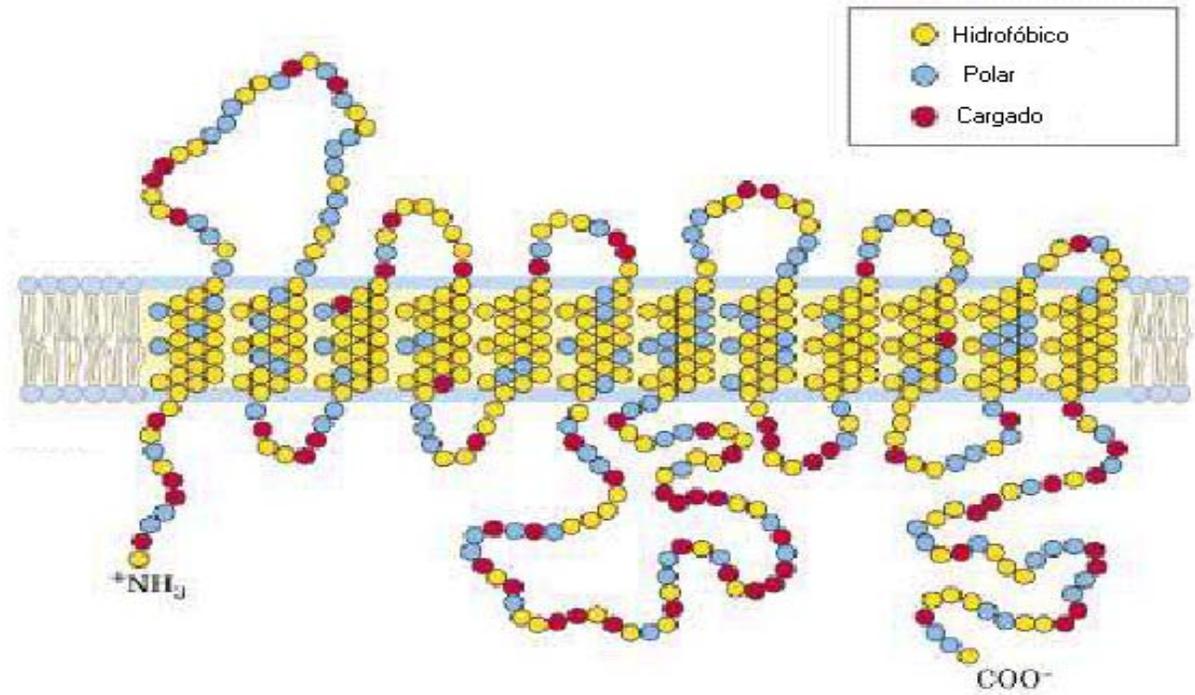


Fig. 16. Representación gráfica de un transportador (GLUT) (Wandel, 1996)

III. Planteamiento del problema e hipótesis

La diabetes es una enfermedad en la que las células β del páncreas dejan de producir insulina. La carencia de esta hormona en los adultos de varias especies aumenta los niveles de glucosa provocando una hiperglicemia, e induce una inhibición de la producción de testosterona. Sin embargo, se desconoce si la glucosa regula la producción de testosterona de la célula de Leydig en la fase embrionaria. En un estudio en la rata adulta se vió que la producción de testosterona disminuía al tratar estas células con citocalacina B, aunque no se sabe si los filamentos de actina jueguen un papel importante en la producción de testosterona en la fase embrionaria del ratón.

Hipótesis

- ❖ La glucosa alta inhibiría la producción de testosterona de las células de Leydig del ratón a los 18 d.g.
- ❖ La citocalacina B inhibiría la síntesis de testosterona de las células de Leydig a los 18 d.g.
- ❖ La insulina aumentaría la producción de testosterona de las células de Leydig a los 18 d.g.

IV. Objetivos

- Evaluar el efecto de la D-glucosa alta (50 mM) en la producción de testosterona de la célula de Leydig en los testículos fetales de ratón a los 18 días de gestación.

- Estudiar el efecto de la insulina de la célula de Leydig en los testículos fetales de ratón a los 18 días de gestación.

- Analizar el efecto de la citocalacina B de la células de Leydig en la producción de testosterona en las células de Leydig de los testículos fetales de ratón en la edad arriba mencionada

VI. Materiales y métodos

a. Generación de hembras preñadas

Se utilizaron ratones y ratonas de 10 semanas de edad de la cepa CD-1 y se puso un ratón con cinco ratonas. El día que se observó el tapón vaginal se denominó día cero de la gestación. Se emplearon hembras gestantes de 18 días de gestación de la cepa CD-1 y se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas en cajas estériles con sani-chips, con periodos de 12 horas de luz–oscuridad y temperatura de 22–23°C. Las ratonas se alimentaron con diet mouse food of harlan y agua esterilizada acidificada a (pH 2.5), filtrada por osmosis inversa y esterilizada en autoclave.

b. Obtención de embriones

En un ambiente estéril las hembras se sacrificaron por dislocación cervical y se realizó un corte en forma de V en la región ventral. Se separó el útero, se sacaron los embriones en una caja de Petri y se separó la región anterior de la región posterior mediante el uso del bisturí. Se obtuvieron los testículos de los embriones exponiendo la parte dorsal interna del embrión y se colocaron en cajas Petri estériles con un medio de cultivo M199, en un ambiente estéril de acuerdo al método descrito (60).

c. Aislamiento de células de Leydig

En un ambiente estéril las gónadas se transfirieron en un tubo Eppendorf estéril con 500 µL, de medio de cultivo DMEM. Se les extrajo la mayor cantidad posible

de residuos de tejido del medio de cultivo. Se lavaron dos veces con 500 μ L, de PBS estéril atemperado de acuerdo al método descrito (60). El tejido obtenido se incubó 4 minutos en una solución proteolítica que contiene: 995 μ L. de PBS libre de calcio y magnesio filtrado, 20 μ L de colagenasa (0.2 mg/mL). Después el tejido se disgregó manualmente utilizando una pipeta siliconizada hasta observar que el tejido se disgregó completamente. Posteriormente, se detuvo la reacción proteolítica con un inhibidor de tripsina (GIBCO) al 0.2%. Se agregaron 390 μ L de PBS estéril atemperado y se centrifugó por 15 min. a 2,012g. Se decantó el sobrenadante de un solo golpe y el tejido recuperado por centrifugación se lavó dos veces con PBS estéril, atemperado y entre cada lavado se centrifugó dos min. a 2,012 g. Las células recuperadas por la centrifugación se resuspendieron en un mililitro de PBS y se dejaron reposar por 15 min. en una gradilla a temperatura ambiente para que se separaran por gravedad los tubos que contienen las células de Sertoli que se precipitan al fondo y las células de Leydig se mantienen en la superficie. Se separó el sobrenadante que contiene las células de Leydig, con una pipeta siliconizada, se colocaron en tubos de Eppendorf y se centrifugaron a 2,012 g por 15 min. Las células de Leydig se permanecieron en el fondo del tubo, se lavaron dos veces con 500 μ L de PBS y se centrifugaron entre cada lavado por 2 min. a 2,739 g. El tejido recuperado, se incubó con una solución de tripsina al 0.12% por dos minutos más 60 segundos de disgregación manual. La reacción de la tripsina con 110 μ L. de inhibidor de tripsina al 0.2 % agitando levemente. Se centrifugó el tubo y las células se lavaron a 2,739 g dos minutos. Se resuspendió

el paquete en 500 μ L de medio de cultivo DMEM suplementado con penicilina y estreptomicina.

d. Determinación del número de células

Después de la purificación celular se realizó el conteo de las células viables para su cultivo. Este se realizó empleando una cámara de Neubauer, para lo cual se preparó una solución 1:1 de la suspensión celular y 10 μ L del colorante azul de evans al 0.2% (v/v). Se tomaron 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

Purificadas las células de Leydig y conociendo el número de células que se tienen por mililitro se realizó el cálculo para obtener un volumen en el cual se tuviera una cantidad de 5.0×10^4 células que fueron sembradas para cada pozo. Se emplearon cajas de 32 pozos (Nuclon); y se realizaron dos grupos por experimento, el control y el experimental. El primero correspondió a adicionar medio eagle modificado dulbecco (1X) sin glucosa como control en todos los caso. Al primer grupo experimental se le adicionó glucosa a una concentración de 50 mM. El segundo grupo experimental se trato con una concentración de 10 mM de citocalacina B inhibidor del transporte de glucosa. El tercer grupo experimental con

100 ng/mL de insulina todo en un volumen final de 500 μ L. Las condiciones de incubación fueron siguientes: 24 h con 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C.

f. Extracción de esteroides

Se empleo el medio recuperado del cultivo celular de cada fecha, tanto los controles como los experimentales. Se tomó 1 mL de este medio y se le agregó 9 mL de éter etílico 1:10 en tubos de ensayo. Se agitaron en vórtex por tres minutos. Posteriormente la fase acuosa se congela a -60°C, colocando los tubos en hielo seco con alcohol absoluto, mientras que la fase orgánica fue decantada en tubos y evaporada en baño María a 40°C. Posteriormente se lavaron los tubos con 200 μ L de éter resbalándolo por el tubo, tres veces para bajar y concentrar los esteroides, evaporando este a baño María. Se lavo nuevamente con 100 μ L de éter resbalándolo 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 μ L de medio de cultivo que se emplearon para el ensayo de RIA.

g. Radioinmunoanálisis

En los tubos debidamente etiquetados, se añadieron 50 μ L 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 μ L de las muestras control y experimental a sus respectivos tubos. A los tubos para unión inespecífica se les adicionaron 150 μ L del estándar de testosterona de 0 ng/mL. Se agregaron 500 μ L de testosterona marcada con I¹²⁵ a

cada tubo. Posteriormente se añadieron 100 μ L del anticuerpo anti-testosterona a cada tubo, excepto al de unión específica. 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 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron los tubos durante 20 minutos a 2,012 g, se decantó todos los tubos y se secaron con papel adsorbente 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 testosterona RIA DSL-4100 medidores médicos industriales.

VII. Resultados

Regulación de testosterona en el testículo fetal

a) Establecimiento de la curva estándar

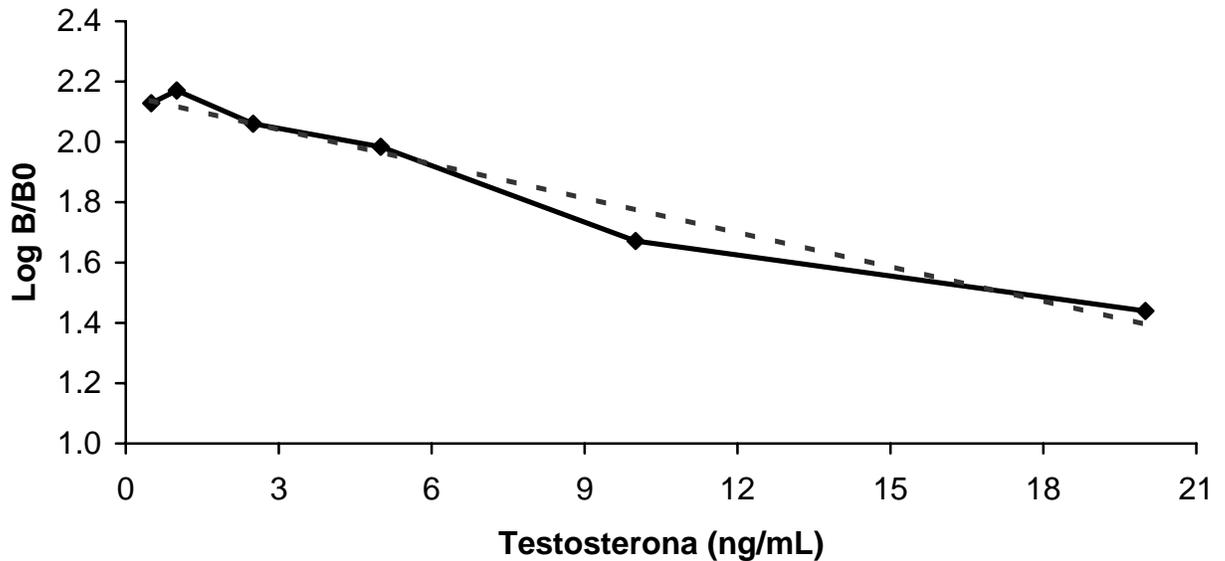


Fig. 17. Curva estándar de testosterona

La ecuación de la recta empleada para la cuantificación de testosterona por radioinmunoanálisis:

$$Y = -0,0382x + 2,11569$$

La correlación fue de: $R^2 = 0,9623$

b) Regulación de la producción de testosterona

Los resultados obtenidos sobre la regulación de la glucosa en la producción de testosterona a los 18 d.g. mostró una regulación negativa en la producción de este andrógeno con respecto al control. La cantidad de testosterona registrada para el grupo control fue de 35.2 ng/mL y para el grupo experimental fue de 19.2 ng/mL.

Las diferencias encontradas entre el grupo control y el experimental fueron significativas con la prueba “t” de student a $p < 0.05$ (Fig. 18).

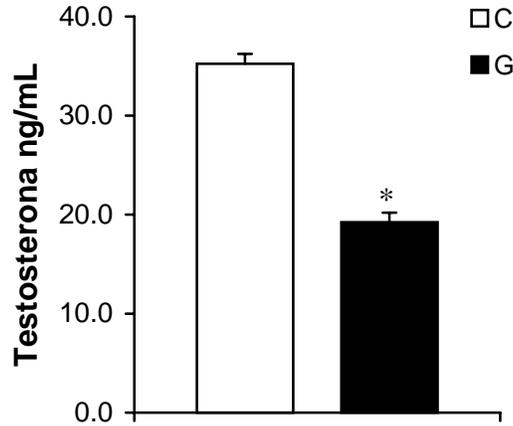


Fig. 18. Efecto de la glucosa en la síntesis de testosterona a los 18 d.g. Las barras muestran la media y el error estándar. * $p < 0.05$; $n = 11$.

i. Efecto de la citocalacina B

Los resultados obtenidos con la administración de citocalacina B sobre la esteroidogénesis a los 18 d.g. mostraron que hay una regulación negativa sobre la síntesis de testosterona. Esto se reflejó en la disminución de la producción de este andrógeno con respecto al control. La cantidad de testosterona registrada para el grupo control fue 30.4 ng/mL y para el grupo experimental fue de 10.7 ng/mL. Las diferencias encontradas entre el grupo control y el experimental fueron significativas con la prueba “t” de student a $p < 0.05$ (Fig. 19).

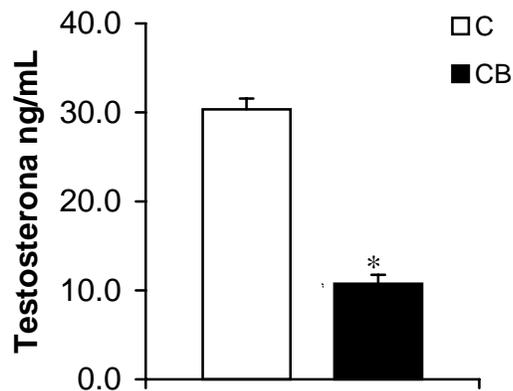


Fig. 19. Efecto de la citocalacina B en la síntesis de testosterona a los 18 d.g. Las barras muestran la media y el error estándar. * $p < 0.05$; $n = 9$.

ii) Papel de la insulina

Los resultados obtenidos en la regulación de la producción de andrógenos por insulina a los 18 d.g. mostraron que la insulina está actuando como un regulador negativo en este proceso. La cantidad de testosterona producida en el grupo control con respecto al grupo tratado con insulina es mayor. Se obtuvo una concentración de 34.23 ng/mL y para el control fue de 28.90 ng/mL para el grupo experimental. Las diferencias encontradas entre el grupo control y el experimental fueron significativas con la prueba “t” de student a $p < 0.05$ (Fig.20).

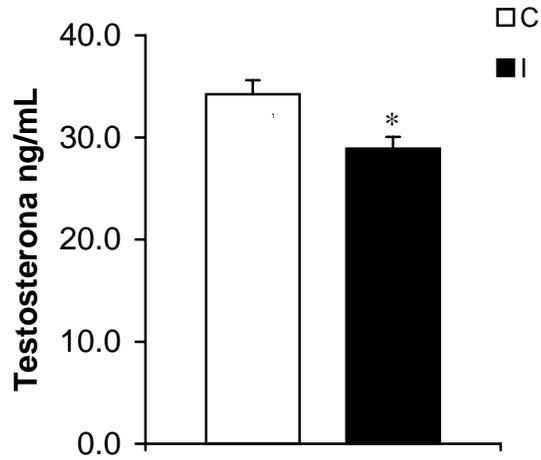


Fig. 20. Efecto de la Insulina en la síntesis de testosterona a los 18 d.g. Las barras muestran una media y el error estándar. * $p < 0.05$; $n = 8$.

iii. Análisis comparativo

La figura 21. resume los tratamientos descritos en la sección previa.

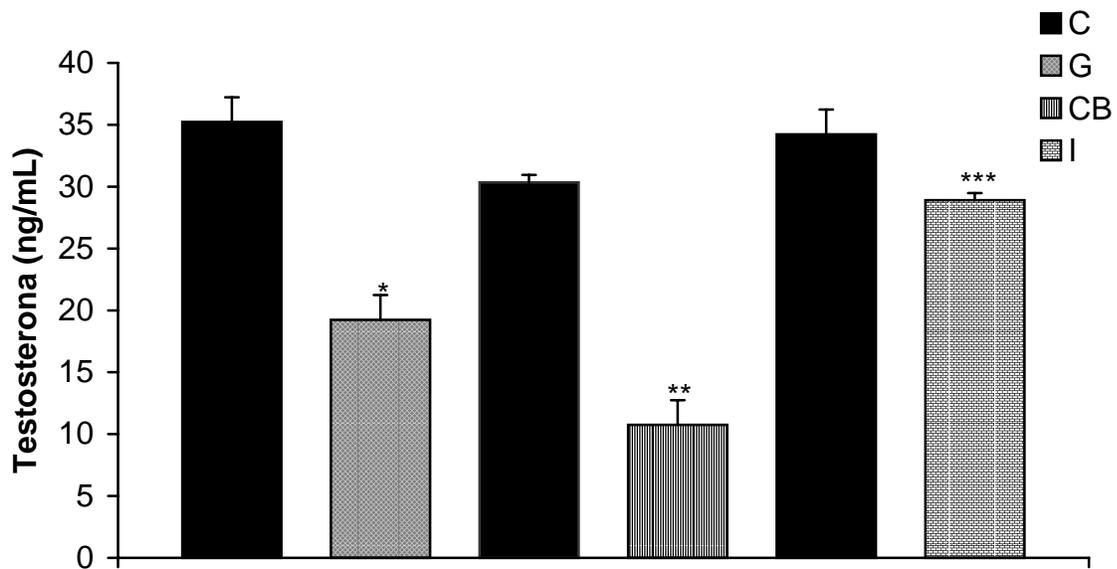


Fig.21. Regulación de la síntesis de testosterona por glucosa, insulina, citocalacina B y citocalacina B/insulina. Las barras muestran la media y error estándar. control vs glucosa * $p < 0.05$; control vs citocalacina B ** $p < 0.05$; control vs insulina *** $p < 0.05$. control vs insulina/citocalacina B **** $p < 0.05$;

C = control, G = Glucosa, CB = Citocalacina B, I = Insulina.

VIII. Discusión

En el presente trabajo se estudio el efecto de la glucosa alta, insulina y citocalacina B, sobre la producción de testosterona en células de Leydig del testículo de ratón *Mus musculus* en las etapa fetal a los 18 d.g.

Se ha descrito que la regulación de la producción de testosterona en la célula de Leydig adulta ocurre por varios factores entre ellos la glucosa (63). Numerosas investigaciones muestran que el incremento de los niveles glucosa en las células de Leydig en los hombres diabéticos provoca una regulación negativa en la síntesis de testosterona (60); la síntesis de esta hormona se lleva en las células de Leydig del testículo. En la presente tesis evaluamos el efecto de glucosa 50 mM, simulando las condiciones presentes en la diabetes mellitus (39). Los resultados experimentales muestran que la glucosa alta inhibió la síntesis de testosterona de la célula de Leydig del testículo fetal. Esta bien documentado que la energía que las células emplean procede del rompimiento de la glucosa en las diferentes rutas metabólicas (2). Se ha descrito que la esteroidogénesis es un proceso metabólico activo que requiere energía para llevarse a cabo. Esta es necesaria en forma de ATP, es un compuesto de alta energía que es generado en la glucólisis por la utilización de una molécula de glucosa (57). Considerando que la concentración de glucosa en el medio de cultivo es enorme, es probable que esta cantidad tan grande de combustible en la célula de Leydig produzca una cantidad muy grande de ATP; lo cual llenará las reservas de la célula. Por lo tanto, alta concentración de ATP inhibiría la glucólisis. Se sabe que el ATP es un potente inhibidor de esta ruta. Para que no ocurra una inhibición, el ATP debe permanecer en su forma

complejada con el metal Mg-ATP; para la conversión de glucosa a glucosa-6-fosfato que es un intermediario en esta ruta (25). Las altas concentraciones de ATP la inhiben, debido a esto ya no se generará más ATP, necesario para la producción de testosterona en la célula de Leydig (25).

Por otro lado, si consideramos un proceso aldostérico, la cantidad tan grande de glucosa en el medio provoca que los transportadores de glucosa (GLUT) sean inhibidos (48). Si éste está inhibido, la producción de ATP necesario para esta actividad se detiene (25).

Por otra parte se ha demostrado que la citocalacina es un inhibidor del transporte de glucosa independiente de sodio en las células (25). También actúa en el citoesqueleto, inhibiendo la polimerización de β -actina provocando así que el transporte de glucosa endógena se afecte (48). Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que la producción de testosterona endógena en las células cultivadas *in vitro* disminuye por la adición de citocalacina B (inhibidor del transporte de glucosa). La citocalacina B inhibe el transporte activo impulsado por un gradiente de iones tales como $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)\text{-ATPasa}$. Estos transportes utilizan la energía libre de la hidrólisis del ATP para generar gradientes de potencial eléctrico a través de la membrana. Debido a que la fuente inmediata de energía para el transporte de glucosa es el gradiente de Na^+ , para lo cual cuando se unen en la superficie ambos sustratos; la proteína transportadora cambia de conformación inhibiendo el transporte de glucosa (25). Además, si tomamos en cuenta que la glucosa presente en la célula es la endógena, al adicionar la citocalacina B, esta inhibirá la polimerización de β -actina provocando así que la glucosa endógena no

logre llegar a las mitocondrias presentes en las células de Leydig. De tal forma que el ATP necesario para la síntesis de testosterona no será suficiente. Sin embargo, en los resultados obtenidos se ve que hay una ligera producción de testosterona, la cual podría deberse a que este proceso no se ve inhibido en su totalidad hasta que el equilibrio y la homogeneidad se alcanza en todo el medio. Por lo tanto existe una pequeña cantidad de células de Leydig que probablemente seguirían produciendo testosterona.

La esteroidogénesis también necesita de la energía almacenada como glucógeno. Estudios realizados *in vivo* en el grupo de la Dra. Villalpando en los que se indujo la diabetes experimental en la fase embrionaria con Streptozotocina demuestran que la falta de insulina provoca incremento de glucosa circulante, lo cual afecta la biosíntesis de testosterona desde etapas muy tempranas a los 16 d.g. (57).

En condiciones normales los testículos comienzan a sintetizar testosterona desde etapas muy tempranas 16 d.g. Estos estudios confirman el efecto que tienen los niveles de glucosa alta, en la secreción de esteroides (57).

La insulina es una hormona de naturaleza proteicas, compuesta dos cadenas (A y B) unidas por dos puentes disulfuro (25). Esta hormona es sintetizada y secretada por las células β de los islotes de Langerhans en el páncreas en respuesta al incremento en los niveles altos de glucosa circulante (15). El receptor de insulina se clasifica dentro de aquellos receptores con actividad de tirosina cinasas y se expresa en la superficie de la membrana celular (15). La insulina regula la expresión de diferentes tipos de transportadores de glucosa tipo GLUT presentes en la membrana del testículo de ratón (45). Al estar presente la insulina en el

medio, se esperaría que incremente la cantidad de testosterona producida por las células de Leydig debido a que los transportadores de glucosa se verían activados por la presencia de esta hormona. Sin embargo, encontramos que la insulina provocó la disminución de la concentración de testosterona. Esto puede deberse a que a esta edad se encuentran altos los niveles de expresión del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (8). Estudios realizados en cultivos celulares en la rata, han demostrado que este es un inhibidor de la esteroidogénesis (8). Considerando lo anterior se puede explicar por que al adicionar la insulina al medio no tenemos concentraciones de testosterona superiores al mostrado en el control. Sin embargo, podemos hacer notar que la testosterona cuantificada para este grupo fue superior a todos los demás experimentales.

La insulina es una hormona secretada por la células β del páncreas, la cual es la encargada de la señalización que se lleva a cabo para desencadenar el transporte activo de glucosa al interior de la célula (25). Y sabiendo que la citocalacina inhibe el transporte activo impulsado por un gradiente de iones tales como $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -ATPasa provocando que la producción de testosterona se vea interrumpida (25). En resumen, los resultados muestran que la glucosa alta inhibe la producción de testosterona en las células de Leydig a los 18 d.g., con esto se acepta la primera hipótesis propuesta. También los resultados muestran que la citocalacina B inhibe el transporte de glucosa endógena, lo cual provocó la inhibición de la síntesis de testosterona, apoyando con esto la segunda hipótesis propuesta. Por último, los resultados muestran que la insulina regula negativamente la producción de testosterona, refutando así, la tercera hipótesis planteada.

IX. Conclusiones

- ❖ La glucosa en concentraciones altas produce una inhibición de la producción de testosterona en la célula de Leydig del testículo fetal del ratón *Mus musculus* a los 18 d.g.

- ❖ La citocalacina B regula negativamente en la síntesis de testosterona en las células de Leydig fetales del ratón en la edad arriba mencionada.

- ❖ La insulina regula negativamente la producción de testosterona de la célula de Leydig de ratón a los 18 d.g.

Apéndice

1. Solución PBS (1:10)

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

2. Medio DMEM suplementado

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

IX. Bibliografía

- 1) Mittwoch U . 1967. Sex differentiation in mammals. *Nature* 214: 554-556.
- 2) Nordqvist K. 1995. Sex differentiation-gonadogenesis and novel genes, *Int J Dev Biol* 39: 727-736.
- 3) Tilmann C, Capel B. 2002. Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. *Recent Prog Horm Res* 57: 1-18.
- 4) Merchant Larios H. 1991. Gametogénesis. En: Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción. Editorial Porrúa México, pag.11-27.
- 5) Merchant Larios H. 2004. El sexo gonadal. En: Memorias del congreso conmemorativo del jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas. 1:451-461.
- 6) Lagman S. 2000. Embriología Médica. Editorial Panamericana, Bogotá, Colombia, pag. 3-32.
- 7) Berne RM, Levy M. 2003. Fisiología. Editorial Elsevier Science, Madrid, España, pag.680-688.
- 8) Godi Y, Wylie CC. 1991. TGF- β 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cell in culture, *Dev Sci* 113: 1451-1457.
- 9) Koopman P. 1999. Sry and Sox9: mammalian testis-determining genes. *Cell Mol Life Sci* 55: 839-856.
- 10) Moore K. 1999. Embriología Clínica. Editorial Porrúa México, DF., pag. 459-481.
- 11) Merchant Larios H. 2003. Diferenciación celular. En: Biología Celular y Molecular. Editorial Prentice Hall, México DF., pag.713-815.
- 12) Scott G. 2003. Sex determination. En: Development Biology. Sinauer Associates, Incorporations, Sunderland Massachusetts, pag.547-559.
- 13) Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351:117-121.
- 14) Villalpando Fierro I. 2001. Sinfonía de genes gonadales. *Ciencia y Desarrollo*, pag. 32-41.

- 15) Carlson B. 2004. Embriología humana y biología del desarrollo. Editorial Mc Graw Hill, México D.F., pag.685-694.
- 16) Capel B. 1996. The role of Sry in cellular events underlying mammalian sex determination en: *Current Topics Dev Biol* 32: 1-11.
- 17) de Santa Barbara P, Moniot B, Poulat F, Berta P. 2000. Expression and subcellular localization of *SF-1*, *SOX9*, *WT1*, and *AMH* proteins during early human testicular development, *Dev Dyn* 217: 293-298.
- 18) Cameron FJ, Sinclair AH. 1997. Mutation in *SRY* and *SOX9*: testis-determining genes. *Human Mutation* 9: 388-395.
- 19) Yao HH, Capel B. 2005. Temperature, genes and sex: a comparative view of sex determination in *Trachemys scripta* and *Mus musculus*. *J Biochem (Tokyo)* 138: 5-12.
- 20) Arango NA, Lovell-Badge R, Behringer RR. 1999. Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: *In vivo* definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* 99: 409-419.
- 21) Parker KL, Schimmer BP. 2002. Genes essential for early events in gonadal development. *Ann Med* 34: 171-178.
- 22) Shen WH, Moore CC, Ikeda Y, Parker KL, Ingraham HA. 1994. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the müllerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* 77: 651-661.
- 23) Villapando Fierro I. 2001. Péptidos en la biología del desarrollo de los mamíferos. UAM-Puis, pag.121-143.
- 24) Karp G. 2003. Cell and molecular biology concepts and experiments. Editorial Harcourt Academic Press, New York, USA, pag. 567-580.
- 25) Voet V. 2001. Bioquímica. Editorial Reverté, México D.F. pag. 768-776.
- 26) Matthews C. 2005. Bioquímica. Editorial Pearson Addison Wesley. México, D.F., pag. 849-858.
- 27) Avruch J. 1998. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem* 182: 31-48.

- 28) Hatakeyama H, Kikuchi A, Yamato M, Okano T. 2005. Influence of insulin immobilization to thermoresponsive culture surfaces on cell proliferation and thermally induced cell detachment. *Biomaterials* 26: 5167–5176.
- 29) Hennige AM, Häring HU. 2004. The mouse as a model of insulin signaling. *Drug Discovery Today* 1: 199-204.
- 30) Duleba AJ, Spaczynski RZ, Olive DL. 1988. Insulin and insulin-like growth factor I stimulate the proliferation of human ovarian theca-interstitial cells. *Biochem J* 256: 847-851.
- 31) Rose K, Savoy LA, Muir AV, Davies JG, Offord RE, Turcatti G. 1988. Insulin proteinase liberates from glucagon a fragment known to have enhanced activity against Ca^{2+} + Mg^{2+} -dependent ATPase. *Biochem J*, 256: 847-851.
- 32) Metzler D. 2000. Biochemistry. Editorial Harcourt Academic Press, San Diego, E.U., pag.491-450.
- 33) Lin T, Haskell J, Vinson N, Terracio L. 1986. Characterization of insulin and insulin-like growth factor I receptor of purified Leydig cells and their role in steroidogenesis in primary culture: a comparative study. *Endocrinology*, 119: 1641-1647.
- 34) Soares B, Henderson A, Karathanasis S, Williams FM, Spector TD. 1985. RNA-mediated genes duplication: the rat preproinsulin 1 genes is a functional retroposon. *J Mol Cell Biochem* 32: 231-240.
- 35) Lakshmikumaran MS, D'Ambrosio E, Laimins LA, Lin DT, Furano AV. 1985. Long Interspersed repeated DNA (LINE) causes polymorphism at the rat insulin 1 locus. *Mol Cell Biol* 5: 2197-2203.
- 36) Wentworth BM, Schaefer IM, Villa-Komaroff L, Chirgwin JM. 1986. Characterization of two nonallelic genes encoding mouse preproinsulin. *J Mol Evol* 23: 305-312.
- 37) Lomedico PT, Rosenthal N, Kolodner R, Efstratiadis A, Gilbert W. 1980. The structure and evolution of two nonal allelic rat preproinsulin genes, *Ann Acad Sci (NY)* 343: 425-432.

- 38) Huguez HB, Clerk LH, Vincent MA, Barrett E, Lankford MF, Lindner JR. 2005. Animals of experimentation like models diabetes mellitus. *Rev Sci Tech* 26: 443-449.
- 39) Sadler E, Weiner M, Buterbaugh GG. 1983. Effect of streptozotocin-induced diabetes on tryptophan oxygenase activity and brain tryptophan levels in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 42: 37-50.
- 40) Goyal RK, Satia MC, Bangaru RA, Gandhi TP. 1998. Effect of long-term treatment with enalapril in streptozotocin diabetic and DOCA hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 32: 317-322.
- 41) Zapata-Sirvent RL, Martinelli A, Basso I, González C, Carreta M , Pinate S, Isaac JP, Pifano E. 1988. Tratamiento de la diabetes mellitus insulino dependiente con alo y xenotrasplante de islotes de Langerhans encapsulados y sin inmunosupresión: modelo en roedores. *GEN* 42: 70-76.
- 42) Kelly E. 1998. Hormones. Editorial Hermann Publishers in Arts and Science, New York, E.U., pag.1-21.
- 43) Fuller JH, Salter A Mattock MB. 1982. Insulin stimulated the generation from hepatic plasma membranes of modulators derived from an isositol glycolipid. *J Ann Diabetol* 83: 203-210.
- 44) Mohan C. 1994. Cytokines, growth factors and hormones. Editorial Panamericana, San Diego, C.A., pag.1-2.
- 45) Cruz M, García-Macedo R, García-Valerio Y, Gutiérrez M, Medina-Navarro R, Duran G, Wachter N, Kumate J. 2004. Señales intracelulares que intervienen en el control de la glucosa. *Diabetes Care* 27: 1451-1453.
- 46) Kroeze WK, Sheffler DJ, Roth BL. 2003. G protein-coupled receptors at a glance. *J Cell Sci* 116: 4867-4869.
- 47) Wandel S, Buchs A, Schürmann A, Summers SA, Powers AC, Shanahan MF, Joost HG. 1996. Glucose transport activity and ligand binding (cytochalasin B, IAPS-forskolin) of chimeric constructs of GLUT2 and GLUT4 expressed in COS-7-cells. *Biochem Biophys Acta* 1284: 56-62.

- 48) Gottschalk I, Lundqvist A, Zeng CM, Hägglund CL, Zou SS, Brekkan E, Eaker D, Lundahl P. 2000. Conversion between two cytochalasin B-binding states of the human GLUT1 glucose transporter. *Eur J Biochem* 267: 6875-6882.
- 49) Faff L, Nolte C. 2000. Extracellular acidification decreases the basal motility of cultured mouse microglia via the rearrangement of the actin cytoskeleton. *Brain Res* 853: 22-31.
- 50) da Costa SR, Okamoto CT, Hamm-Alvarez SF. 2003. Actin microfilaments et al. --the many components, effectors and regulators of epithelial cell endocytosis. *Adv Drug Deliv Rev* 55: 1359–1383.
- 51) Walmsley AR, Barrett MP, Bringaud F, Gould GW. 1998. Sugar transporters from bacteria, parasites and mammals: structure–activity relationships. *Trends Biochem Sci* 23: 476-481.
- 52) Chan CY, Guggenheim JA, To CH. 2006. Is active glucose transport present in bovine ciliary body epithelium?. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: 1087-1093.
- 53) Durán JM, Cano M, Peral MJ, Ilundáin AA. 2004. D-mannose transport and metabolism in isolated enterocytes. *Glycobiology* 14: 495-500.
- 54) Guyton A. 2000. Tratado de fisiología médica. Editorial interamericana McGraw Hill, México, D.F. pag.696-719.
- 55) Houssay B. 2000. Fisiología humana. Editorial Librerías Yenny, Buenos Aires, Argentina, pag.534-537.
- 56) Stanley P. 2000. Química Orgánica. Editorial McGraw Hill, México, D.F. pag.326-330.
- 57) Lehninger H. 1999. Biochemistry. Editorial limusa, Chicago, USA, pag.890-900.
- 58) Villalpando Fierro Irma. 2003. Insulin-like grow factor I (IGF) regulates endocrine activity of the embryonic testis in the mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86: 151-158.
- 59) Paz G, Homonnai ZT. 1979. Leydig cell function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Experientia*. 35: 1412-1413.
- 60) Clark P, Docherty J, Andrew R. 1992. Insulin: molecular biology to pathology. Oxford University Press. pag. 37-40.

- 61) Santamaría González S. 2006. Participación de la insulina en el crecimiento testicular y en la regulación de la testosterona del ratón *Mus musculus*. TESIS. UNAM.
- 62) Palomino GM, Revilla MC, Cárdenas SA, Polanco PAC, Islas AS. 1998. Efecto de la diabetes inducida sobre la reproducción y el desarrollo. *Ginecología y obstetricia de México*. 66: 403-406.
- 63) Reyna-Villasmil E, Torres-Montilla M. 2005. Transportadores de glucosa en el embarazo. *Rev Obstet Ginecol Venez*, 65: 81-88.
- 64) Oakley BA, Breard R, Turner R. 2004. Effect of sustained maternal hyperglycemia on the fetus in normal and diabetic pregnancies. *Ann Emerg Med*. 128: 503-516.
- 65) Navarrete SA, Tonack S, Kirstein M, Kietz S, Fischer B. 2004. Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit preimplantation embryos. *Reproduction* 128:503-516.
- 66) Wilson C, Mitsumoto Y, Maher F, Klip A. 2001. Regulation of cell surface GLUT1, GLUT3 and GLUT4 by insulin and IGF-1 in L and myotubes. *Metabolism*. 50:771-777.
- 67) Wandel S, Buchs A, Schürmann A, Summers SA, Powers AC, Shanahan MF, Joost HG. 1996. Glucose transporter activity and ligand binding (citrifalasin B, IAPS-forskolin) of chimeric constructs of GLUT2 and GLUT4 expressed in COS-7-cell. *Biochem Biophys Acta*. 1284: 56-62.