



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EXPRESIÓN DEL RECEPTOR A INSULINA
EN CELULAS EMBRIONARIAS DE 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:

ANTONIO MENDOZA DELGADO



MÉXICO, D. F

2008



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	Martha Leticia Jiménez Pardo
Vocal	Eleazar Martínez Barajas
Secretario	María Irma Villalpando Fierro
1^{er} Suplente	José Ignacio Páramo Ramírez
2^{do} Suplente	Euclídes Ávila Chávez

Sitio donde se desarrolló el tema:

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

Asesor:

Dra. María Irma Villalpando Fierro

Supervisor Técnico:

Bióloga Esmeralda Lira Romero

Sustentante:

Mendoza Delgado Antonio

NO TE SALVES

No te quedes inmóvil
al borde del camino
no congeles el júbilo
no quieras con desgana
no te salves ahora
ni nunca
no te salves
no te llenes de calma

no reserves del mundo
sólo un rincón tranquilo
no dejes caer los párpados
pesados como juicios

no te quedes sin labios
no te duermas sin sueño
no te pienses sin sangre
no te juzgues sin tiempo

pero si
pese a todo
no puedes evitarlo
y congelas el júbilo
y quieres con desgana

y te salvas ahora
y te llenas de calma
y reservas del mundo
sólo un rincón tranquilo
y dejas caer los párpados
pesados como juicios
y te secas sin labios
y te duermes sin sueño
y te piensas sin sangre
y te juzgas sin tiempo
y te quedas inmóvil
al borde del camino
y te salvas
entonces
no te quedes conmigo

Mario Benedetti

Agradecimientos

A la UNAM

Por todos estos años de formación, por proporcionarme una base sólida para enfrentar la difícil tarea de devolver a la sociedad con mi esfuerzo y dedicación la inversión y aprendizaje que dentro de sus muros aprendí.

A la Doctora Irme Villalpando Fierro

Por ser parte de su grupo de trabajo y apoyarme en la realización de mi tesis dentro y fuera del laboratorio.

A la M. en C. Esmeralda Lira Romero

Por ser un gran apoyo durante mi estancia en el laboratorio, por la ayuda y enseñanzas en el manejo de los cultivos celulares y la realización de la Inmunocitoquímica, pero sobre todo por ser mi amiga y hacerme reír cuando más lo necesitaba, gracias por todo!

Al Doctor Eduardo García Zepeda

Por permitirme trabajar en sus instalaciones, por la confianza y el apoyo para realizar mi trabajo experimental y por los consejos recibidos durante mi estancia en su laboratorio.

A la Doctora Itzel Benítez Hernández

Gracias por tu amistad, toda tu ayuda, consejos y enseñanzas, no hubiera podido encontrar a alguien mejor que tú para realizar mi trabajo.

A la Dra. Laura Escobar y a Bety por su colaboración y apoyo en la toma de las fotografías de mi tesis.

A mi Facultad de Química, mi segundo hogar y el lugar más querido de toda la UNAM.

Dedicatorias

A mis padres Antonio y Virginia, por enseñarme a luchar por lo que quiero, permitirme elegir mi vocación y apoyarme en esta empresa en todo momento. Gran parte de la persona que soy y de los logros que he obtenido se los debo y dedico a ustedes. Los amo.

A mis hermanas, porque con su ejemplo y dedicación me motivaron a dar siempre lo mejor de mí, gracias por estar ahí.

A Angie, por permitirme conocerte y ser parte de tu vida, estar siempre a mi lado y apoyarme en todo momento, ser antes que nada mi amiga incondicional compartiendo las cosas buenas y malas buscando siempre mejorar como personas y crecer como profesionistas.

A Mayra, por ser una gran amiga, por los buenos y malos momentos que compartimos, me llevo gratos recuerdos, gracias.

A Christian, Diana, Edgar, Dulce Jazmín, Alejandro, Beto excelentes personas y amigos de muchos años, gracias por estar conmigo a pesar del tiempo y la distancia.

A Marvin, Bety, Rabbitt, Gilda, Ana, Blanca, Omar, Daniel, Omar falso, Anallely, Axel, Paola, Israel, Damián, Javier, Araceli, Sandra, que les puedo decir, hicieron de mi estancia en la facultad algo inolvidable, gracias por todo lo que puede compartir con ustedes, se convirtieron en mi segunda familia y en la mejor parte de la facultad durante estos años.

A Bety, Sonia, Alejandro, Silvia, Jonathan, Salomón, Aby, Miguel, Chispa, Sandra, Marlene, Pablo, Noemí, Miriam, Uriel: Por permitirme ser parte de sus vidas y compartir grandes momentos dentro y fuera de la facultad, gracias por todo.

A la familia Martínez Ramírez y González Ramírez por los buenos momentos compartidos y el apoyo recibido en la última fase de mi formación académica.

CONTENIDO

	Pág
I. RESÚMEN.....	9
II. INTRODUCCIÓN.....	11
1.- DESARROLLO GONADAL.....	11
a) Cresta Genital.....	12
b) Gónada indiferenciada.....	15
c) Diferenciación morfológica del testículo.....	16
2.- GENES QUE PARTICIPAN EN LA DIFERENCIACIÓN	
TESTICULAR.....	20
a) Sry.....	20
b) Genes Autosomales.....	23
3.- INSULINA.....	29
a) Organización molecular del gen.....	29
b) Estructura de la proteína.....	30
c) Aspectos metabólicos.....	32
d) Estudios sobre regulación.....	32
4.- RECEPTOR A INSULINA.....	32
a) Organización del gen.....	33
b) Estructura y regulación de la proteína.....	34
c) Estudios realizados en diferentes especies.....	41
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS.....	42
IV. OBJETIVOS.....	43

V.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	44
	a) Material biológico.....	44
	b) Aislamiento del tejido.....	44
	c) Cultivo celular.....	46
	d) Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	47
	e) Estandarización de la técnica de Western blot.....	47
	f) Expresión del receptor a insulina.....	48
	g) Inmunocitoquímica.....	49
VI.	RESULTADOS.....	50
	Expresión del receptor a insulina en las células somáticas testiculares de ratón:	
	a) Sertoli.....	50
	b) Leydig.....	51
	c) Determinación del número de células somáticas.....	53
	d) Cuantificación de proteínas por el método de mini Bradford.....	53
	e) Curva Patrón de proteína total en células somáticas testiculares embrionarias.....	54
	f) Determinación del peso molecular del receptor a insulina.....	55
VII.	DISCUSIÓN.....	57
VIII.	CONCLUSIONES.....	60
IX.	REFERENCIAS.....	61
X.	APÉNDICE.....	67

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMH	Hormona Inhibidora de los conductos de Müller
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BSA	Albúmina sérica humana
Ce	Células epiteliales
Cel m	Células mesenquimáticas
CGPs	Células germinales primordiales
Cm	Conductos mesonéfricos
Cs	Cordones sexuales
d.g.	Días de gestación
D'MEM	Medio Eagle modificado Dulbecco
DAB	Diaminobenzidina
<i>Dhh</i>	Del inglés gen <i>Desert hedgehog</i>
<i>Dmrt1</i>	Del inglés gen <i>double sex and mab-3 related trasncription factor 1</i>
dpc	Días post coito
Epc	Células del epitelio celómico
<i>Fgf9</i>	Factor de crecimiento fibroblástico
<i>HMG</i>	Del inglés high-mobility group. Grupo de alta movilidad
<i>Igf1</i>	Factor de crecimiento similar a insulina tipo I
kDa	Kilodaltones
kpb	Kilopares de bases
Lb	Lámina basal
<i>SF1</i>	Factor esteroideogénico 1
<i>Sry</i>	Gen determinante testicular
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral β
Tm	Túbulos mesonéfricos
Vs	Vasos sanguíneos
<i>Wt1</i>	Factor tumoral de Wilms

I.- RESUMEN

En los mamíferos la insulina es la hormona anabólica más importante para el organismo, participa regulando el metabolismo de glucosa y la división celular entre otras funciones en el adulto. Esta hormona está formada por dos cadenas de aminoácidos denominadas cadena A y B unidas por puentes disulfuro. La acción de la insulina se lleva a cabo a través de la unión a su receptor perteneciente a una subfamilia de receptores con actividad de tirosina-cinasa; la presencia del receptor a insulina no se ha descrito en las células testiculares. Estudios realizados por Nef y col (2003) indican que la presencia de insulina es importante para la determinación del sexo gonadal. El objetivo del presente estudio fue determinar la expresión del receptor a insulina en las células embrionarias de Sertoli del ratón *Mus musculus* cepa CD1 a los 16 y 17 días de gestación (d.g.). Se obtuvieron los embriones, se les extrajeron los testículos y se formaron grupos de 30 a 40 gónadas. Se disgregaron las gónadas masculinas manualmente con 0.1% de tripsina, y se inhibió su actividad con un inhibidor. Las células se enjuagaron con PBS, se centrifugaron y resuspendieron en Medio Eagle Modificado Dulbecco (D'MEM) y se dejaron reposar 15 min. Se separaron las células de Sertoli, que precipitan y las células de Leydig, las cuales se mantienen en la superficie. Las células de Leydig y Sertoli aisladas se dividieron en dos grupos, el primero se empleó para realizar un Western-blot y el segundo para Inmunocitoquímica. En el primero las células se sembraron en medio D'MEM y se incubaron 24 horas a 37°C con 5% de CO₂, se lavaron y se recuperaron. Se determinó el contenido de proteína total en cada tipo celular por el método de mini-Bradford.

El receptor de insulina se analizó en geles de acrilamida al 10%, se realizó una transferencia a una membrana de nitrocelulosa y se realizó un Western-blot. La otra parte se sembró en cajas de cultivo de 20 pozos, con medio de cultivo D'MEM y 10% de Suero bovino Fetal y se incubó 24 horas a 37°C con 5% de CO₂. Posteriormente las células se lavaron y fijaron con metanol absoluto para llevar a cabo la Inmunocitoquímica. El Western-blot confirmó la presencia del receptor a insulina en las células de Sertoli. Se observó que la subunidad β 1 del receptor, posee un peso molecular de 46.6 kDa. La Inmunocitoquímica mostró que el receptor a insulina se expresa en las células de Sertoli y Leydig en el testículo fetal del ratón *Mus musculus*.

II.- INTRODUCCIÓN

1.- DESARROLLO GONADAL

Las gónadas (ovarios y testículos), en los adultos, son órganos que tienen dos funciones de suma importancia, se encargan de elaborar y secretar diversos factores de crecimiento y hormonales involucrados en la regulación en las funciones reproductoras del organismo adulto. En los ovarios y testículos se lleva a cabo la proliferación, diferenciación y maduración de los gametos (Merchant, 1991). Las dos primeras fases son comunes a las hembras y machos, de manera que en ambos sexos se establecen estructuras idénticas a partir de las cuales se formarán los órganos reproductores correspondientes a cada sexo, la gónada indiferenciada dependiendo del sexo genético se transformará en testículo u ovario (Merchant y Moreno, 2003). Se sabe que el ovario produce solo gametos X, mientras que el testículo desarrolla espermatozoides X o Y. De tal forma que durante la fertilización se generan individuos XX (hembras) o XY (machos); dando origen al sexo genético de los individuos. Si el ovocito es fertilizado por un espermatozoide portador de un cromosoma X se diferenciará como un individuo femenino y si es fertilizado por un espermatozoide Y generará un individuo masculino (Villalpando, 2000). La presencia del cromosoma Y potencia la pronta diferenciación morfológica y actividad secretora del testículo.

a) Cresta Genital

Durante el desarrollo gonadal de los mamíferos en la fase embrionaria participan dos tipos celulares, las células somáticas y las células germinales primordiales (CGPs), estas tienen un origen extraembrionario, se observan por primera vez en el endodermo del saco vitelino cerca del alantoides a los 7.5 días de gestación (d.g) en ratones. En los mamíferos se han podido identificar en el endodermo del saco vitelino (membrana extraembrionaria) debido a sus características morfológicas, histoquímicas y estructurales. Estas células migran desde su sitio de origen hasta la región urogenital del embrión donde se formarán las gónadas, es decir el futuro ovario o testículo (Merchant y Moreno, 2003). La fase de cresta genital se reconoce de los 9.5 a los 10.5 d.g en ratones (Villalpando, 2000). Para llegar a las crestas las CGPs se desplazan por dos tipos de movimientos: pasivo y activo. En el primero hay un desplazamiento pasivo en el que las CGPs son trasladadas desde el endodermo y el mesénquima (vecino del saco vitelino y de los alantoides) por un crecimiento diferencial del embrión, el saco vitelino crece y es invaginado hacia el interior del embrión para formar parte del intestino primitivo posterior. En el segundo movimiento está implicada la capacidad motriz de las CGPs en la cual las células se desplazan por medio de pseudópodos, lamelipodios y filipodios secretando enzimas proteolíticas que rompen la lámina basal del intestino y continúan su desplazamiento hacia las futuras crestas genitales a través de las células mesenquimáticas (Fig.1).

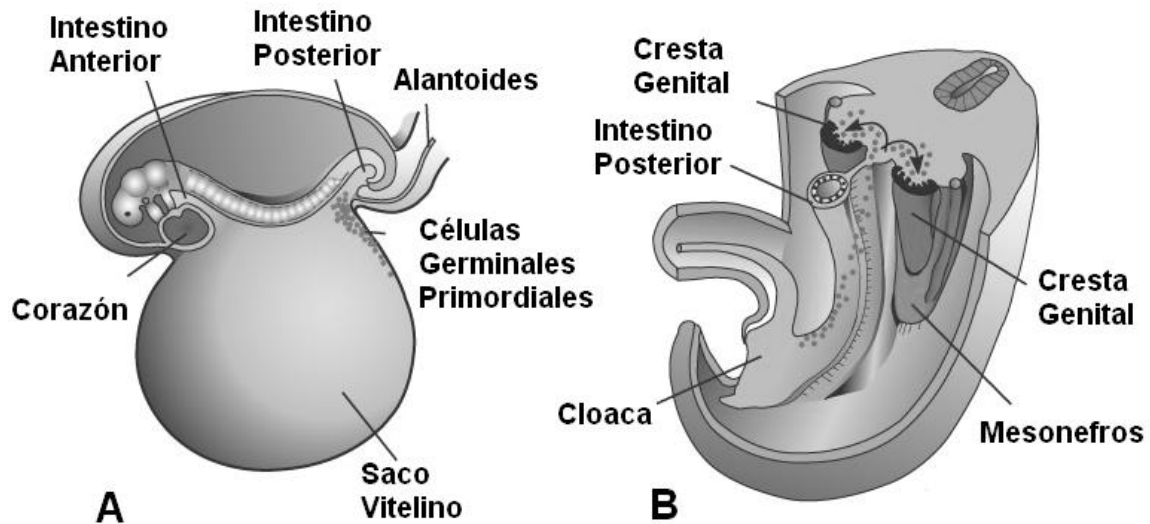


Fig.1. **A.** Embrión de 9-12 días de gestación. **B.** Desplazamiento de las células germinales primordiales desde el intestino posterior hacia la cresta genital, (Sadler, 2004).

Las CGPs continúan su migración hacia las crestas genitales, para lo cual se han propuesto tres mecanismos, ninguno de los cuales se ha demostrado hasta la fecha:

a) Gradiente de concentración. En este caso las CGPs se guían por un factor secretado por las células del epitelio celómico situado en la región urogenital a través de quimiotaxis. Actualmente se sabe que un posible factor quimiotáctico sería el factor de crecimiento transformante- β (Merchant, 1991).

b) Guía por contacto. Implica la existencia de receptores específicos en la superficie de las CGPs que se adhieren a moléculas presentes en la superficie de las células mesenquimáticas y en la matriz extracelular (Merchant, 1991).

c) Organización topográfica. Se refiere a la posición de las células somáticas del embrión en el momento del desplazamiento de las CGPs, su disposición en la matriz extracelular las dirige directamente hacia la cresta genital, la cual está formada por una capa de células epiteliales (Merchant, 1991).

En la región urogenital existen diversos tipos de células somáticas de origen mesodérmico, aún antes de que lleguen las CGPs, como las células mesoteliales, mesenquimáticas, mesonefrénicas y endoteliales.

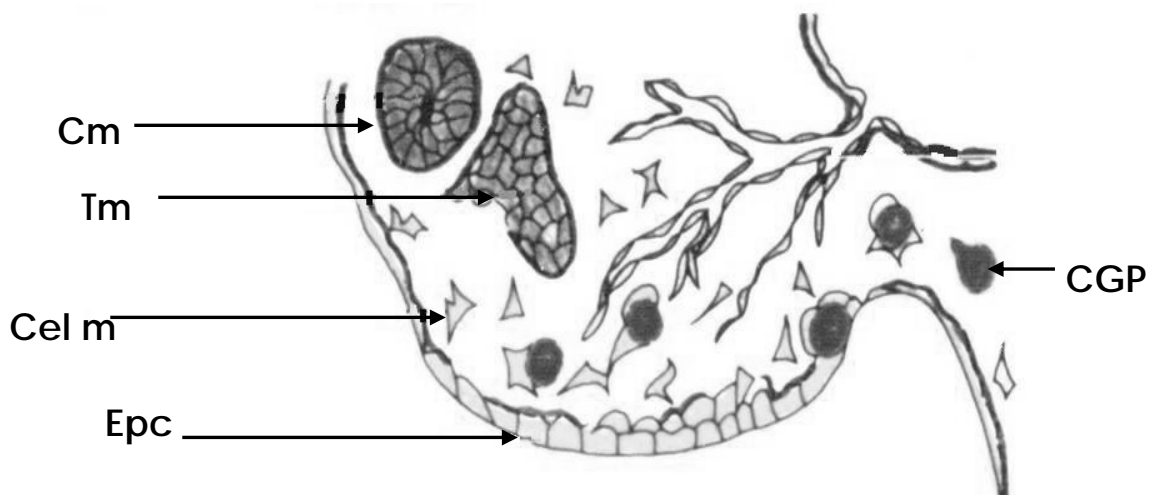


Fig. 2. Esquema de la cresta genital de un embrión de 9.5 d. g. Se muestran los diferentes tipos celulares que participan durante el desarrollo de la gónada indiferenciada. Estas células son: CGPs (CGP), células del epitelio celómico (Epc), células mesenquimáticas (Cel m), los conductos mesonéfricos (Cm) y los túbulos mesonéfricos (Tm) formados a partir de la condensación del mesénquima urogenital (Merchant-Larios, 1991).

b) Gónada Indiferenciada

En la cresta genital se lleva a cabo una proliferación activa de todas las células somáticas, se condensan células de origen mesotelial y mesenquimático que conducen a la formación del blastema gonadal. A partir de este territorio histológico se diferencian dos importantes tejidos gonadales que caracterizaran la etapa de gónada indiferenciada: los cordones sexuales y el estroma (Merchant y Larios, 1991).

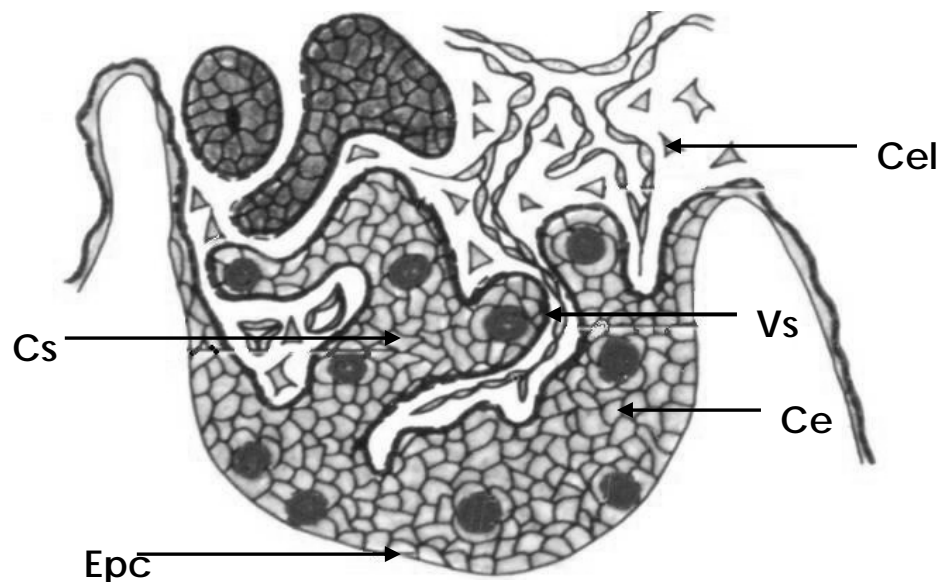


Fig. 3. Establecimiento de la gónada indiferenciada. Formación de los cordones sexuales (Cs) que se continúan con el epitelio celómico, células epiteliales (Ce) limitadas por una lamina basal (Lb), células mesénquimatosas (Cel m) y vasos sanguíneos (Vs). (Merchant-Larios, 1991).

Las células mesoteliales, mesenquimáticas participan directamente en la formación de la gónada indiferenciada como precursoras.

Las células mesonefrénicas y endoteliales son parte de tejidos ya diferenciados (mesonefros y sistema circulatorio) participando indirectamente en la formación de la gónada. Los cordones gonadales son arreglos epiteliales envueltos por una lamina basal y están formados por células íntimamente asociadas, aquí es donde se encuentran la mayoría de CGPs (Fig. 3). En el estroma se encuentran las células de tipo mesenquimático a partir de las cuales se ha propuesto se diferencian las células de Leydig y vasos sanguíneos que irrigan la gónada indiferente (Merchant y Moreno, 2003). La gónada indiferenciada en ratón se establece entre los días 9.5 y 11.5 (Merchant, 1991).

c) Diferenciación morfológica del testículo

La diferenciación del testículo en el ratón ocurre alrededor del día 12 d.g. en la cepa CD1, este rango varia de acuerdo a la especie de estudio. Inicialmente se observa en los machos genéticos XY la gradual separación de los cordones sexuales del epitelio superficial de la gónada, producida por un mayor compactamiento de los cordones tanto como por una invasión y proliferación activa del tejido mesenquimatoso y vasos sanguíneos desde la región mesonéfrica (Fig. 4). Los cordones sexuales se trasladan a la región medular de la gónada mediante un movimiento morfogenético que implica cambios en la adhesividad de las células epiteliales y un activo depósito de moléculas como laminina y colágena, que forman la lámina basal (Merchant, 1991). Las células mesenquimáticas y endoteliales son conducidas por

cambios en la expresión genética, los cuales en esta etapa no se manifiestan en las hembras genéticas XX (Merchant, 1991).

En la médula del testículo los cordones sexuales son llamados “cordones seminíferos” y posteriormente “tubos seminíferos” al adquirir el lumen, conservando la lamina basal que envuelve las células somáticas epiteliales “presertoli” como las germinales “proespermatogonias” (Merchant, 1991). En el recién nacido, en humano y ratón, existen solo células presertoli acumuladas en la parte central de los tubos seminíferos disminuyendo el número de las proespermatogonias debido a la proliferación de las células de Sertoli durante la infancia, lo cual produce elongación y enrollamiento de los tubos seminíferos. Al iniciar la pubertad cesan de proliferar las células de Sertoli adquiriendo una estructura característica, en su membrana se forman los complejos de unión intersertolianos, formando la barrera hematotesticular. Con esto se forma el lumen en los cordones e inicia la espermatogénesis (Merchant, 1991).

El tejido estromático que rodea los cordones seminíferos presenta células musculares o mioideas muy cercanas a la lamina basal envolviendo los cordones, vasos sanguíneos, fibroblastos y células de Leydig importantes por su actividad endocrina presentes desde la etapa prenatal (Merchant, 1991).

En el humano estos tipos celulares aumentan entre la 9ª y 18ª semana de gestación sufriendo posteriormente regresión progresiva, desapareciendo completamente durante los primeros días después del nacimiento debido a la desaparición de las gonadotropinas provenientes del corion placentario. Al comenzar la pubertad se reinicia la diferenciación de las células

esteroidogénicas de Leydig alcanzando su número máximo entre 4 y 6 años. Disminuyen poco a poco al llegar a la senectud (Merchant, 1991).

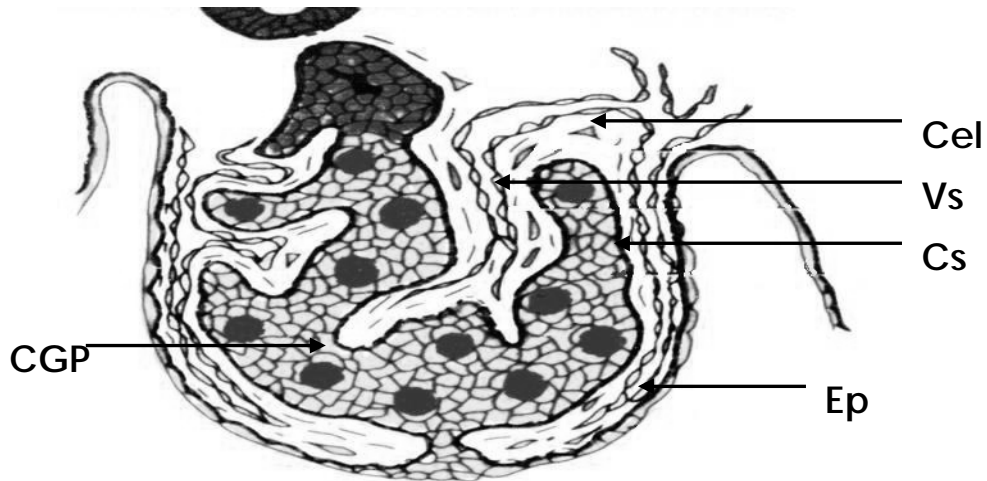


Fig. 4. Diferenciación sexual del testículo. En esta etapa hay una invasión activa del mesénquima (Cel m) y vasos sanguíneos (Vs) que separa a los cordones sexuales (Cs) del epitelio celómico (Epc), Célula germinal primordial (CGP) (Merchant - Larios, 1991).

El fenotipo sexual completo ocurre con la diferenciación sexual secundaria. Las estructuras primordiales del tracto genital que darán origen a los genitales internos incluyen dos sistemas de conductos presentes en embriones de ambos sexos: los conductos de Wolf o mesonéfricos y los conductos de Müller o paramesonéfricos. En cambio los genitales externos se desarrollan a partir de un primordio común (tubérculo genital, pliegues genitales y engrosamientos labio escrotales). La formación del fenotipo del macho es el resultado de la secreción de hormonas testiculares que promueven el desarrollo de los conductos de Wolf y la regresión de los conductos müllerianos (Fig. 5).

SEXUALMENTE INDIFERENTE
(Bipotencial)

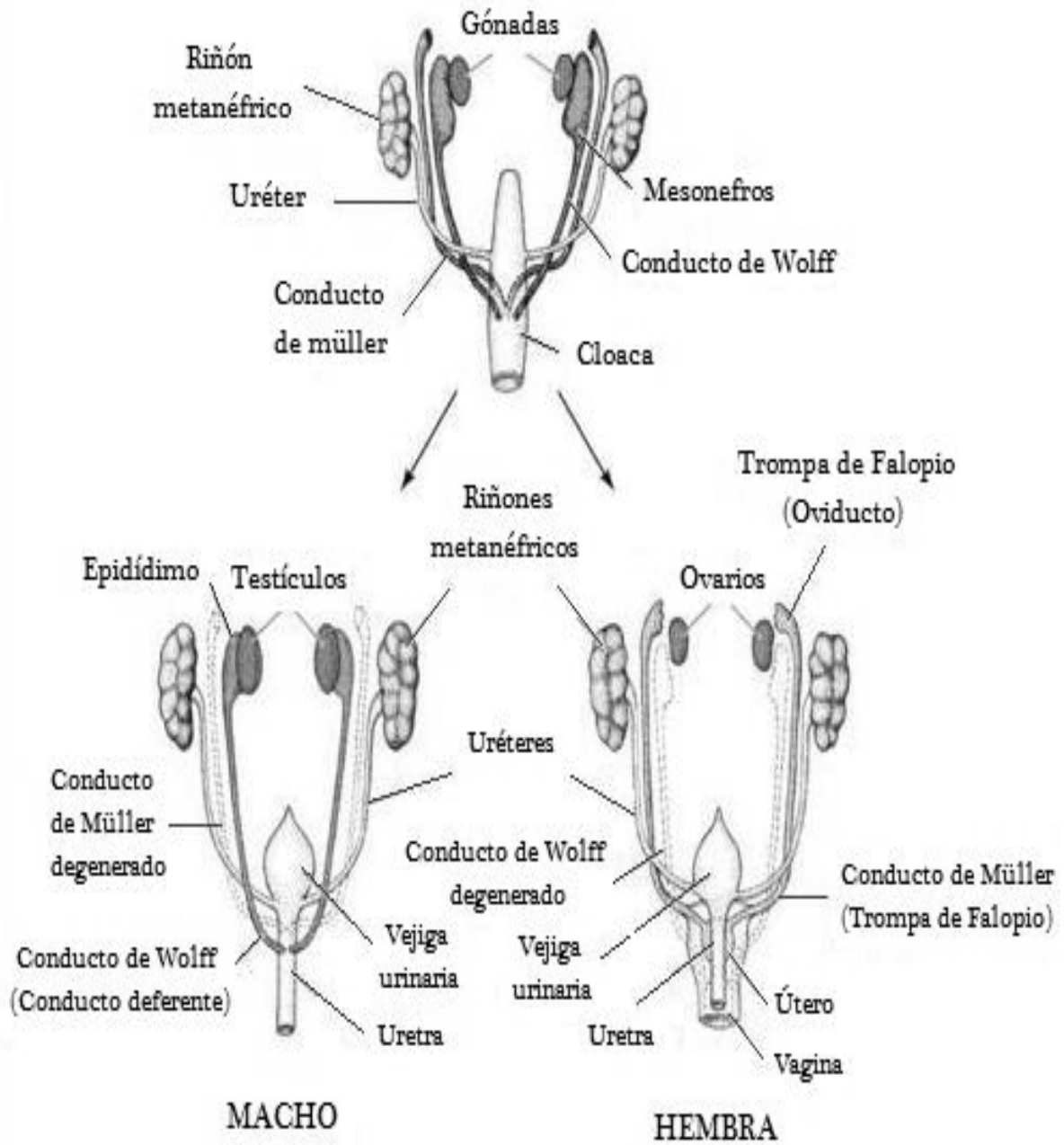


Fig. 5. Desarrollo de las gónadas y de sus conductos en los mamíferos (Modificado de Gilbert, 2005).

La primera de estas hormonas es la hormona antimülleriana (HAM) que causa la regresión de los conductos müllerianos, proceso que se inicia a los 13.5 dpc, y se detecta su sitio de expresión en las células de Sertoli. Inmediatamente después de iniciada la síntesis de HAM, las células intersticiales del testículo fetal se citidiferencian en células de Leydig.

Estas células servirán como sustrato anatómico para la producción de testosterona que es la segunda hormona fetal que participa en la construcción del fenotipo masculino. Esta es biotransformada en 5α -dihidrotestosterona para llevar a cabo la diferenciación del conducto de Wolf en epidídimo, vías deferentes y vesícula seminal.

2.- GENES DE LA DIFERENCIACIÓN TESTICULAR

El propósito esencial de la diferenciación sexual es dotar al organismo con las características anatómicas y fisiológicas para permitir que la reproducción sexual ocurra. La expresión o supresión de genes durante el desarrollo fetal tendrá como resultado el desarrollo de una hembra o un varón.

a) Sry

La posición del gen determinante testicular fue restringida a una región de 35.000 pares de bases del cromosoma localizada en la región pseudoautosomal cerca de la punta del brazo corto del cromosoma Y, cuya secuencia específica puede codificar un péptido de 223 aminoácidos (Sinclair y col., 1990). Se ha propuesto que este péptido es un factor de transcripción, ya que contiene un dominio de unión al DNA denominado la caja HMG (grupo de alta movilidad: del inglés *high-mobility group*). Como se mencionó este gen se

ubica en la región denominada región pseudoautosomal, experimentos realizados demostraron que solo una región de 14 kilobases denominada *Sry* en ratón y *SRY* en humano (región del cromosoma Y determinante del sexo; del inglés *sex-determining region of the Y chromosome*) es capaz de revertir el sexo (Tilman y Capel, 2002).

SRY/Sry se encuentra en los machos normales XY y en los machos XX poco frecuentes y está ausente en las hembras XX normales y en muchas hembras XY. En el ratón *Sry* se expresa en la gónada entre los días 10.5 y 12.5 postcoito (dpc), correspondiendo este periodo al establecimiento del primordio gonadal (10.5-11.5) y al inicio de la diferenciación sexual del testículo, por lo que en individuos normales XY el gen *Sry* se expresa antes de la diferenciación morfológica (Merchant, 1991). Se ha planteado que las células de Sertoli inician la proliferación de HAM en el testículo de ratón fetal a partir de los 12.5 dpc. Además del gen *Sry* se han encontrado varios genes cuya función es necesaria para la diferenciación sexual normal (Tilman y Capel, 2002).

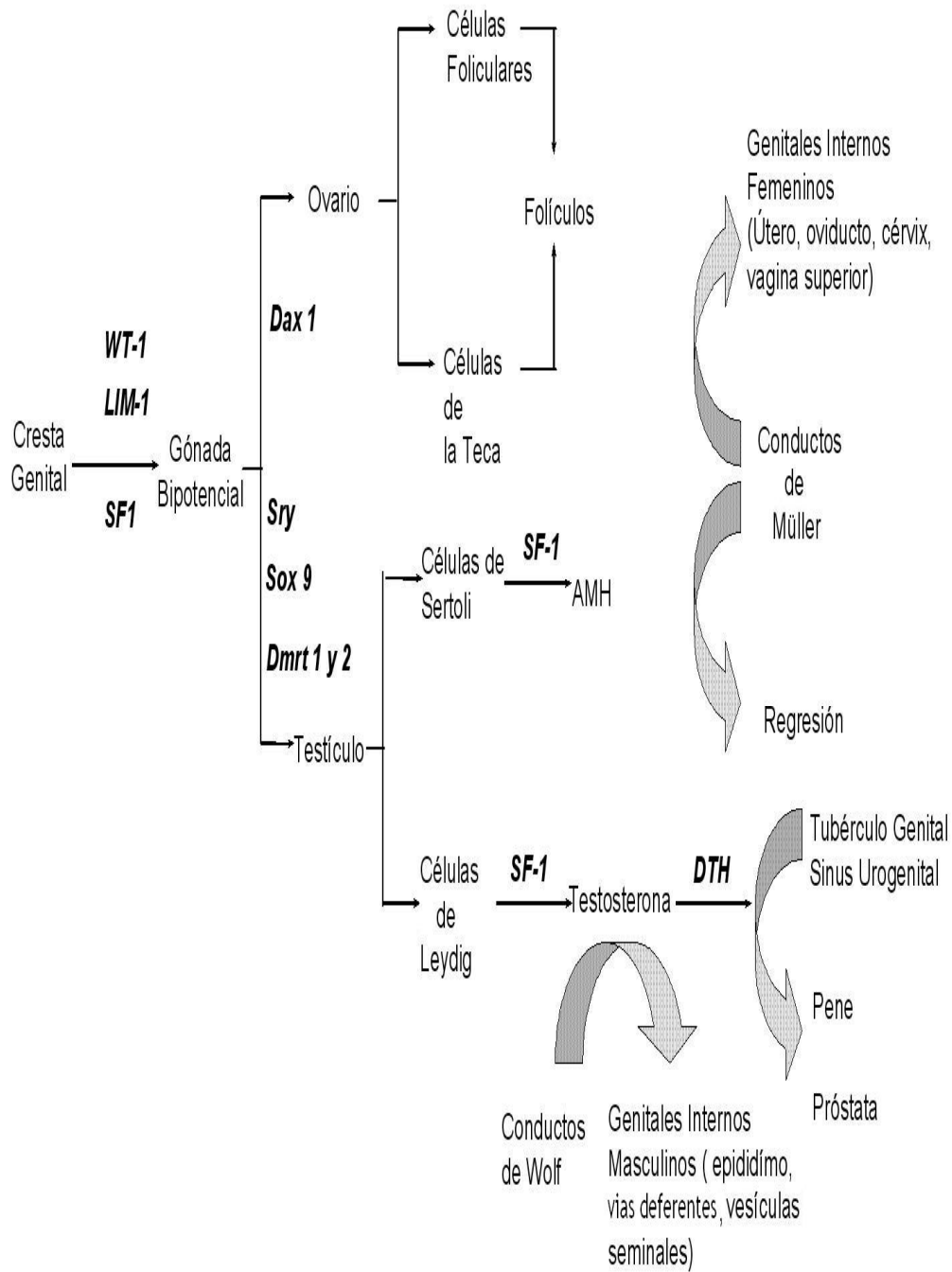


Fig. 6. Genes Sexuales en Mamíferos. Modificada de Hiort, 2000; Gilbert, 2001.

b) Genes Autosomales

SOX9

Es un gen autosómico, miembro de la familia de genes relacionado con el dominio HMG, que también puede inducir la formación testicular (Villalpando I., 2000). Mientras que el *SRY* es hallado específicamente en mamíferos, el gen *SOX9/sox9* está altamente conservado en todos los vertebrados. Su expresión comienza a partir de los 10.5 dpc pero persiste únicamente en el núcleo de las células de Sertoli de gónadas XY después de los 11.5 dpc (Tilman y Capel, 2002). *Sry* puede actuar como un interruptor para activar a *Sox9* y la proteína *Sox9* puede iniciar la vía evolutiva conservada para la formación testicular (Pask A., Graves JA., 1999). La proteína *Sox9* puede actuar como un factor de empalme y como regulador transcripcional. *Sox9* migra hacia el núcleo en el momento de la determinación sexual, aquí se une a un sitio promotor sobre el gen para el factor inhibidor de Müller (Arango y col. 1999; de Santa Bárbara y col. 2000).

Factor de crecimiento fibroblástico

Uno de los genes regulados por *Sry* o *Sox9* puede codificar un factor de crecimiento Fibroblástico (*Fgf9*), a través de un mecanismo indirecto (Capel y col. 1999). En las células de la cresta genital *Sry* induce la secreción de un factor quimiotáctico que permite la migración de las células mesonéfricas hacia la gónada XY, estas a su vez inducen al epitelio gonadal a diferenciarse en células de Sertoli con patrones de expresión de genes específicos masculinos.

Además, las células mesonéfricas son críticas para la formación de cordones testiculares y las células mesonéfricas en migración pueden inducir a células gonadales XX a formar cordones testiculares (Tilman y Capel, 1999). *Fgf9* es importante en la estimulación de la división de las células de Leydig, fomentando la diferenciación de las células de Sertoli y atrayendo a las células mesonéfricas hacia la gónada (Gilbert, 2005).

SF1

Otra proteína que puede ser activada directa o indirectamente por *Sry* es el factor de transcripción *SF1* (factor esteroideogénico 1; del inglés, *steroidogenic factor 1*). Su expresión se detecta entre los 9-9.5 dpc en la cresta genital tanto en machos como en hembras. *Sf1* es necesario para generar la gónada indiferenciada, entre los 12 y 12.5 dpc, sus niveles de expresión se detectan más altos en los cordones testiculares, permaneciendo su expresión sobre el testículo en desarrollo, y en el caso del ovario la señal es más débil (Merchant y Moreno, 2003). *Sf1* parece ser activo en la masculinización de las células de Leydig y de Sertoli. En las células de Leydig *Sf1* activa a los genes que codifican las enzimas que producen la testosterona. En las células de Sertoli, funciona en colaboración con *Sox9*, elevando los niveles de transcripción de *FIM* (Shen y col. 1994; Arango col. 1999).

WT1

Este gen es un factor de transcripción con dominios de dedos de zinc y regiones ricas en prolina y glutamina. Se expresa en la cresta urogenital, el riñón, los mesonefros y la gónada (Wilhem y col, 2007). Se expresa desde los 9 dpc siendo mayor a los 12 dpc.

Posteriormente a los 12.5 dpc no se detecta su presencia en el tejido gonadal, esto sugiere que podría actuar como un factor de transcripción regulando la expresión del *Sry*, estando involucrado en algunas vías que llevan a la transformación de las células mesenquimáticas dentro de células epiteliales, que posteriormente darán origen a las células de Sertoli (Merchant y Larios, 1991).

Dmrt1

En ratones este gen es expresado en la cresta genital de ambos sexos comenzando el periodo de la determinación sexual, siendo necesario para la diferenciación del testículo, pero no del ovario (Raymond y col, 2000). En testículo es expresado en las células de Sertoli y en células germinales, siendo necesario para su sobrevivencia y diferenciación.

SoX3

Es un gen de un solo exón localizado en el cromosoma X y se expresa en riñón y gónadas. Es miembro del grupo de alta movilidad (HMG) de factores de transcripción. Es detectado en el embrión de los 6.5 a los 8 días dpc y continúa expresándose durante la formación del cerebro y el sistema nervioso central. No es requerido para la determinación sexual pero si para el desarrollo normal del oocito, diferenciación testicular y gametogénesis (Weiss y col., 2003).

Dhh

Es requerido para el desarrollo normal y función de las células de Leydig y mioideas peritubulares y su ausencia crea una desorganización del testículo con deterioro de la espermatogénesis (Weiss y col., 2003).

Cuadro 1. Genes que participan en la diferenciación testicular

Gónada Bipotencial		
Gen	Función	Sexo
<i>Wt1</i>	Factor de transcripción. Establecimiento de gónadas e hígado. Posible regulador del <i>Sry</i>	M F
<i>Sf1</i>	Receptor nuclear. Necesario para generar la gónada indiferenciada	M F
<i>Lhx9</i>	Factor de transcripción. Establecimiento temprano de la gónada	M F
<i>Emx2</i>	Factor de transcripción	M F
<i>M33</i>	Factor de transcripción. Establecimiento temprano de la gónada	M F
Determinación Testicular		
<i>Sry</i>	Factor de transcripción. Participa en la diferenciación del testículo	M
<i>Sox9</i>	Factor de transcripción. Diferenciación de células de Sertoli y desarrollo del Testículo	M
<i>Sox3</i>	Diferenciación testicular y gametogénesis	M
<i>Gata4/Fog2</i>	Cofactor de transcripción	M
<i>Fgf9</i>	Molécula señal. Proliferación en testículo	M
<i>Dax1</i>	Receptor nuclear	M
<i>Dmrt1</i>	Mantiene a los tubos seminíferos después del nacimiento	M
<i>Igf1</i>	Participa en la proliferación, diferenciación y producción de esteroides	M
<i>Dhh</i>	Desarrollo y función normal de las células de Leydig	M
<i>MIS</i>	Regresión de los conductos de Müller	M

Modificado de Tilman y Capel, 2002; Wilhelm y Col., 2007.

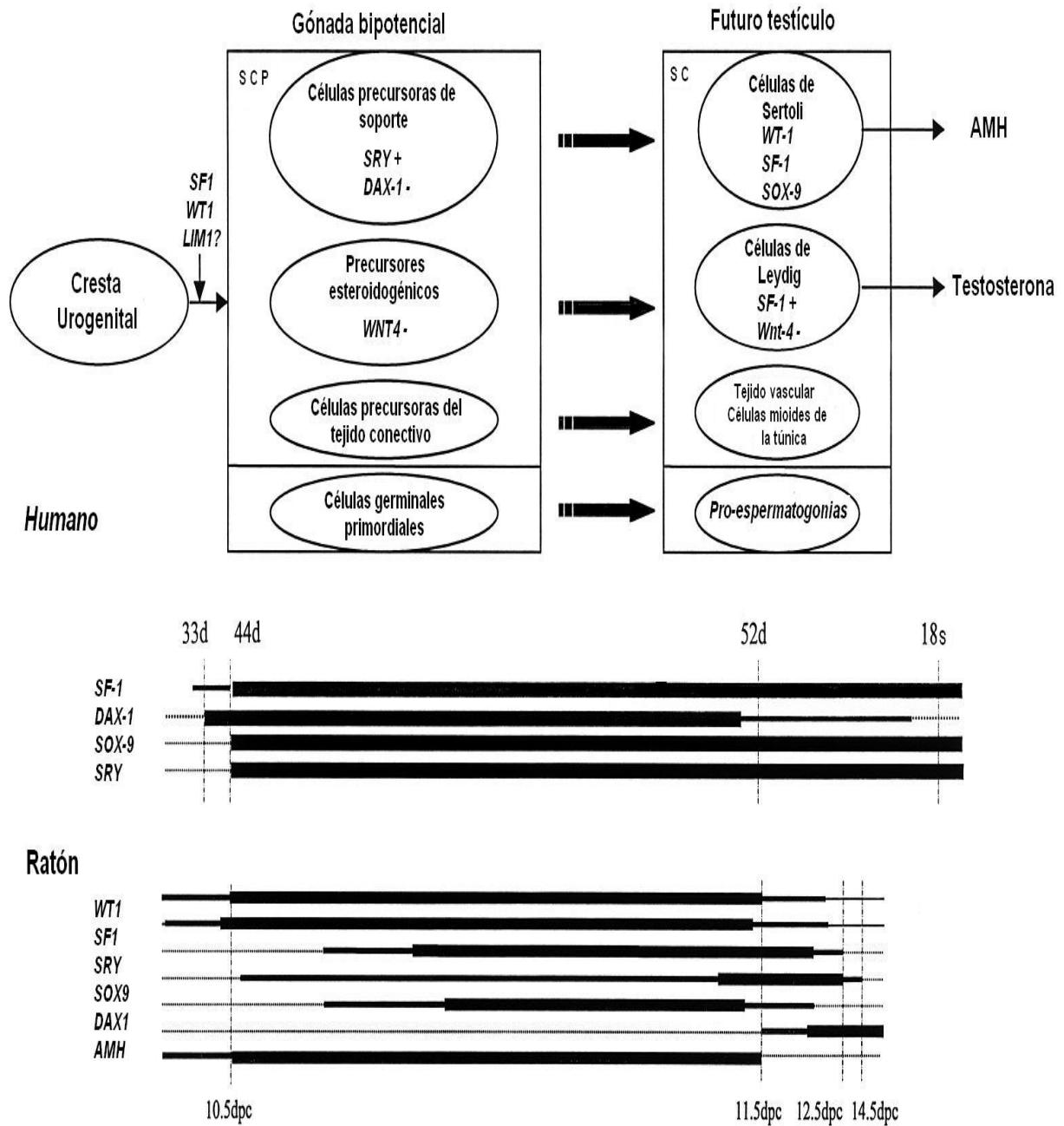


Fig. 7. Componentes celulares y expresión de genes en la gónada y la diferenciación testicular (Veitia y col, 2001).

Células de Sertoli

Las células de Sertoli son las encargadas de dirigir a los diferentes tipos celulares en el desarrollo del testículo. Presentan dos funciones principales: el empaquetamiento de las CGP y la síntesis de la hormona antimülleriana, responsable de la regresión de los conductos de Muller (Merchant y Moreno, 2003).

El gen *Sry* es expresado en células pre-Sertoli las cuales se diferencian a células de Sertoli al polarizarse formando arreglos epiteliales que se ensamblan dentro de los cordones testiculares (Wilhelm y col, 2007). Se han sugerido dos sitios de proliferación para las células de Sertoli: el epitelio celómico y los mesonefros, ahora se sabe que existen dos estados de proliferación en las gónadas XY. El primero ocurre con una población de células que expresan altos niveles de *Sf1* y contribuyen con las células de Sertoli así como con las células intersticiales. Un segundo estado de proliferación ocurre en el epitelio celómico después de 11.5 dpc en una población que expresan bajos niveles de *SF1* y contribuyen con las células intersticiales (Tilman y Capel, 2002).

Células de Leydig

Estas células esteroideogénicas se diferencian a partir del tejido intersticial y son las encargadas de la síntesis de andrógenos en el testículo, importantes para el establecimiento y mantenimiento de las características sexuales secundarias en los machos.

En los mamíferos existen dos tipos de células de Leydig: las células de Leydig fetales originadas en el mesonefro responsables de la producción de

andrógenos para la masculinización fetal y las células de Leydig adultas. Estas se diferencian después de nacer y proceden de las células precursoras que forman parte de las células mesénquimales del intersticio (Wilhelm y col., 2007). En el ratón su diferenciación se hace evidente a partir de los 14 dpc; se caracterizan por presentar una gran cantidad de mitocondrias de crestas tubulares, organelos característicos de células productoras de esteroides. También se observa un gran desarrollo del retículo endoplásmico liso, aparición de gotas lipídicas e inclusiones de glucógeno en el citoplasma (Russo y col., 1971).

3.- INSULINA

a) Organización molecular del gen

El gen de la insulina se localiza sobre el brazo corto del cromosoma 11 humano, en la región conocida como 11p14.1 y se encuentran asociado con elementos cortos de la familia *Alu* (menor a 400 pb) esparcido en secuencias repetidas de ADN (Pimentel, 1994). El gen consta de tres exones y dos intrones, el exón 1 se localiza en la región 5' no traducible del gen. El segundo exón contiene la secuencia codificadora de la señal peptídica, la cadena B y parte del péptido C. Mientras que el exón 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).

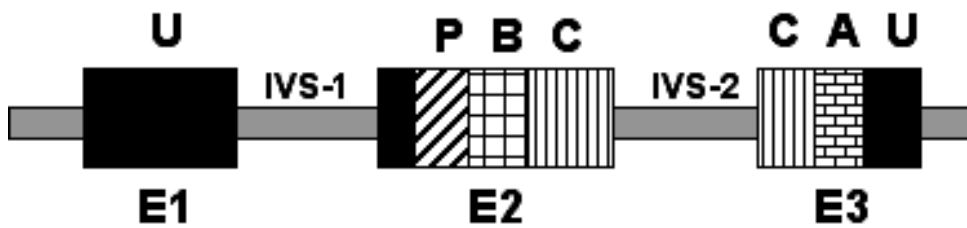


Fig. 8. Estructura del gen, humano, de la insulina (modificado de Clark y Docherty, 1992).

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).

b) Estructura de la proteína

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 acetilcolina, 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).

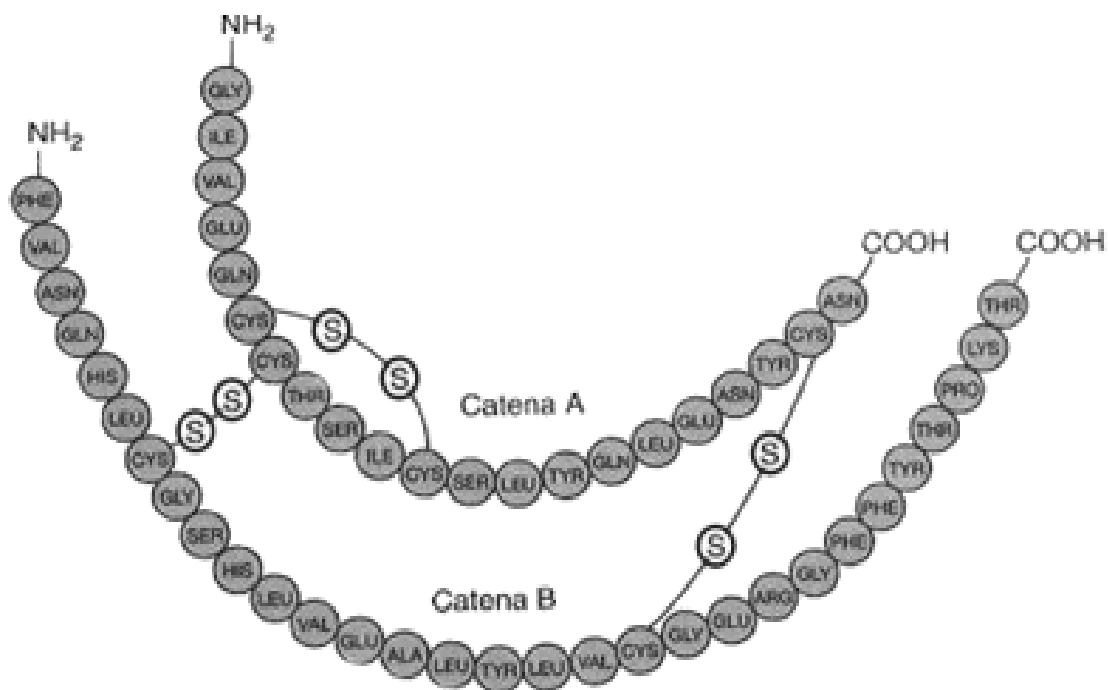


Fig. 9. Estructura de la insulina (Andrew, 1992).

c) Aspectos Metabólicos

La insulina es una hormona anabólica, reguladora del metabolismo celular, además de estimular el crecimiento y la proliferación celulares (Calle y col., 1997). 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. El primer paso de la acción de la insulina es su unión a un receptor específico en la membrana plasmática de la célula diana (Calle y col., 1997). 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.

d) Estudios sobre regulación

Estudios realizados en el 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).

4.- RECEPTOR DE INSULINA

Los efectos de la insulina aparecen como resultado de la unión de la insulina con su receptor que esta presente entre 10^2 a 10^5 veces en la membrana de muchas células animales (Metzler, 2003), variando su concentración desde alrededor de 40 receptores en eritrocitos circulantes a

más de 200 000 receptores en adipositos y hepatocitos (Cecil y col., 2003). El receptor a insulina pertenece a una sub-familia de receptores de tirocina-cinasa que incluyen el receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF)-I y el receptor relacionado con el receptor de insulina (Bastarrachea y col., 2005).

a) Organización del gen

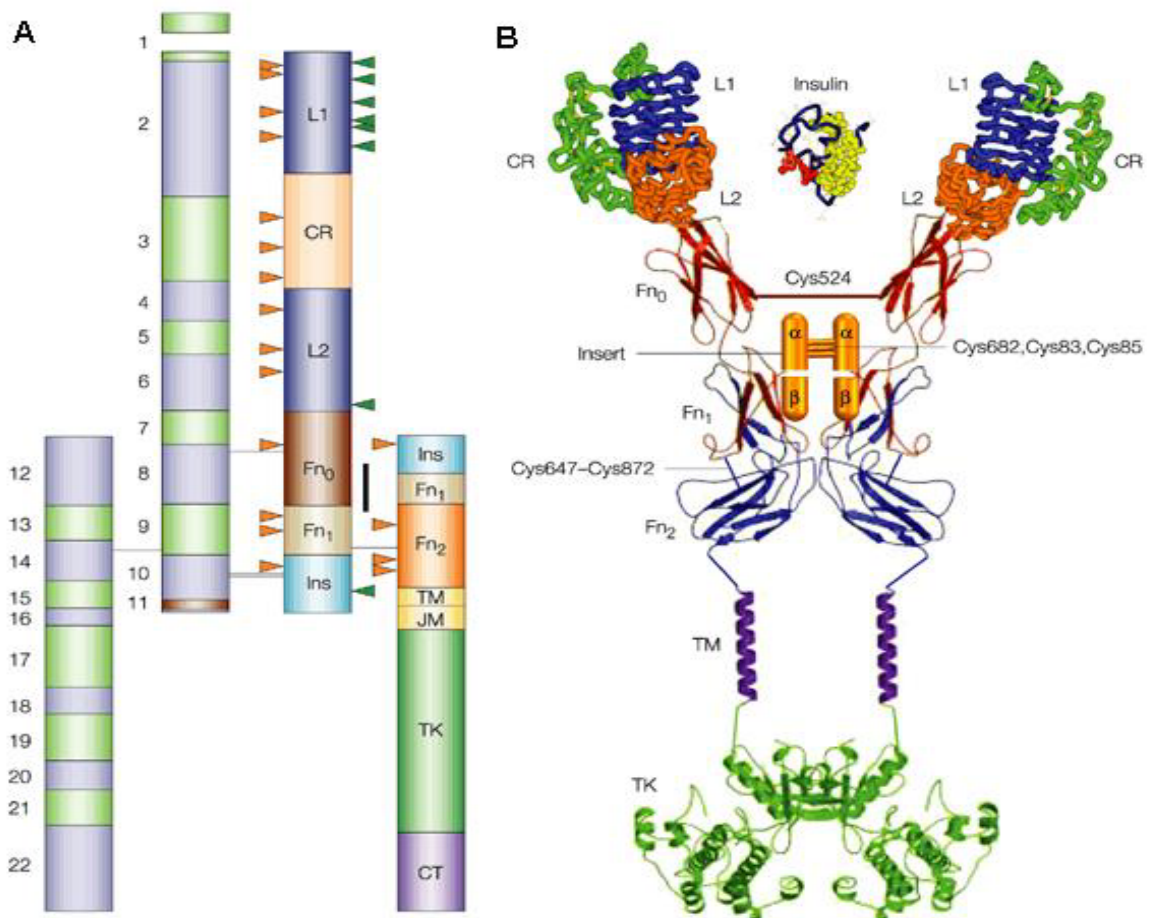
El gen del receptor a insulina en los humanos está localizado en el brazo corto del cromosoma 19, en la región de bandas p13, 3-p13,2. Tiene aproximadamente 150 kilopares de bases (kb) contenidas en 22 exones y 21 intrones. Los 22 exones presentan regiones que varían de tamaño desde 36 a más de 2.500 pb, las cuales dividen al gen del receptor de insulina en segmentos que codifican elementos estructurales y/o funcionales de esta proteína. El último exón de este gen puede ser expresado como varias especies de ARNm, desde 5,7 kb hasta 11 kb, debido a que pueden existir diversos puntos de poliadenilación en múltiples finales 3' (Calle y col, 1997). El ARNm para la forma A carece de 36 segmentos de nucleótido (exón 11) que es descartado durante el empalme. Las cadenas alfa vienen de la porción N-terminal del precursor y las cadenas beta de la parte C-terminal. La forma B del receptor tiene 731 residuos en la cadena α mientras que la forma A tiene 719 residuos en su cadena como resultado de la secuencia que falta del exón 11. Cuatro residuos (732-735 en la forma B) son cortados y eliminados, dejando la cadena β de 620 residuos en ambas isoformas. Las cadenas son unidas por 3 o mas puentes disulfuro.

En el ratón *Mus musculus* el gen del receptor de insulina se localiza en el cromosoma 8 en la región de bandas 8 A1.1; 8 1.0 cM (NCBI, Gene Banner).

b) Estructura y regulación de la proteína

El receptor a insulina es una glicoproteína tetramérica compuesta por dos subunidades alfa (120-135 kd) y dos subunidades beta (95 kd) unidas entre si por puentes disulfuro (Fig. 10). La subunidad α se encuentra localizada extracelularmente, mientras que la subunidad β presenta una porción extracelular, una transmembranal y un dominio intracelular el cual presenta la actividad tirosina-cinasa (Cecil y col, 2003). Las subunidades alfa y beta son formadas a partir de un precursor de cadena sencilla. El precursor del receptor de insulina en humanos existe en dos isoformas, A y B, como resultado de una diferencia en el empalme del ARNm. Las isoformas del receptor de insulina difieren por la presencia o ausencia de 12 aminoácidos en el C terminal de la subunidad α . La isoforma B con los 12 aminoácidos presentes es la forma expresada de manera predominante en los tejidos en los que la insulina actúa más comúnmente para mantener la homeostasis de la glucosa, como lo son grasa, músculo e hígado mientras que la forma A que no tiene los 12 aminoácidos predomina en tejidos como las células beta del páncreas y el cerebro. La isoforma A presenta 2 veces mayor afinidad por la insulina que la isoforma B (Whittaker y col., 2002). Como ya se mencionó el receptor de insulina es sintetizado como un polipéptido precursor que contiene 1343 o 1355 aminoácidos. Durante el transporte hacia la superficie celular el residuo 27 de aminoácido es separado y la cadena de polisacárido se une a sitios específicos de glucosilación. Dos monómeros se unen y forman una estructura dimérica y los sitios de fusión consisten de 4 aminoácidos básicos (Arg-Lys-Arg-Arg;

posiciones 720-723) son transferidos en orden para formar dos subunidades alfa (de 135 kDa) y dos subunidades beta (de 95 kDa). Estas subunidades se unen por medio de puentes disulfuro formando un heterotetrámero $\alpha_2\beta_2$ (Perz y Torlińska, 2001). Dos subunidades alfa idénticas se localizan en la superficie celular y consisten de 719 o 731 residuos de aminoácidos, dependiendo de la presencia o ausencia una cadena de 12 aminoácidos (Perz y Torlińska, 2001).



Nature Reviews | Drug Discovery

Fig. 10. Receptor de Insulina. Modificado de De Meyts y Whittaker, 2002. **A.** Estructura $\alpha_2\beta_2$. **B.** Dominios del receptor a insulina.

La insulina circulante rápidamente alcanza sus tejidos blanco donde interactúa con su receptor correspondiente. La insulina al unirse a regiones específicas de la subunidad α , da lugar a un inmediato cambio configuracional en el receptor que ocasiona la autofosforilación de los residuos específicos Tir en la región intracelular de las subunidades β a través de un mecanismo de transfosforilación, iniciándose la actividad de tirosina cinasa del receptor (Fig. 11). La autofosforilación de residuos Tir en las posiciones 1,158, 1,162 y 1,163 ocasiona un cambio conformacional que permite al ATP y los sustratos alcanzar el sitio catalítico. La cinasa activada fosforila proteínas sustrato en los residuos Tir, y estos residuos sirven como sitios de acoplamiento para los efectores del receptor, que posteriormente transmitirán la señalización molecular intracitosólica hacia el núcleo celular. Se han podido identificar genes que expresan proteínas como las moléculas *Shc*, las proteínas que integran los sustratos del receptor de insulina (IRS), y *Gab-1* entre otras, las cuales se enlazan directamente al receptor de insulina, proporcionando un área física de acoplamiento para los sustratos encargados de transmitir la señalización del receptor hacia el interior del citosol. Las proteínas del receptor de insulina denominadas IRS contienen un dominio conservado PH localizado en la porción terminal proteica $-NH_2$, cuya función es mantener a las proteínas del receptor IRS unidas y en proximidad cercana al receptor. Las proteínas IRS también cuentan con otro dominio de unión fosfato-Tir denominado PBT con una porción C- terminal cercana al dominio PH. El dominio PBT, presente en un número importante de moléculas de señalización, funciona como un elemento de acoplamiento para promover la interacción entre el receptor de insulina y la

proteína IRS-1. La región terminal COOH- de las proteínas IRS no se encuentra muy conservada. Contiene múltiples motivos de fosforilación Tir cuya función es servir como sitios de acoplamiento para proteínas que contienen dominios SH2, como serían la subunidad reguladora p85a de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI-K3), el receptor del factor de crecimiento de la proteína -2 de unión (GRB2), Nck, Crk, Fyn, SHP-2 y otras, todas las cuales interviene como mediadoras de las funciones metabólicas y en las funciones promotoras de crecimiento de la insulina. La señalización del receptor a insulina involucra dos vías principales: la vía de la proteína cinasa activadora de la mitogénesis (MAP) denominada vía mitogénica y la fosfatidilinositol-3-OH cinasa estimulada por la insulina (PI-K) denominada vía metabólica. La vía de las MAP cinasas es activada cuando se une Grb2 a Shc Tir-fosforilado, o al IRS vía su dominio SH2. A su vez, Grb2 se encuentra ligada a una proteína de intercambio de nucleótidos denominada Son of Sevenless o mSOS de mamíferos, que cataliza el intercambio de GDP por DTP en una pequeña proteína cinasa denominada Ras, resultando en su activación. La proteína Ras activada se une a la parte interna de la membrana plasmática, reclutando y uniendo a la membrana plasmática la región NH2-terminal de otra proteína denominada Raf. La interacción Ras-Raf desplaza las proteínas 14-3-3 que están ligadas a Raf por un número de cinasas Ser/Tr, desinhibiendo y liberando de esta manera a la cinasa Raf. Raf-1 activa una cinasa de especificidad dual, la MEK1 activa otras dos cinasas reguladoras de señales extracelulares denominadas ERK-1 y ERK-2 al fosforilar residuos regulatorios Tir y Tr. Este paso es sumamente importante ya que las señales ERK activadas son las mediadoras de los efectos mitogénicos y anabólicos de la insulina, ya que inducen la fosforilación

de los factores de transcripción nucleares tales como Elk-1, que inducen la expresión de genes cuyos efectos se relacionan con las acciones del factor de crecimiento tisular de la insulina.

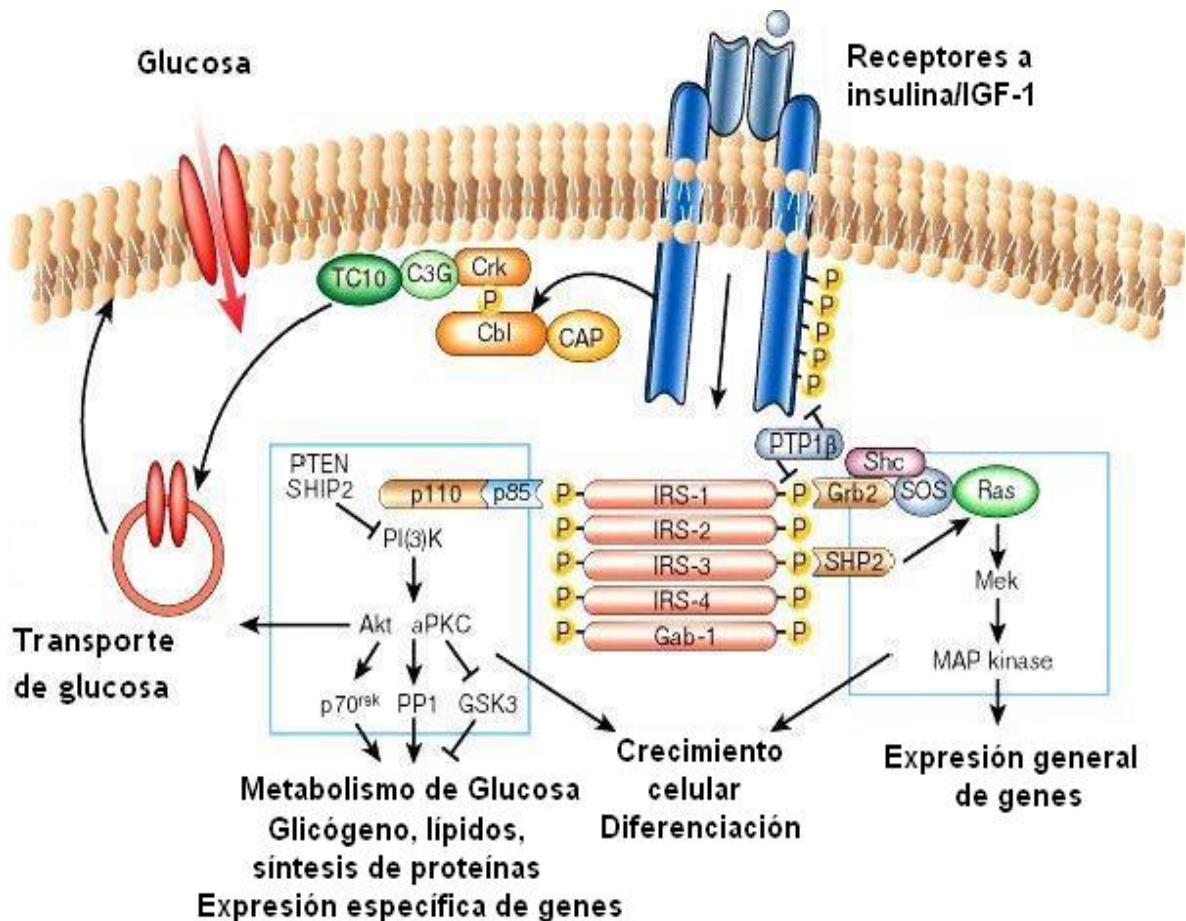


Fig. 11 .Vía de Señalización de la insulina. Modificada de Saltiel y Kahn, 2001.

La vía de la PI-3k es la principal mediadora de los efectos de la insulina. La secuencia inicia con la asociación del complejo de proteínas p85/p110 la PI-3K con las proteínas del IRS. La activación PI-3K estimula la producción de una enzima denominada PIP3, activando a su vez PDK1. Esta enzima fosforila y activa la proteína Akt, y ese es el paso importante en el transporte de glucosa

al interior de la célula, facilitado por la insulina. Akt interviene en la regulación de la translocación de GLUT 4, el transportador de glucosa más importante sensible a insulina que se expresa en el músculo y células adiposas (Bastarrachea y col., 2005).

Transportadores de Glucosa

En los años recientes se han descubierto dos familias transportadoras de glucosa en las células:

Las transportadoras unidas a sodio o SGLT (*sodium-glucose transporters*) se muestran en el cuadro 2, están restringidas al intestino y al riñón, que llevan glucosa en contra de un gradiente de concentración (Valencia, 2006). Las transportadoras de glucosa llamados GLUT (*glucosa transporters*) mostrados en el cuadro 3, que facilitan la difusión de la glucosa hacia el interior de la célula por gradiente de concentración (Valencia, 2006).

Cuadro 2. Características de los transportadores de glucosa SGLT

Isoforma	# aa	KM glucosa (mM)	Monosacáridos que transporta	Localización en los tejidos	Función
SGLT 1	664	0.3	Glucosa, galactosa	Intestino delgado, neurona proximal.	Absorción y reabsorción de glucosa.
SGLT 2	672	1.6	Glucosa, galactosa	Neurona proximal.	Absorción y reabsorción de glucosa.
SGLT 3	674	6.0	Glucosa, galactosa	Sin determinar.	Absorción y reabsorción de glucosa.

K_M constante de Michaelis-Menten, NA no aplicable. Modificado de Diaz y col., 1999.

Cuadro 3. Características de los transportadores de glucosa GLUT

Isoforma	# aa	K _M glucosa (mM)	Monosacáridos que transporta	Localización en los tejidos	Función
GLUT-1	664	1.6	Glucosa, galactosa.	Eritrocitos, barrera hematoencefálica, placentaria y de la retina, astrocito, nefrona.	Ingreso basal de glucosa.
GLUT-2	522	17	Glucosa, galactosa, fructosa.	Células b pancreáticas, hígado, intestino delgado, nefrona proximal.	Sensor de glucosa en páncreas, transporte de glucosa en la membrana basolateral del intestino y riñón.
GLUT-3	596	2	Glucosa, galactosa.	Cerebro, placenta, hígado y corazón.	Ingreso basal de glucosa.
GLUT-4	509	5	Glucosa.	Músculo esquelético, cardiaco y tejido adiposo.	Ingreso de glucosa estimulado por insulina.
GLUT-5	501	No aplica	Fructosa. No muestra afinidad por glucosa.	Yeyuno, espermatozoides, riñón, células de la microglia.	Transporte de fructosa.
GLUT-6	507		Glucosa	Cerebro, bazo y leucocitos.	Ingreso de glucosa estimulado por insulina.
GLUT-7				No existe.	
GLUT-8	477		Glucosa	Testículos y placenta.	Ingreso de glucosa.
GLUT-9	540		Glucosa.	Riñón e hígado.	Ingreso de glucosa
GLUT-10	541		Glucosa	Hígado y páncreas	Ingreso de glucosa
GLUT-11	496		Glucosa	Músculo esquelético y corazón	Ingreso de glucosa
GLUT-12	617		Glucosa	Músculo esquelético, tejido adiposo, intestino delgado.	Ingreso de glucosa
GLUT-13	629		Glucosa	Cerebro	Ingreso de glucosa y mioinositol

K_M constante de Michaelis-Menten, NA no aplicable. Modificado de Diaz y col., 1999.

c) Estudios realizados en diferentes especies

La actividad de tirocina cinasa del receptor a insulina es esencial para la acción de la insulina. Una mutación en residuo de lisina en la posición 1018, sitio de unión del ATP, resulta en la inactivación total del receptor. Asimismo, mutaciones *in vitro* de las tirosinas 1150 y 1151 por fenilalaninas resultan en una deficiencia en la actividad de cinasa del receptor a insulina provocando una ineficiente transducción de la señal (Kahn y White, 1988).

Estudios en varias especies de peces han indicado la presencia de un receptor específico para insulina. El número de receptores en músculo esquelético de peces es mucho menor que en mamíferos. La unión del receptor hacia la insulina en músculo esquelético es mucho mayor en peces carnívoros que en omnívoros. En peces, al igual que en los mamíferos, el receptor a insulina consta de dos subunidades α y dos β unidas por enlaces disulfuro formando un tetrámero. La subunidad α del receptor a insulina y del IGF-1 tiene un peso aproximado de 115 kDa, ligeramente menor que en los mamíferos, y contiene el sitio de unión. La subunidad β del receptor a insulina e IGF-1 tiene un peso aproximado de 95 kDa y contiene el dominio transmembranal, intracelular y tirocina cinasa. La existencia de un cierto grado de variación entre el aparente peso molecular entre las subunidades a y b de peces y mamíferos ha sido atribuido a diferencias de glicosilación (Planas y col., 2000).

III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

Investigaciones realizadas en tejido adulto demostraron que la insulina participa en la proliferación y secreción de esteroides. Asimismo, estudios recientes en nuestro laboratorio han demostrado que la insulina ayuda a la proliferación celular, para lo cual es necesario interactuar con su receptor. Sin embargo no se ha demostrado la presencia de este en células embrionarias.

Hipótesis

Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que las células de Sertoli del testículo fetal a los 16 y 17 d.g. proliferan en presencia de insulina. Por lo tanto es probable hipotetizar que el receptor a insulina se expresaría en las células de Sertoli en las edades mencionadas.

IV.- OBJETIVOS

Objetivo General

- Establecer si el receptor a insulina se expresa en células embrionarias del testículo fetal del ratón *Mus musculus* CD1.

Objetivos Particulares

- Estandarizar la técnica de Western-Blot para la identificación del receptor a insulina en células de Sertoli en el testículo fetal del ratón *Mus musculus* CD1 a los 16 días de gestación.
- Establecer la expresión del receptor a insulina en células de Sertoli en el testículo fetal del ratón *Mus musculus* CD1 a los 16 y 17 días de gestación.
- Determinar por Inmunocitoquímica la presencia del receptor a insulina en células de Sertoli a los 17 d.g.

V.- MATERIAL Y MÉTODOS

a) *Material Biológico*

Se utilizaron ratones machos y hembras de 10 semanas de edad de la cepa CD-1; se colocó a cada macho con 5 hembras. El día que se observó el tapón vaginal se denominó día cero de la gestación. Se emplearon hembras gestantes de 16 y 17 días de gestación (d.g.) de la cepa CD-1, y se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas en cajas estériles con Sani-Chips de Harlan con periodos de 12 horas de luz-oscuridad y temperatura de 22 a 23°C. Las ratonas se alimentaron con Diet Mouse Food de Harlan y agua esterilizada *ad. Libitum* acidificada con HCl puro (pH 2.5), filtrada por osmosis inversa y esterilizada en autoclave.

b) *Aislamiento del tejido*

Las hembras se sacrificaron por dislocación cervical y se realizó un corte en forma de V en la región ventral. Se aisló el útero, se sacaron los embriones en una caja de Petri estéril y se decapitaron. Los testículos de los embriones se obtuvieron exponiendo la parte dorsal interna del embrión y se colocaron en cajas de Petri estériles con medio de cultivo M199, en un ambiente estéril, de acuerdo con el método descrito (Villalpando y López Olmos, 2003). Posteriormente se transfirieron a un tubo Ependorf estéril.

- *Purificación de las células de Leydig y Sertoli*

Se aislaron un promedio de 30-40 gónadas de cada edad experimental. 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 μ L de PBS, 10 μ L de Colagenasa (0.2 mg/ml) y 20 μ L de DNAasa (0.01 mg/ml). Se incubó el tejido durante 3 min. a 37°C. Y se disgregaron manualmente. Después de este tiempo se agregó 110 μ l de Inhibidor de Tripsina al 0.2 %. Se mezcló para homogeneizar y detener completamente la reacción y se agregó 390 μ l de PBS filtrado. Se centrifugó a 3000 rpm., por 15 min. Se decantó el sobrenadante. Se lavó con 500 μ l de PBS y se centrifugó a 3000 rpm., por 2 min., dos veces. Las células se resuspendieron 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 μ l de medio de cultivo suplementado. Las células de Sertoli se lavaron con 1 mL de PBS filtrado y se resuspendieron 500 μ l de medio de cultivo suplementado.

- *Conteo de células*

Después de la purificación de las líneas celulares 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 μ L de la suspensión

celular y 10 μ L del colorante y se mezclaron perfectamente, después se adicionó un volumen de 10 μ L 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:

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

c) *Cultivo celular*

Se realizaron cultivos celulares para cada una de las etapas celulares. Para la Inmunocitoquímica se sembraron 5,000 células de Leydig y 20,000 células de Sertoli en cada portaobjeto, dentro de cajas de 20 pozos (Nuclon). Las células de Leydig fueron cultivadas con 450 μ L de medio D'MEM y 50 μ L de suero Bovino Fetal. Las células de Sertoli fueron cultivadas con 225 μ L de medio D'MEM, 225 μ L de medio F-12 y 50 μ L de Suero Bovino fetal. El cultivo celular se dejó 24 h a 37 °C con 5% de CO₂. Después las células se lavaron y se realizó un cambio de medio para cada tipo celular eliminando el Suero bovino fetal. El cultivo celular se dejó 24 h a 37 °C con 5% de CO₂. Se lavaron y fijaron con metanol absoluto durante 30 minutos. Para el Western Blot se sembraron el resto de las células de Sertoli y Leydig en cajas de cultivo. Las células fueron cultivadas bajo las mismas condiciones que los portaobjetos. Después de 24 horas se eliminó el Suero Bovino Fetal y se hizo un cambio de medio. Se revisaron cada 24 horas para verificar su crecimiento. Se dejaron crecer durante 5 días y se recuperaron usando tripsina y posteriormente un inhibidor de tripsina.

d) *Cuantificación de proteínas por el método de mini-Bradford*

La determinación de proteína se realizó por el método de mini-Bradford usando cajas de plástico de 96 pozos (Nuclon). Se realizó una curva patrón con un stock de BSA (1mg/mL) con concentraciones de los 2 $\mu\text{g/mL}$ a los 32 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a 595 nm.

e) *Estandarización de la técnica de Western blot*

Separación de la proteína en geles de Acrilamida

Para la determinación del receptor de insulina se prepararon geles de Acrilamida de 8%, 9% y 10%. Se trabajó con muestras de proteína de 10, 15, 30 60 y 89 μg para cada tipo celular. Las muestras fueron desnaturalizadas con calor y sin calor, además de 1 μL de β -mercaptoetanol y se corrió el gel a 85 volts. Posteriormente el gel se transfirió en una membrana de nitrocelulosa usando una cámara de transferencia semi-húmeda durante 30 minutos a 7 y 8 volts.

Determinación del porcentaje óptimo para el bloqueo de la actividad Inespecífica

Se probaron dos soluciones bloqueadoras: BSA 5% y Leche Svelty 5%, usando dos tiempos de bloqueo, 1 hora a temperatura ambiente o 12 horas a 4⁰C. se probaron dos porcentajes de Tween: 0.05% y 0.1%.

Incubación con Anticuerpos y estandarización de la dilución óptima

Se usaron diluciones de anticuerpo primario anti-mouse insulin (Calbiochem) de 1:1000, 1:500 y dilución de anticuerpo secundario rabbit- anti mouse

(Zymed) de 1:5000. Los tiempos de incubación se probaron de 1 hora a temperatura ambiente y 24 horas a 4⁰C para el anticuerpo primario. Para el anticuerpo secundario el tiempo de incubación fue de dos horas a temperatura ambiente.

f) *Expresión del receptor a insulina*

Para la determinación del receptor de insulina se preparó un gel de acrilamida al 10%. Se usaron 15 µg de células de Sertoli y hasta 28.8 µg de células de Leydig, se desnaturalizaron con calor por 5 minutos y 1µL de β-mercaptoetanol y 5µL de buffer de carga (ver apéndice). Se usaron 3µL de See Blue LC 5625 (Invitrogen) como marcador de peso molecular. Se corrió el gel a 85 volts en una cámara de electroforesis Bio-Rad. Posteriormente se transfirió el gel en una membrana de nitrocelulosa usando una cámara de transferencia semi-húmeda 30 minutos a 8 volts. Enseguida se lavó 2 veces 5 minutos en cada ocasión (2 x 5) la membrana con una solución PBS-Tween 0.1% y bloqueamos con una solución de Milk 5%- PBS 5%-Tween 0.1% durante una hora a temperatura ambiente. Se lavó una vez con PBS 5%-Tween 0.1% e incubamos con el anticuerpo primario, preparado en Milk 5%- PBS 5%-Tween 0.1% (mouse-anti insulin receptor) 1:1000 24 horas, 4⁰C.

Lavamos la membrana con PBS 5%-Tween 0.1%, preparamos el anticuerpo secundario 1:5000 rabbit anti-mouse HRP preparado en PBS 5%-Tween 0.1% dos horas a temperatura ambiente. Lavamos 3 veces por 5 minutos con PBS 5%-Tween 0.1%. Revelamos por un minuto con el sustrato peroxidado LC Supersignal West Dura Extended (Pierce). Revelamos en placas fotográficas

de alta sensibilidad por 10 minutos. Finalmente se determinó el peso molecular del receptor a insulina.

Determinación del peso molecular del receptor a insulina

Se obtuvo el r_f del marcador de peso molecular See Blue LC 5625 (Invitrogen) y se hizo una relación de r_f vs. Marcador de peso molecular. Se obtuvo el r_f de la muestra experimental del receptor a insulina y se intrapolo en la curva.

g) Inmunocitoquímica

Las células de Leydig y Sertoli sembradas en portaobjetos se lavaron con PBS por triplicado durante 5 minutos. Después se incubaron con H_2O_2 por un período de 10 minutos y se volvieron a lavar con PBS por 5 minutos. Se incubaron con la solución de bloqueo por 1 hora (Ver apéndice) y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario anti-mouse insulín receptor (Calbiochem) usando una dilución 1:10. Lavamos con PBS Tween 0.05% durante 5 minutos por triplicado. Incubamos con el anticuerpo secundario rabbit-anti mouse (Zymed) dilución 1:100 durante 1 hora. Lavamos con PBS-Tween 0.05% por triplicado durante 5 minutos. Adicionamos la solución ABC (Ver preparación en el apéndice) durante una hora. Lavamos con PBS 0.1M con NaCl durante 5 minutos. Adicionamos el sustrato de DAB por 30 minutos. Enjuagamos con agua bidestilada. Las laminillas se observaron en un microscopio Nikon Eclipse TE-200.

VI.- RESULTADOS

Expresión del receptor a insulina en las células somáticas testiculares del ratón

En esta investigación no se analizó la expresión del receptor a insulina en edades previas como 12 y 14 d.g. debido a que en la última edad esta proteína se expresa poco (datos no mostrados).

La Inmunocitoquímica demostró la expresión del receptor a insulina en las células somáticas de:

a) Sertoli

En este estudio se determinó por inmunocitoquímica la expresión del receptor a insulina en las células de Sertoli, con esta aproximación técnica observamos que esta molécula se expresa principalmente en dos sitios. Se observó en el citoplasma de las células como era esperado debido a que el anticuerpo utilizado detecta la subunidad β intracitoplásmica del receptor a insulina (Fig. 12A). En otro grupo de células de Sertoli se encontró una mayor expresión del receptor a esta proteína en el núcleo de este tipo celular, aunque la expresión de ésta en el citoplasma fue menor (Fig. 12B). Los controles mostraron tinciones negativas en los grupos de células de Sertoli observados, puesto que no se detectó la expresión del receptor a insulina (Fig. 12C y 12D respectivamente).

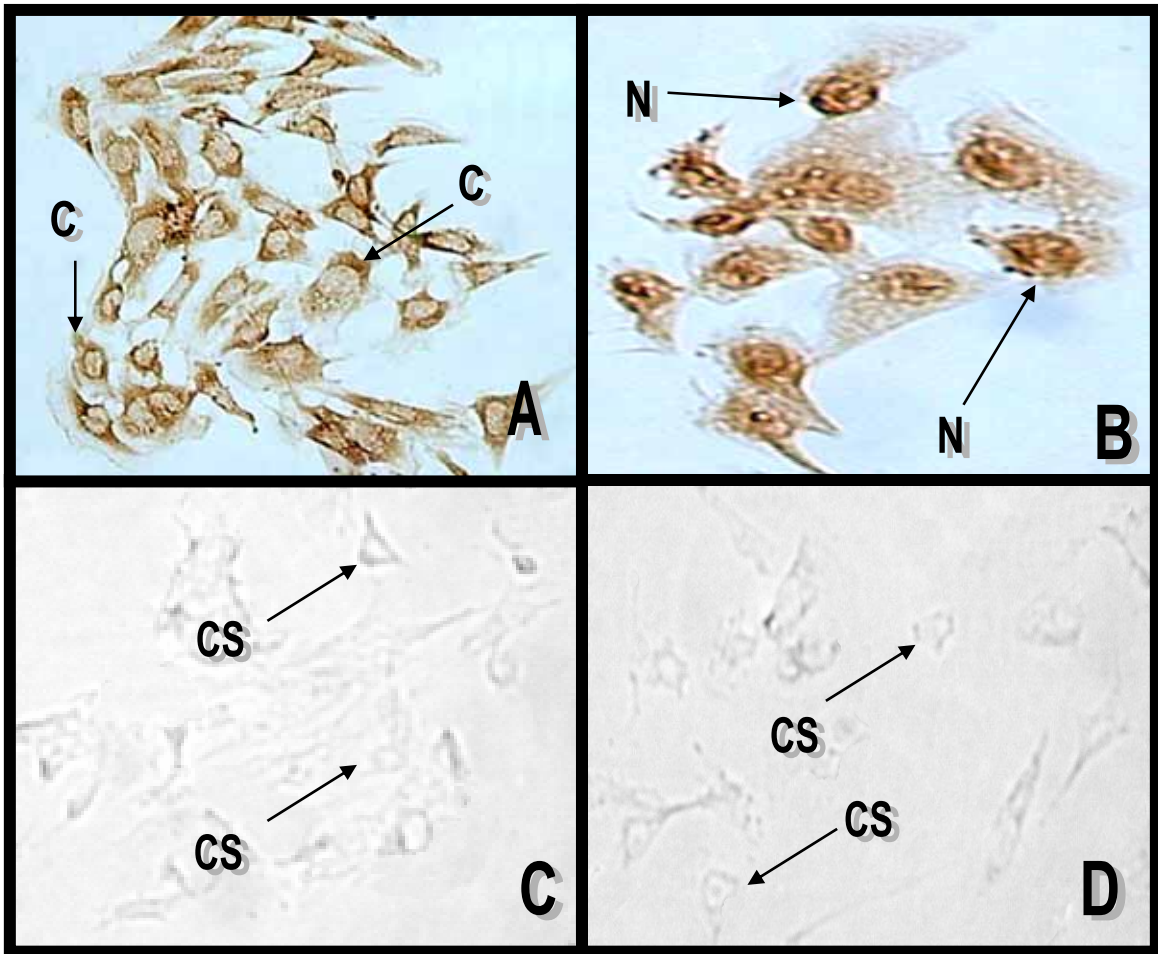


Fig. 12. **Expresión del receptor a insulina en células de Sertoli de 17 d.g.**

A. Se observa la presencia del receptor en el citoplasma de las células. 20X. **B.** Note la distribución del receptor en el núcleo de las células de Sertoli. 40X. **C** y **D** controles del receptor a insulina. 20X. Citoplasma (C); Núcleo (N) y Células de Sertoli (Cs).

b) Leydig

En las células de Leydig la inmunocitoquímica reveló también la presencia del receptor a insulina de forma predominante en dos regiones de la célula. En el citoplasma de las células se detectó una inmunodetección moderada y una mayor expresión en el núcleo (Fig. 13A), también se observó

mayor expresión en la región perinuclear, alrededor de la envoltura nuclear, y una menor expresión en el citoplasma (Fig. 13B). En el grupo control no se detectó ninguna inmunoreactividad a la subunidad β del receptor a insulina (Fig. 13C y 13D).

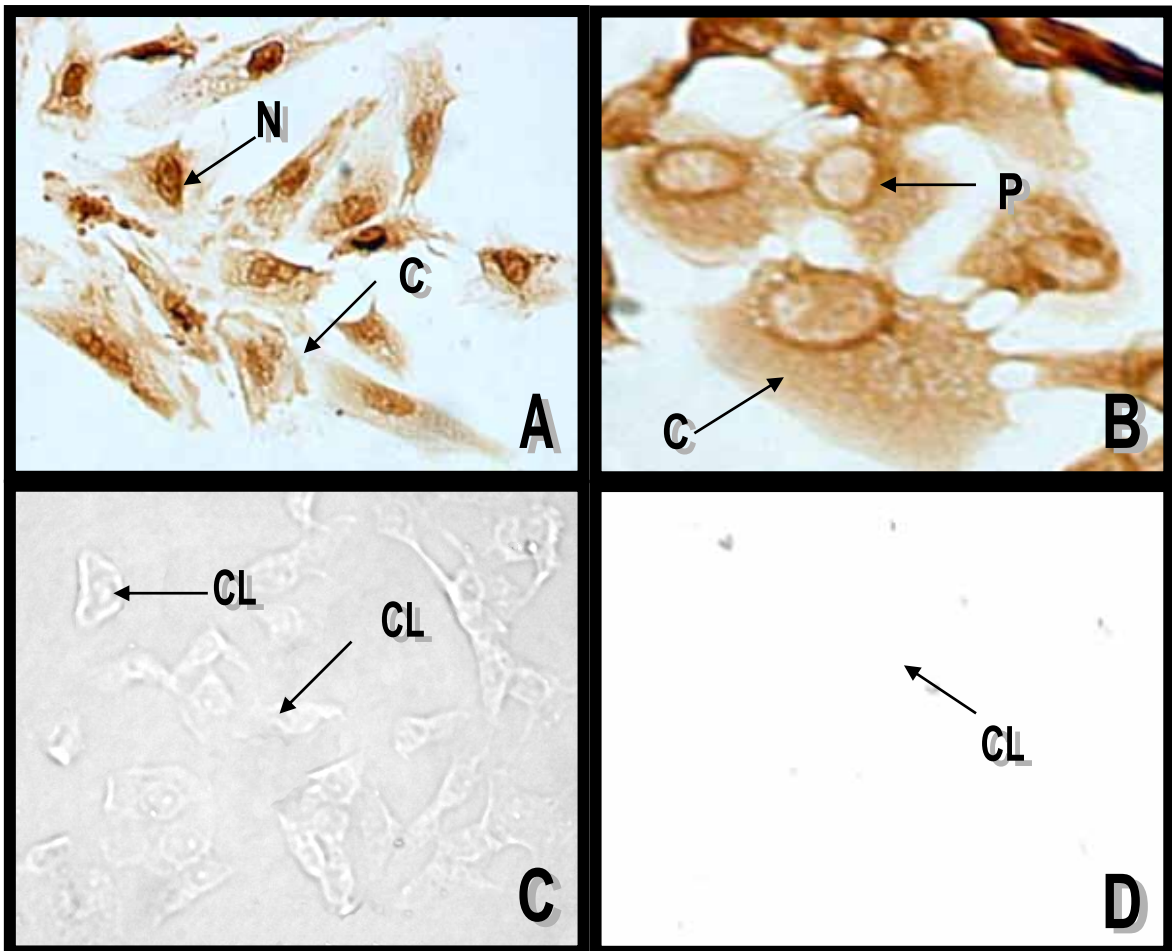


Fig. 13. **Immunodetección del receptor a insulina en células de Leydig de 17 d.g.** **A.** Se observó una fuerte reacción del receptor a insulina alrededor del núcleo. 20X. **B.** Se detectó también alrededor del núcleo. 100X. **C** y **D** controles, 20X respectivamente. Citoplasma (C); Núcleo (N); Región perinuclear (P) y Células de Leydig (CL).

c) Determinación del número de células somáticas

El número de células de Leydig y Sertoli se determinó en una cámara de Neubaüer. Se empleó la siguiente ecuación:

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

Tipo celular	X	células/ μL
Leydig	352	880
Sertoli	2564	6410

X = número de células en 4 cuadrantes
c = 2500

d) Cuantificación de proteínas por el método de mini-Bradford

*Cuadro 4. Curva de proteína total en células somáticas del testículo de ratón *Mus musculus**

[$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	BSA [$1\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	H ₂ O	Bradford μL
0	0	160	40
2	2	158	40
4	4	156	40
8	8	152	40
16	16	144	40
32	32	128	40

e) Curva patrón de proteína total en células somáticas testiculares embrionarias

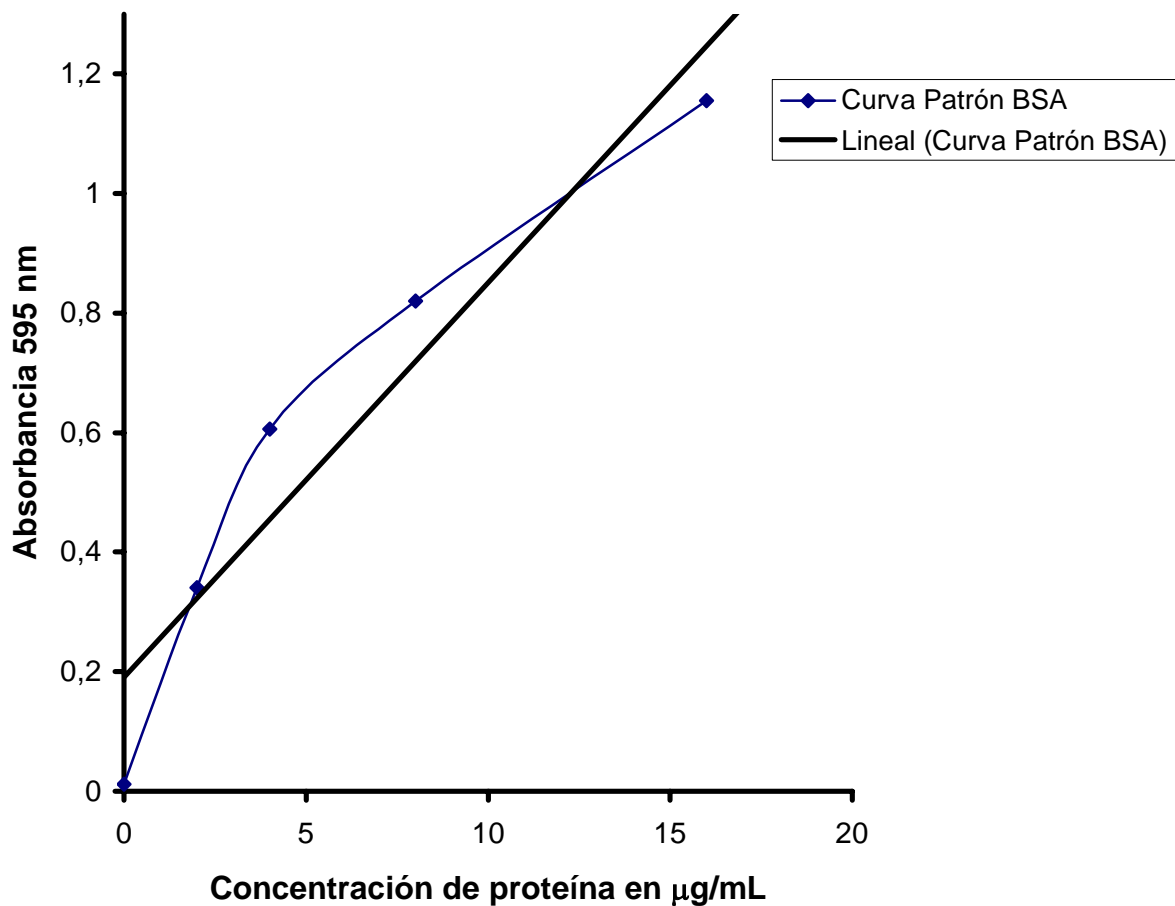


Fig. 14. Curva patrón de BSA (1µg/µL) para la cuantificación de proteína total por mini-Bradford en células de Sertoli y Leydig de 16 d.g.

Se determinó el valor del coeficiente de correlación el cual fué de $r^2 = 0.9042$ y la ecuación de regresión obtenida fué de $y = 0.066x + 0.1908$

Cálculo de la proteína total en las muestras:

Leydig: 1.44 µg/µL de proteína

Sertoli: 4.99 µg/µL de proteína

f) Western Blot

Los resultados del Western blot evidenciaron la presencia de la subunidad $\beta 1$ del receptor a insulina en las células de Sertoli. El peso de esta subunidad fué determinado estableciendo con una relación entre la distancia que migró la proteína o R_f (cm) del blot contra el marcador de peso molecular (kDa) del marcador (See Blue, Invitrogen).

g) Determinación del Peso Molecular de la subunidad $\beta 1$ del Receptor a Insulina

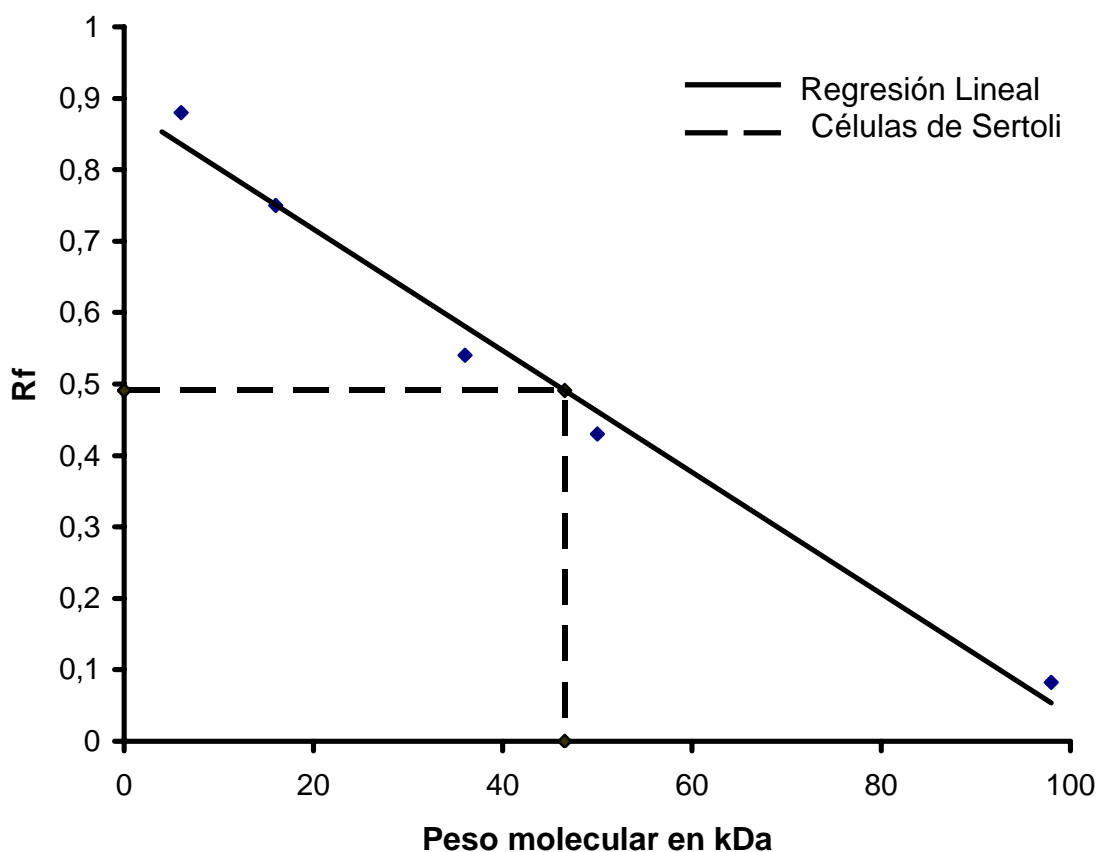


Fig. 15. Curva patrón del marcador de peso molecular See Blue (Invitrogen) para la determinación del peso molecular del receptor a insulina (subunidad $\beta 1$) en células de Sertoli y Leydig de 17 d.g.

Una vez obtenido el coeficiente de correlación de $r^2 = 0.9858$ y la ecuación de regresión $y = -0.0085x + 0.8866$ se determinó el peso molecular del receptor. Se encontró que el peso molecular de la subunidad $\beta 1$ del receptor fué de 46.6 kDa.

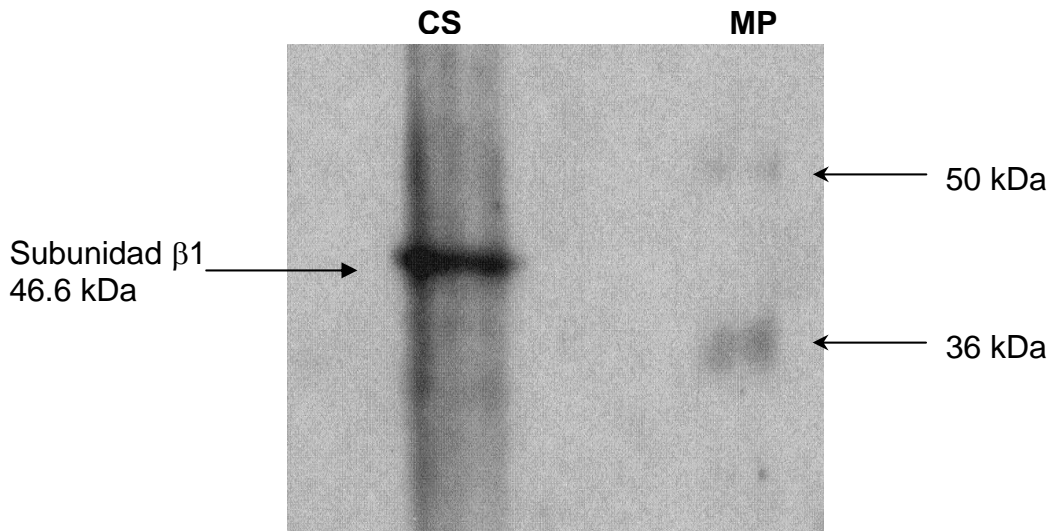


Fig. 16. Western blot del receptor a Insulina. Se muestran los pesos moleculares del marcador de peso molecular correspondiendo 50 kDa a la enzima alcohol deshidrogenasa y 36 kDa de la enzima anhidrasa carbónica. La subunidad $\beta 1$ del receptor a insulina se encuentra alrededor del peso molecular descrito (de 40 – 49 kDa dependiendo de la especie de estudio). MP marcador de peso molecular, CS células de Sertoli.

VII Discusión

En la presente investigación se analizó la expresión del receptor a insulina en las células somáticas fetales del ratón a los 16 y 17 d.g. Los resultados de la inmunocitoquímica en las células de Sertoli mostraron la presencia del receptor a insulina en el citoplasma y alrededor de la envoltura nuclear (Fig. 12). Este hallazgo puede ser explicado debido a que en el momento de la fijación de las células el receptor a insulina se encontraba siendo trasladado hacia el núcleo como se puede apreciar en la Fig. 12A. Estas observaciones apoyan investigaciones previas donde se detectó la translocación del substrato receptor a insulina tipo I hacia el núcleo en células 3T3 de embrión de ratón por inmunoprecipitación (Chen y col., 2005). Como se mencionó para no desperdiciar las células de Leydig se procesaron simultáneamente para la detección del receptor. El conteo de células de Sertoli y Leydig para el Western blot mostró que la cantidad de células en el primer tipo celular fué mucho mayor que las segundas. Esto debido a que estas últimas se desarrollan con mayor dificultad en contraste con las primeras que crecen con mayor facilidad. La determinación de proteína total por el método de mini-Bradford mostró que la cantidad de esta en las células de Sertoli fué de $4.99 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína, valor mucho mayor comparado con $1.44 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína observado en las células de Leydig (Fig. 14). Los resultados del análisis por Western-blot arrojaron que la subunidad $\beta 1$ del receptor se encuentra presente en las células de Sertoli y tiene un peso molecular de 46.6 kDa. Sin embargo no fuimos capaces de demostrar la presencia de esta proteína en las células de Leydig (Fig. 15 y 16). El peso molecular determinado

de la subunidad $\beta 1$ en células de Sertoli se encuentra cercano al reportado en otras especies, siendo de 40 - 45 kDa en la placenta humana (Boyle y col., 1984), y de 45 – 49 kDa en adipocitos de rata (Massagué J, 1982).

En la inmunocitoquímica las células de Leydig muestran también un desplazamiento del receptor a insulina hacia el núcleo y observamos una mayor cantidad de esta proteína en el citoplasma (Fig. 13). La cantidad de proteína recuperada en las células de Leydig pudo afectarse por el tiempo de tripsinización al momento de despegar las células de las cajas de cultivo. Sin embargo, esta posibilidad se descarta debido a que el tiempo de tripsinización fue controlado estrictamente. Es probable que el pobre crecimiento de las células de Leydig sumado a su menor tamaño resultó en la menor cantidad de proteína total recuperada para este tipo celular. Probablemente la cantidad de receptor a insulina contenido en las células de Leydig no es suficiente para dar una señal visible por Western-blot pero si para determinar su expresión por inmunocitoquímica. Esta aseveración se basa en que debido a que las células de Leydig en cultivo tienen una mayor superficie de contacto para los anticuerpos; además de que el antígeno se encuentra en su forma nativa. Es posible que una fracción del receptor a insulina de las células de Leydig se haya quedado en la fracción del sobrenadante obtenido después de la homogenización y al momento de concentrar el botón, que contiene el paquete celular, se haya perdido haciendo más difícil su localización por Western-blot. Es probable que las células de Sertoli y Leydig expresen diferente número de receptores a insulina. Las células de Leydig participan en la biosíntesis de hormonas sexuales para la masculinización del feto y presentan una gran cantidad de mitocondrias, mientras que las células de Sertoli son las

encargadas de la diferenciación de las distintas líneas celulares en el feto y durante el desarrollo gonadal presentan una gran actividad metabólica. Debido a esto, es probable que estas últimas expresen una mayor cantidad de receptores. Estos resultados son apoyados por estudios previos en nuestro laboratorio donde se demostró que la insulina tiene un efecto positivo en la proliferación de las células de Leydig (Santa Maria, 2007). Además de regular la biosíntesis de testosterona (Velázquez, 2007). En conjunto, estas observaciones confirman la hipótesis planteada de que el receptor a insulina, a través del cual actúa la principal hormona anabólica del organismo, se encuentra presente en las células embrionarias del ratón *Mus musculus*.

VIII.- CONCLUSIONES

- La estandarización de la técnica de Western-blot para la determinación del receptor a insulina en células de Sertoli de 16 d.g. fue realizada con éxito.
- El receptor de insulina se expresa en las células de Sertoli en el testículo fetal de los ratones *Mus musculus* a los 16 y 17 d.g.
- La subunidad $\beta 1$ del receptor a insulina tiene un peso molecular de 46.6 kDa en las células de Sertoli de 16 d.g.
- En los experimentos previos realizados con las células de Leydig solo se demostró la presencia del receptor a insulina por Inmunocitoquímica.

IX.- REFERENCIAS

- Andrew A., Rawdon BB. 1992. Can a non-gut mesenchyme support differentiation of gut endocrine cells? **Anat Embryol.** 185; 5:509-516.
- Arango AN., 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.
- Ashcroft FM., Stephen HJ. 1992. **Insulin: Molecular biology to pathology.** IRL Press. Pag 37-46.
- Bastarrachea RA., Laviada-Molina H., Machado-Dominguez I., Kent J., Lopez-Alvarenga JC., Comuzzie AG. 2005. El receptor de insulina como objetivo farmacogenómico: potenciando su señalización intracelular. **Rev Edocrinol Nut.** 13; 4: 180-189.
- Boyle TR., Campana J., Sweet LJ. and Pessin JE. 1985. Subunit structure of the purified human placental insulin receptor. Intramolecular subunit dissociation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **J Biol Chem.** 260; 14: 8593-8600.
- Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem.** 7; 72: 248-254.
- Calle C., Campión J., Maestro B., Dávila N. 1997. Modulación de la expresión del gen del receptor de insulina por hormonas esteroideas: Consecuencias patológicas. **Av. Diabetol.** 13:1-10.

- Capel B., Albrecht KH., Washburn LL., Eicher EM. 1999. Migration of mesonephric cells into the mammalian gonad depends on *Sry*. **Mech Dev.** 84; 1-2:127-131.
- Chen J., Wu A., Sun H., Drakas R., Garofalos C., Cascio S., Surmacz E., Baserga R. 2005. functional significance of type 1 insulin-like growth factor-mediated nuclear translocation of the insulin receptor substrate-1 and β -catenin. **J Biol Chem.** 280; 33:29912-29920.
- de Meyts P., Whittaker J. Nature. Box 1. Modular structure of the insulin receptor. **Nature.** 1: 769-783.
- 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; 3:293-8.
- Dean Laura, M.D., McEntyre Johanna, Ph.D. 2004. Genetic factors in type 2 diabetes in: **The Genetic Landscape of Diabetes**. Editorial Bethesda (MD).
- Díaz DP., Burgos LC. 2002. ¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular? **IATREIA.** 15; 3:179-188.
- Fabry M., Schaefer E., Ellis L., Kojro E., Fahrenholz F., Brandenburg D. 1992. Detection of a new hormone contact site within the insulin receptor ectodomain by the use of a novel photoreactive insulin. **J Biol Chem.** 267; 13:8950-8956.
- Gilbert, S., 2005. **Biología del desarrollo**. Capítulo 17. 7^a ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. Pág. 585-614.

- Hernández-Valencia M. 2006. Repercusión de las alteraciones en los mecanismos de señalización de insulina. **Rev Med Inst Mex Seguro Soc.** 44; 4:383-388.
- Kahn CR., White MF. 1998. The insulin receptor and the Molecular Mechanism of Insulin Action. **J Clin Invest.** 82; 4:1151-1156.
- Massagué J., Czech MP. 1982. Role of disulfides in the subunit structure of the insulin receptor. Reduction of class I disulfides does not impair transmembrane signalling. **J Biol Chem.** 257; 12: 6729-6738.
- Massagué J., Pilch PF., Czech MP. 1980. Electrophoretic resolution of three major insulin receptor structures with unique subunit stoichiometries. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** 77; 12: 7137-7141.
- Merchant H. y Moreno N., 2003. Diferenciación celular durante el desarrollo de la gónada. En: **Biología celular y molecular.** 1ra. Ed. Prentice Hall. Pág. 713-735.
- Merchant H., 1991. **El sexo gonadal.** Memorias del Congreso Conmemorativo del Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. México. Tomo I. Pág. 451-460.
- Metzler D. 2003. The regulation of enzymatic activity and metabolism. En: **Biochemical, the chemical reactions of the living cells.** Second edition. Academic Press, Vol 1, pag. 569-579.
- Nef S., Verma-Kurvari S., Merenmies J., Vassalli J-D., Efstratiadis A., Accili D., Parada LF. 2003. Testis determination requires insulin receptor family function in mice. **Nature.** 426: 291-295.

- Pask A., Graves JA. 1999. Sex chromosomes and sex-determining genes: insights from marsupials and monotremes. **Cell Mol Life Sci.** 55; 6-7:864-875.
- Perz M., Torlińska T. 2001. Insulin receptor--structural and functional characteristics. **Med Sci Monit.** 7; 1:169-177.
- Pimentel E. 1994. **Handbook of growth factors, peptide growth factors.** Volume II. CRC Press. Pág 1-27.
- Planas JV., Méndez E., Baños N., Capilla E., Castillo J., Navarro I., Gutiérrez J. 2000. Fish insulin, IGF-I and IGF-II receptors: A phylogenetic approach. **Amer Zool.** 40:223–233.
- Russo J., De Rosas JC. 1971. Differentiation of the Leydig cell of the mouse testis during the fetal period an ultrastructural study. **Am J Anat.** 130; 4:461-480.
- Sadler T. y Langman. 2004. **Embriología médica.** 9ª ed. Editorial Panamericana S. A. Pág. 3-25.
- Saltiel AR., Kahn RC. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature.** 414: 799-806.
- Santamaría Salomón. 2007. 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*.
- Soares MB., Schon E., Henderson A., Karathanasis SK., 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.

- Tilman C., Capel B. 2002. Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. **Recent Prog Horm Res.** 57: 1-18.
- Todd S., Yoshida MC., Fang XE. Mc Donal L., Jacobs J., Heinrich G., Bell GI., Naylor SL., and Sakagushi AY. 1985. Genes for insulin I and II, parathyroid hormone, and calcitonin are on rat chromosome 1. **Biochem Biophys Res Commun** 131: 1175-1180.
- Veitia RA., Salas-Cortés L., Ottolenghi C., Pailhoux E., Cotinot C., Fellous M. 2001. Testis determination in mammals: more questions than answers. **Mol Cell Endocrinol.** 179; 1-2:3-16.
- Velázquez Christian. 2007. Regulación de la secreción de testosterona en la célula de Leydig del testículo del ratón *Mus musculus*.
- Villalpando I., 2000. **Sinfonía de genes gonadales.** Ciencia y Desarrollo. Sep-Oct. Pág. 32-41.
- Weiss J., Meeks JJ., Hurley L., Raverot G., Frassetto A., Jameson JL. 2003. Sox3 is required for gonadal function, but not sex determination, in males and females. **Mol Cell Biol.** 23; 22:8084-8091.
- Whittaker J., Sørensen H., Gadsbøll VL., Hinrichsen J. 2002. Comparison of the functional insulin binding epitopes of the A and B isoforms of the insulin receptor. **J Biol Chem.** 277;49: 47380-47384.
- Wilhelm D., Palmer S., Koopman P. 2007. Sex Determination and Gonad Development in Mammals. **Physiol Rev.** 87; 1: 1-28.
- Yip CC., Ottensmeyer P. 2003. Three-dimensional structural interactions of insulin and its receptor. **J Biol Chem.** 278; 30: 27329–27332.

- Zawalich WS., Diaz VA., Zawalich KC. 1988. Influence of cAMP and calcium on [3H] inositol efflux, inositol phosphate accumulation, and insulin release from isolated rat islets. **Diabetes**. 37; 11:1478-1483.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>

X.- APÉNDICE

Buffer Tris-HCl 2M pH=8.8 (100mL)

Pesar 24.2 gramos de Tris base, adicionar 50 mL de H₂O megapura. Ajustar a pH= 8.8 con HCl concentrado (aprox. 4mL). Finalmente adicionar H₂O hasta obtener 100mL.

Nota: Para Buffer Tris-HCl 1.5M pH= 8.8 pesar 18.5 gramos de Tris base.

Buffer Tris-HCl 1M pH=6.8 (100mL)

Para 100mL pesar 12.1 gramos de Tris base, adicionar 50 mL de H₂O megapura. Ajustar a pH= 6.8 con HCl concentrado (aprox. 8mL). Adicionar H₂O hasta obtener 100mL.

Acrilamida al 30% (100mL)

Pesar 29.2 gramos de Acrilamida, posteriormente pesar 0.8 gramos de Bis-Acrilamida. Adicionar H₂O suficiente para disolver y llevar a 100mL.

Nota: Puede refrigerarse durante meses.

Persulfato de Amonio 10% (5mL)

Pesar 0.5 gramos de Persulfato de Amonio y llevar a 5 mL con H₂O.

Tinción con Coomassie (1L)

Pesar 1 gramo de Azul de Coomassie R-250, 450mL de Metanol, 450 mL de H₂O y 100mL de Ácido Acético Glacial.

Destinción con Coomassie (1L)

Medir 100mL de Metanol, 100mL de Ácido Acético Glacial y 800mL de H₂O.

Nota: Detecta hasta 0.1µg de proteína. Se destiñe en 1 hora.

Buffer corrida 10x

Pesar 3.03 gramos de Tris base, 14.4 gramos de glicina y 1 gramo de SDS. Llevar a 100mL con H₂O. La solución debe tener un pH= 8.3

Nota: no ajustar pH con ácidos o bases.

Reactivo de Bradford

Se le agregan 5 mL de reactivo, el cual se prepara de la siguiente forma: se disuelven 100 mg de azul brillante de Coomasie G-250 en 50 mL de etanol al 95%. A esta solución se le agregan 100 mL de ácido fosfórico al 85% (p/v), la solución resultante se diluye a un volumen final de 1 litro.

Buffer de Carga

2x SDS-PAGE buffer: 0.009M Tris.Cl, pH 6.8; 20% Glicerol; 2% SDS; 0.02% azul de bromofenol; 0.1M DTT o puede usarse β-mercaptoetanol.

Medios de cultivo

Medio Esencial Dulbecco Modificado (DMEM) de IN VITRO Lab México.

Medio F-12 (HAM) de IN VITRO Lab México.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 1X (100 mL de solución)

Solución salina de fosfatos Dulbecco 10X de IN Vitro Lab México
10 mL y 90 mL de agua desionizada.

Solución de PBS – Tween al 0.05 % (100 mL de solución)

Agregar 50 μ L de Tween 20 (Sigma Aldrich) a 99.95 mL de PBS
1X

Solución de PBS – Milk 5% – Tween al 0.1 % (100 mL de solución)

Agregar 100 μ L de Tween 20 (Sigma Aldrich), 5 gr. de Leche
Svelty a 94.90 mL de PBS 1X

Metanol absoluto. Baker 9093-02

**Kit Liquid DAB de Dakocytomation
Chromogen System**