

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**“REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN TESTICULAR DEL RATÓN EN  
LA FASE EMBRIONARIA POR ESTREPTOZOTOCINA”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA

**ESMERALDA LIRA ROMERO**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA IRMA VILLALPANDO FIERRO**

**México, D.F.**

**Mayo 2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por todos estos años de formación  
Académica

Al Posgrado en Ciencias Biológicas

Al CONACYT por la beca otorgada registro 18983

A PAPIIT (DGAPA-UNAM) IN224607-2 por el financiamiento otorgado para esta  
investigación

A los miembros del Comité Tutoral integrado por: la Dra. Irma Villalpando Fierro, la  
Dra. Leda Carolina Torres Maldonado y la Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta por sus  
valiosos comentarios y sugerencias para la realización de este trabajo

A los miembros del jurado por la revisión del manuscrito y sus importantes  
observaciones

Dr. Horacio Merchant Larios

Dra. Leda Carolina Torres Maldonado

Dra. Irma Villalpando Fierro

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Dra. Juana Alba Luis Díaz

A la Dra. Irma Villalpando Fierro por permitirme trabajar en su laboratorio, por su  
confianza, apoyo y asesoría en todo momento

Al Dr. Horacio Merchant y al Sr. José Baltazar García por el análisis de Microscopía  
electrónica

A Pedro Medina por la determinación de glucógeno testicular

A Benjamín Gómez por su asesoría en técnicas de inmunocitoquímica

## **Dedicatorias**

### **A mis Papás**

José Lira Valenzuela y María Luisa Romero Escobedo por todo su cariño y apoyo

### **A mis hermanos**

José Luis, Juan Manuel, Magos y Laura por su ejemplo

### **A mis Sobrinos**

Fernando, Luis, Jaasiel, Emanuel, Lupita y Naomi por su alegría

### **A Damián Vivar**

Por todo su amor

### **A mis compañeros y amigos del laboratorio**

Judith Morales, Erika franco, Daniel Cervantes, Christian Velázquez, Abigail González, Salomón Santamaría, Luis Hernández, Cristina Ramírez, Beatriz Hernández, Antonio Mendoza, Angélica Martínez, Miriam Anaya, Javier Valdez, Alfredo Cabrera, Uriel Cruz y Luis Pablo Ávila, por los agradables momentos que compartimos.

## ABREVIATURAS

<b>ABC</b>	Complejo Avidina Biotina Peroxidasa
<b>AD</b>	Andostrendiona
<b>a.a</b>	aminoácido
<b>CGPs</b>	Células germinales primordiales
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina tetraclorhidra
<b>D</b>	Daltones
<b>DC</b>	Displasia campomélica
<b>DHA</b>	Dehidroepiandrosterona
<b><i>Dpc</i></b>	Días <i>post coitum</i>
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>DM1</b>	Diabetes mellitus tipo 1
<b>DM2</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>FSH</b>	Hormona estimulante del folículo
<b>GLUTs</b>	Transportador de glucosa
<b>GCH</b>	Gonadotropina coriónica humana
<b>HMG</b>	Grupo de alta movilidad
<b>IGF-I</b>	Factor de crecimiento similar a insulina tipo I
<b>IGF-II</b>	Factor de crecimiento similar a insulina tipo II
<b>KDa</b>	Kilodaltones
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>Min</b>	Minuto
<b>MIS/AMH</b>	Hormona Inhibidora de los conductos de Müller
<b>ml</b>	mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>M</b>	Molar
<b>RIA</b>	Radioinmunoanálisis
<b>REL</b>	Retículo endoplásmico liso
<b>STZ</b>	Estreptozotocina
<b>T</b>	Testosterona
<b>μ</b>	Micras
<b>μL</b>	Micro litro

## ÍNDICE

<b>I. Resumen</b> .....	1
<b>II. Abstract</b> .....	2
<b>III. Introducción</b> .....	3
<b>1. Bases morfológicas de la diferenciación sexual</b> .....	3
a) <i>Establecimiento del sexo cromosómico</i> .....	3
b) <i>Establecimiento del sexo gonadal</i> .....	3
i) <i>Origen de las células germinales primordiales</i> .....	4
ii) <i>Etapa de gónada indiferenciada</i> .....	5
iii) <i>Diferenciación testicular</i> .....	6
c) <i>Establecimiento del fenotipo masculino</i> .....	6
<b>2. Genes que participan en la diferenciación sexual</b> .....	8
a) <i>Factores de transcripción de expresión temprana Sfl y Wt1</i> .....	8
b) <i>Genes involucrados directamente en la diferenciación testicular SRY/Sry y Sox 9</i> .....	10
c) <i>Genes antagónicos Dax1 y Wnt4</i> .....	11
<b>3. Biosíntesis de esteroides gonadales</b> .....	15
a) <i>Síntesis de andrógenos en tejido testicular</i> .....	17
b) <i>Secuencia de reacciones en la vía delta 4</i> .....	17
c) <i>Secuencia de reacciones en la vía delta 5</i> .....	18
<b>4. Modulación gonadal por insulina y factores de crecimiento similares a insulina</b> .....	20
a) <i>Organización del gen de la insulina</i> .....	20
b) <i>Organización de la proteína</i> .....	21
c) <i>Biosíntesis de insulina</i> .....	22
d) <i>Regulación de la biosíntesis de insulina</i> .....	23
e) <i>Acción de la insulina</i> .....	25
f) <i>Insulina y síntesis del glucógeno</i> .....	28

<b>5. Diabetes</b> .....	29
a) <i>Clasificación</i> .....	29
b) <i>Inducción experimental de diabetes con estreptozotocina</i> .....	32
<b>IV. Justificación</b> .....	32
<b>V. Hipótesis</b> .....	35
<b>VI. Objetivos</b> .....	36
<b>VII. Material y métodos</b> .....	37
a) <i>Reactivos y disolventes</i> .....	37
b) <i>Animales de experimentación</i> .....	37
c) <i>Inducción de diabetes por estreptozotocina</i> .....	37
d) <i>Cuantificación de glucosa fetal</i> .....	38
e) <i>Microscopia electrónica</i> .....	38
f) <i>Cuantificación de testosterona</i> .....	39
g) <i>Cultivo de células de Leydig y Sertolí</i> .....	39
h) <i>Detección inmunocitoquímica de insulina en cultivo celular</i> .....	40
<b>VIII. Resultados</b> .....	42
a) <i>Cambios en el peso corporal, niveles de glucosa sanguínea e ingesta de alimento</i> .....	42
b) <i>Niveles de glucosa sanguínea fetales</i> .....	42
c) <i>Microscopia electrónica</i> .....	46
d) <i>Cuantificación de testosterona</i> .....	56
e) <i>Detección inmunocitoquímica de insulina en cultivo celular</i> .....	57
<b>IX. Discusión</b> .....	59
<b>X. Conclusiones</b> .....	63
<b>XI. Bibliografía</b> .....	64

## I. Resumen

Los eventos que permiten la diferenciación sexual, dependen de la expresión e interacción de una serie de genes que actúan sobre las diferentes estirpes celulares de la gónada en desarrollo. Un gen determinante en esta cascada de eventos es el *SRY/Sry*, al expresarse en la gónada ésta se transformará en un testículo, de no hacerlo se desarrollará un ovario. Si bien la participación de éste gen es fundamental, recientemente se ha observado que la insulina y proteínas relacionadas, como el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I y II (IGF-I, IGF-II) participan en la diferenciación, esteroidogénesis y crecimiento testicular. La insulina es una hormona esencial para el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en el organismo, su deficiencia provoca diabetes mellitus, la cual se asocia con alteraciones reproductivas y neuroendocrinas. Para avanzar en el entendimiento de esta enfermedad se han empleado modelos de animales diabéticos inducidos con estreptozotocina (STZ), una molécula que daña las células beta del páncreas. Estos animales presentan, en la etapa adulta, alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, así como deficiencia en la secreción de testosterona. Existen pocos estudios respecto a la repercusión que la diabetes materna ejerce sobre los fetos. El objetivo de este estudio fue conocer como afectan los niveles altos de glucosa, la morfogénesis gonadal y la secreción de testosterona testicular, así como determinar, si la insulina se produce intragonadalmente. Se emplearon ratonas gestantes a las cuales se les administró STZ en el día 7 de la gestación. Cada dos días y hasta su sacrificio se registró el peso, consumo de alimento y niveles de glucosa sanguínea. A los 14, 16 y 18 días *post coitum* (*dpc*) se obtuvieron los embriones, se disectaron los testículos y se procesaron para su análisis por microscopía electrónica. Los niveles de testosterona se midieron por radioinmunoanálisis. Para determinar si la insulina se produce intragonadalmente los testículos se disgregaron y se separaron dos poblaciones celulares, Leydig y Sertoli, se cultivaron y posteriormente se realizó una inmunodetección empleando un anticuerpo anti-insulina. Los resultados indican que las células de Leydig de fetos cuyas madres fueron tratadas con STZ, se encuentran alteradas metabólicamente, debido a que se detectaron abundantes depósitos de glucógeno en su citoplasma. En cuanto a la producción de testosterona observamos una disminución en los niveles de esta hormona en los testículos de embriones de ratonas diabéticas. En relación al tipo celular que produce insulina detectamos su presencia en células de Leydig y Sertoli *in vitro*. Proponemos que los niveles altos de glucosa inducen una desregulación de enzimas claves para la esteroidogénesis y el metabolismo del glucógeno en los testículos fetales.



## II. Abstract

Events that permit sexual differentiation depend on expression and interaction of gene series that act on different cell lineages of the developing gonad. A determinant gene on sex determination cascade is the *SRY/Sry*, whose presence will transform undifferentiated gonad into a testis and in its absence an ovary will develop. Recent data demonstrated that insulin and related proteins, such as insulin like growth factors I and II (IGF-I, IGF-II), participate in testicular differentiation, steroidogenesis and growth. Insulin is essential for development, growth and preservation of glucose homeostasis, its lack causes diabetes mellitus, which is associated with reproductive and neuroendocrine disorders. Diabetic animal models induced with streptozotocin (STZ), which damages pancreas beta cells, have been used to understand this disease. STZ-induced diabetes mice at adult stage, show alteration in the hypothalamus-hypophysis-gonad axis and deficiency in testosterone secretion. There are few studies regarding effects that maternal diabetes exerts on male fetal gonad. The aim of this study was to investigate effect of high levels of glucose on morphogenesis and testicular testosterone secretion, and to determine insulin production in fetal testis. Gestant mice at the 7 day of gestation were STZ-treated. Every two days and until their sacrifice, weight, food intake and blood glucose levels were registered. Embryos were obtained at 14, 16 and 18 days *post coitum* (*dpc*); Testes were dissected out and processed for analysis by electron microscopy. Testosterone levels were measured by radioimmunoanalysis. Insulin expression was determined by immunocytochemistry in the mouse testis in vitro in Leydig and Sertoli cells. Results indicate that fetal Leydig cells from STZ-treated mothers show abundant glycogen deposits on its cytoplasm. Testosterone production, levels decreased in fetal testis of diabetic mothers. Leydig and Sertoli cells produce insulin in vitro. We propose that high glucose levels induce deregulation key enzymes of steroidogenesis and glycogen metabolism in mouse fetal testis.

### **III. Introducción**

#### **1. Bases morfológicas de la diferenciación sexual**

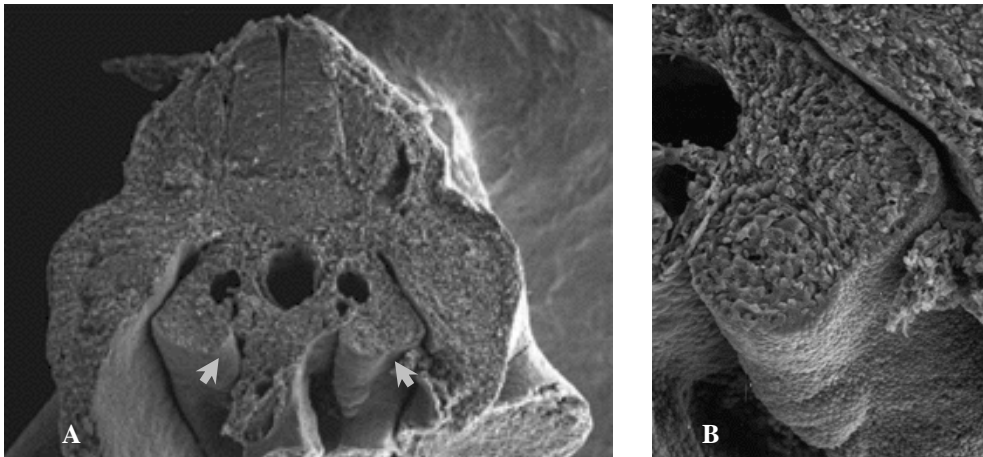
La diferenciación sexual es uno de los fenómenos biológicos de mayor trascendencia ya que permite la perpetuación de las especies con reproducción sexual. Este evento inicia tempranamente en el desarrollo y se presenta en tres etapas sucesivas que son: el establecimiento del sexo cromosómico, gonadal y fenotípico (1).

##### ***a) Establecimiento del sexo cromosómico***

En mamíferos el establecimiento del sexo cromosómico se inicia en el momento de la fertilización cuando un espermatozoide que posee un cromosoma X ó un cromosoma Y fertiliza a un ovocito, el cual normalmente aporta un cromosoma X. De esta forma se establece un complemento cromosómico XY para el varón y XX para la hembra, en el primer caso el individuo desarrollará testículos y en el segundo ovarios (2).

##### ***b) Establecimiento del sexo gonadal***

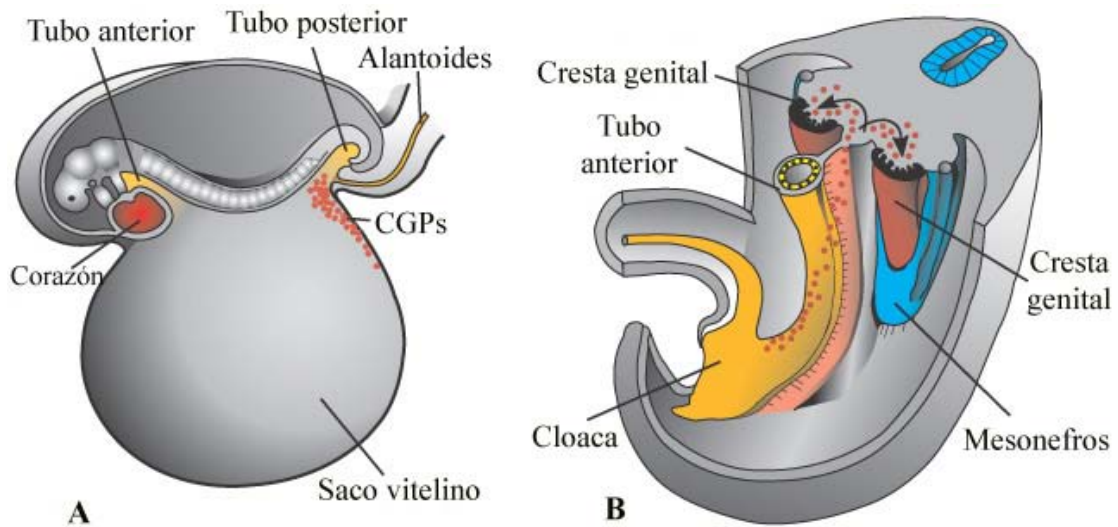
La primera manifestación de la diferenciación gonadal se aprecia por un par de engrosamientos longitudinales en la región urogenital del embrión denominadas crestas genitales. En el ratón estas se hacen evidentes de los 9.5-10.5 días de gestación (Fig. 1). Desde el punto de vista embriológico, las crestas genitales están formadas por dos tipos de células: las células somáticas de origen mesodérmico que comprenden a las células mesenquimáticas, mesoteliales, endoteliales y mesonéfricas y las células germinales primordiales (CGPs) (3-4).



**Fig. 1.** Fotografía electrónica de barrido de un embrión de ratón a los 9.5-10.5 días de gestación **A.** crestas genitales (flechas) **B.** Cresta genital vista a mayor aumento. Tomada de Langman's Medical Embryology, 2004 (3).

### *i) Origen de las células germinales primordiales*

La línea germinal se ha detectado tempranamente en la base del alantoides. Estas células tienen un origen extragonadal, ya que se les observa por vez primera a los 8 días *post coitum (dpc)*, en el endodermo del saco vitelino. Desde esta región migran hacia las crestas genitales, primero por movimientos morfogénicos propios del intestino primitivo en desarrollo, desplazándose de una manera pasiva. Al alcanzar el intestino posterior secretan enzimas que degradan la lamina basal de este órgano y desarrollan pseudópodos que les permiten desplazarse por medio de movimientos ameboides. De esta manera llegan al primordio gonadal alrededor del día 11.5 de gestación en el ratón (Fig. 2) (3,5).



**Fig. 2.** **A.** Migración de las células germinales primordiales (CGPs) en la pared del saco vitelino cerca de la inserción del alantoides. **B.** Migración de las CGPs a lo largo de la pared del intestino posterior y el mesenterio dorsal hacia la cresta genital. Tomada de Langman's Medical Embryology, 2004 (3).

### *ii) Etapa de gónada indiferenciada*

A la llegada de las CGPs a la gónada indiferenciada las células mesenquimáticas y mesoteliales proliferan activamente formando lo que se denomina blastema gonadal. A partir de éste se diferencian dos tejidos gonadales importantes: los cordones sexuales y el estroma. Los primeros son agregados epiteliales delimitados por una membrana basal dentro de los cuales estarán contenidas las CGPs. Dentro del estroma quedarán contenidas las células mesenquimáticas que posteriormente se diferenciarán en células de Leydig, productoras de esteroides. El establecimiento de esta fase del desarrollo gonadal se detecta en el ratón entre los 11 y 11.5 *dpc* (5).

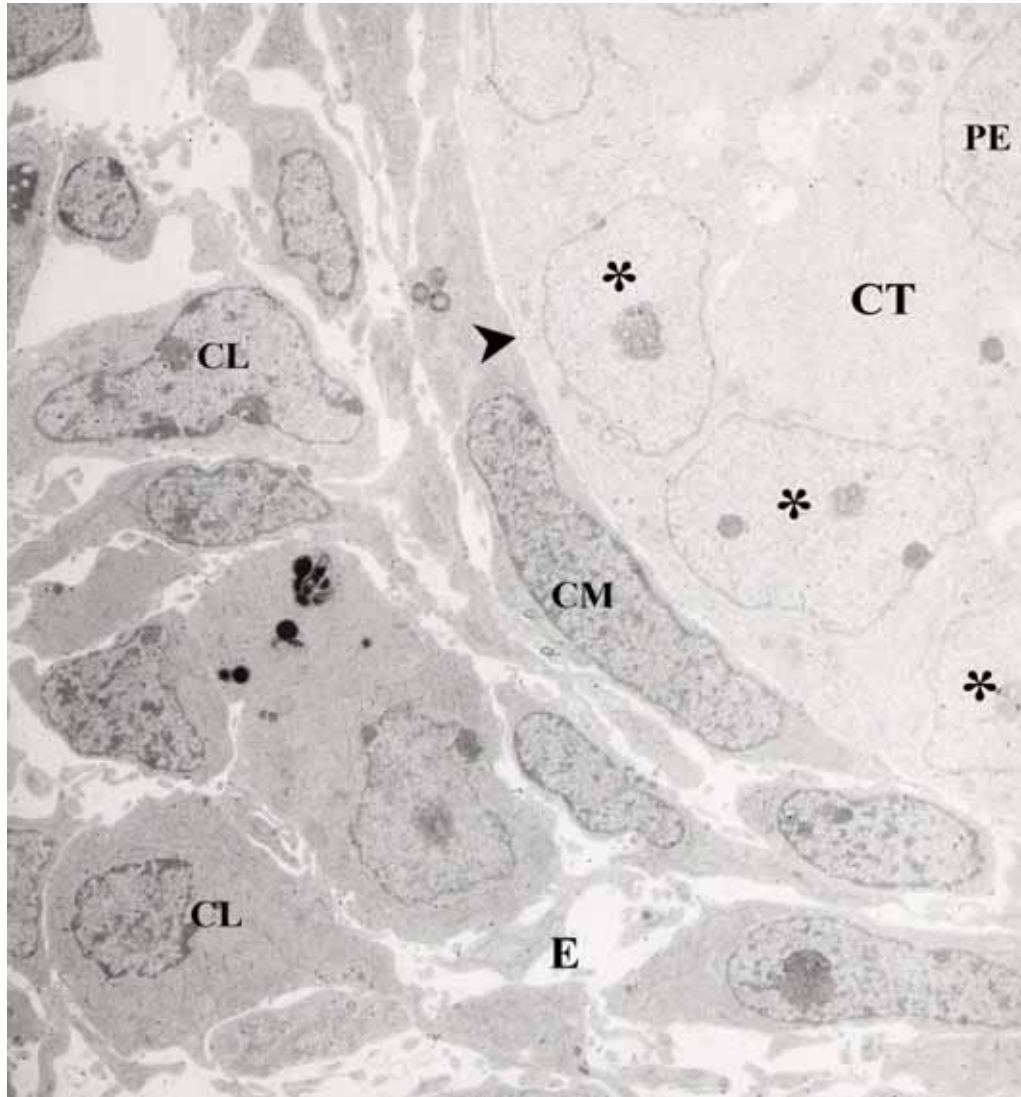
### *iii) Diferenciación testicular*

Una vez establecida la gónada indiferenciada el siguiente evento importante es la diferenciación testicular, se inicia por la acción del gen SRY/Sry, el cual se expresa desde los 10.5 *dpc* en el ratón (6-7). Este gen promueve una serie de cambios en la morfología de la gónada que resultan en la separación gradual de los cordones sexuales del epitelio celómico por invasión de vasos sanguíneos y mesénquima; provocando la compactación de lo que se denominan cordones seminíferos. En éstos quedarán contenidas las CGPs y las células de Sertoli; las células mioides peritubulares rodearán a estos cordones. Las células mesenquimáticas se diferenciarán en las células de Leydig, iniciándose así la actividad endocrina del testículo (Fig. 3) (8).

### *c) Establecimiento del fenotipo masculino*

El fenotipo masculino es el resultado del efecto de tres hormonas producidas por las células ya diferenciadas del testículo, la primera de ellas es la hormona inhibidora de los conductos de Müller (MIS), conocida también como (AMH), la cual es secretada por las células de Sertoli. La MIS provoca la regresión de los conductos de Müller los cuales se diferencian en los genitales internos femeninos: útero, oviductos, y tercio superior de la vagina (9-10). La segunda hormona producida es la testosterona, que es secretada por las células de Leydig. Esta hormona ejerce su efecto virilizante sobre los conductos de Wolff los cuales se diferencian en epidídimo, vesícula seminal y conductos deferentes (11).

La tercera hormona fetal producida es la  $5\alpha$ -dihidrotestosterona derivada de la testosterona por acción de la enzima  $5\alpha$ -reductasa. La dihidrotestosterona va a ser la responsable de la diferenciación de los genitales externos masculinos, pene, escroto y uretra (11, 12).



**Fig. 3.** Testículo de ratón de 14 *dpc* donde se observa la formación de los cordones seminíferos. Separados del compartimento estromático (E) se pueden observar las proespermatogonias (PE) y las células de Sertoli (\*) dentro de un cordón testicular (CT) delimitado por una membrana basal (punta de flecha). En el compartimento estromático se ubican las células mioides (CM), así como células de Leydig (CL).

## 2. Genes que participan en la diferenciación sexual

Los eventos que permiten la diferenciación testicular, desde la formación de la cresta genital hacia la gónada indiferenciada y finalmente tejido gonadal diferenciado, dependen de la expresión e interacción de una serie de genes que actúan sobre las diferentes estirpes celulares de la gónada en desarrollo (Tabla 1) (13,14).

Para su estudio estos genes se han clasificado en tres grupos, uno de ellos son los factores de transcripción los cuales se encuentran involucrados en procesos de diferenciación temprana, desde la formación de la cresta genital hasta la diferenciación de las estirpes celulares específicas de las gónadas, ejemplo de estos genes son *Sfl* y *Wt1* (15,16). Un segundo grupo está representado por el gen *SRY/Sry*, y *Sox 9* (17,18) que tienen la función específica de promover el desarrollo testicular. Otros genes como *Wnt 4* y *Dax1* participan antagonizando el desarrollo testicular y probablemente promoviendo el desarrollo del ovario (Fig. 4) (19-21).

### ***a) Factores de transcripción de expresión temprana Sfl y Wt1***

El gen *Sfl* (factor esteroideogénico 1) es un miembro de la familia de receptores nucleares huérfanos. Está localizado en el cromosoma 9 (q33) en humanos y codifica una proteína de 461 aminoácidos (a.a.) Estructuralmente presenta un dominio de unión al DNA compuesto por dos dedos de zinc altamente conservados entre los mamíferos (15). *Sfl* fue identificado inicialmente como un regulador de la citocromo p450 hidroxilasa (22,23) y posteriormente se demostró su expresión en el hipotálamo, pituitaria, glándulas adrenales, así como en las crestas genitales (24).

En el ratón *Sfl* se expresa en la gónada en desarrollo alrededor de los 9 *dpc*, e interactúa con varios factores de transcripción como *Wtl*, *Dax1*. En las células de Leydig modula la transcripción de varias enzimas involucradas en la esteroidogénesis y biosíntesis de testosterona (24-25).

En humanos, deleciones homocigotas para este gen resultan en insuficiencia adrenal, alteraciones en la función de gonadotropos y reversión sexual XY. Lo que confirma la importancia de *Sfl* durante las etapas iniciales del desarrollo gonadal y adrenal (26).

*Wtl* es otro de los genes involucrados en el desarrollo gonadal temprano. En humanos está localizado en el brazo corto del cromosoma 11 (p13) y presenta cuatro dominios del tipo dedos de Zinc (27).

Mutaciones en este gen están asociadas con cuatro diferentes patologías: síndrome Denys-Drash, síndrome Frasier, síndrome WAGR y tumor de Wilms'. Las características comunes de estos síndromes son predisposición a falla renal, defectos en el desarrollo del sistema reproductivo y reversión sexual (16, 28-29).

Modificaciones post-traduccionales de *Wtl* dan lugar a dos isoformas que difieren por la inserción o deleción de tres aminoácidos lisina (K), treonina (T) y serina (S) entre el tercer y cuarto dedo de zinc. La isoforma que carece de estos residuos (-KTS) interactúa directamente con *Sfl* y ambos actúan sinérgicamente para activar la transcripción del promotor del gen *Mis* (25, 30).



***b) Genes involucrados directamente en la diferenciación testicular SRY/Sry, Sox 9***

El gen *SRY/Sry* (del inglés sex determining region of the Y chromosome) es un regulador clave en la determinación sexual. De estar presente y expresarse en la gónada desarrollo ésta se diferenciará como un testículo, de no hacerlo, se desarrollará un ovario.

En el humano este gen se encuentra localizado en la región distal del brazo corto del cromosoma Y (p11.3), está constituido por un sólo exón y codifica una proteína nuclear de 204 a.a, con un peso molecular de 23.9 kDa. Presenta un dominio de unión al ADN, altamente conservado en la evolución, denominado caja HMG por sus siglas en inglés (high mobility group) el cual induce el plegamiento del mismo en un ángulo de 70° (7, 31-32).

Este dominio de unión reconoce elementos promotores del gen *Mis* y de la p450 aromatasas, sugiriendo que ésta proteína controla la diferenciación de la gónada hacia testículo a través de la activación o represión de genes blanco (33).

En el ratón la expresión de este gen ocurre a los 10.5 *dpc* en las células somáticas de la cresta urogenital, alcanza su máxima expresión a los 11.5 *dpc* y se mantiene hasta los 12.5 *dpc* hasta que se presentan las primeras evidencias morfológicas de diferenciación testicular (34).

Mutaciones en el gen *SRY/Sry* impiden la diferenciación de la gónada primitiva hacia testículo y dan lugar a reversión sexual XY. La mayoría de estas mutaciones se encuentran en la caja HMG y alteran la función de la proteína SRY interfiriendo con la unión y/o doblamiento del ADN o alterando su función con otros factores de transcripción (35, 36).

El gen *Sox 9* pertenece a la familia de proteínas denominadas SOX relacionadas con el gen *SRY/Sry* debido a que comparten 60% de homología con el dominio HMG de éste. Se encuentra presente en el brazo largo del cromosoma 17 y es un factor de transcripción con dominios de unión al ADN (37).

*Sox 9* fue identificado por primera vez como responsable de la displasia campomélica (DC) una enfermedad caracterizada por desarrollo anormal del sistema óseo, letalidad perinatal y reversión sexual XY en 75% de los casos. La DC es causada por mutaciones con pérdida de la función que afectan la unión de *Sox 9* al DNA (37, 38).

*Sox 9* es uno de los primeros genes en ser activados, después de la expresión del *SRY/Sry* en el testículo en desarrollo, indicando que *Sox 9* está río abajo del gen *SRY/Sry* en la cascada de determinación sexual (18).

*Sox 9* se expresa en el linaje de las células de Sertoli y aunque su blanco fisiológico aún no se conoce existen evidencias que indican que puede regular la expresión de *Mis* en asociación con *Sf1* (39). *Sox 9* presenta un alto grado de conservación, se ha encontrado en muchas especies de vertebrados y se considera el gen de la determinación sexual más antiguo (40).

### ***c) Genes antagónicos Dax 1 y Wnt4***

*Dax1* es un miembro de la familia de receptores de hormonas nucleares, se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma X (p21.3) y aunque no se conoce un blanco fisiológico para este gen, se ha mostrado que se une al ADN y actúa como un represor transcripcional (41).

En el ratón, *Dax1* se expresa en la cresta genital en un periodo crítico para la determinación sexual, a los 11.5 *dpc* se detecta en las células somáticas, tanto de hembras como machos y posteriormente a los 12.5 *dpc* su nivel de expresión decrece conforme se forman los cordones testiculares. En las hembras *Dax1* continúa expresándose después de los 12.5 *dpc* y a los 14 *dpc* la señal se restringe a la región proximal del ovario (19).

La persistencia de *Dax1* en hembras es consistente con su papel en la formación del ovario.

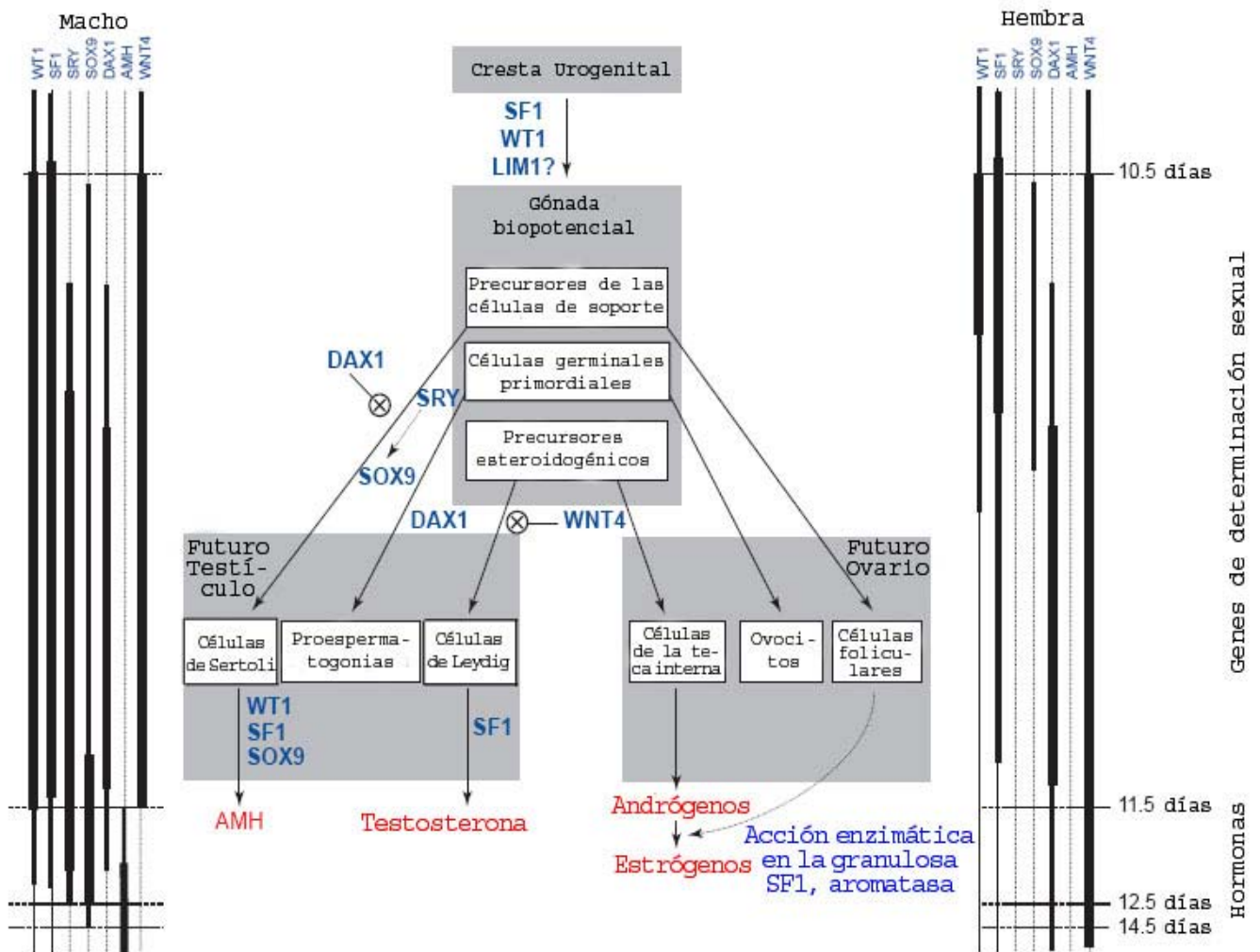
*Wnt4* es un factor de transcripción de la familia de los genes *Wnt/Wingless*. Se expresa en la gonada bipotencial de ambos sexos hasta los 11.5 *dpc* posteriormente su expresión se restringe únicamente a gónadas XX.

Se ha propuesto que *Wnt4* actúa como un represor de la diferenciación sexual masculina, debido a que mutaciones en este gen inducen la diferenciación de células esteroidogénicas. En ratones transgénicos XX que carecen de *Wnt4* se ha observado la expresión de enzimas características de las células Leydig (20).

**Tabla 1. Genes que participan en la diferenciación testicular**

Gen	Función	Referencia
<i>Sfl</i>	Establecimiento temprano de las gónadas, regulador de genes para la producción de esteroides	Luo <i>et al</i> , 1994 Ikeda <i>et al</i> , 1994, 1996
<i>Wtl</i>	Establecimiento temprano de las gónadas e hígado. Posible regulador de la expresión de <i>Sry</i>	Rakly <i>et al</i> , 1993 Kriedberg <i>et al</i> , 1993
<i>Lim1</i>	Establecimiento temprano de las gónadas	Shawlot y Behringer <i>et al</i> , 1990
<i>Emx2</i>	Establecimiento temprano de las gónadas	Miyamoto <i>et al</i> , 1997
<i>Lhx9</i>	Establecimiento temprano de las gónadas	Birk <i>et al</i> , 2000
<i>Gata4/Fog2</i>	Factor de transcripción y cofactor. Se requiere para la diferenciación gonadal normal	Tevosian <i>et al</i> , 2002
<i>SRY/Sry</i>	Participa en la diferenciación del testículo	Sinclair <i>et al</i> , 1990
<i>Sox9</i>	Diferenciación de células de Sertoli, iniciación de desarrollo del testículo	Cameron <i>et al</i> , 1996 Kent <i>et al</i> , 1996
<i>Sox8</i>	Refuerza la función de <i>Sox9</i> en la diferenciación del testículo	Chaboissier <i>et al</i> , 2004
<i>Fgf9</i>	Molécula de señalización importante en la embriogénesis testicular	Colvin <i>et al</i> , 2001, Schmahl <i>et al</i> , 2004
<i>Mis</i>	Regresión de los conductos de Müller	Josso y Picard, 1986
<i>Dhh</i>	Regulador de las interacciones entre las células Sertoli-mioides y Sertoli-Leydig, desarrollo de las células germinales masculinas	Bitgood <i>et al</i> , 1996 Clark <i>et al</i> , 2000
<i>Dax1</i>	Reprime la transcripción del gen <i>SF-1</i> y antagoniza la interacción funcional entre <i>SF1</i> y <i>WT1</i>	Swain <i>et al</i> , 1998 Yu <i>et al</i> , 1998
<i>Pgdra</i>	Presenta un papel importante en la organogénesis testicular	Brennan <i>et al</i> , 2003
<i>Wnt4</i>	Represión de la diferenciación de las células de Leydig en gónadas femeninas	Vainio <i>et al</i> , 1999
<i>Dmrt1</i>	Indispensable en el desarrollo del testículo	Raymond <i>et al</i> , 2000

Modificada de Tilman and Capel, 2002 Wilhelm, Palmer and Koopman, 2007 (13,14).



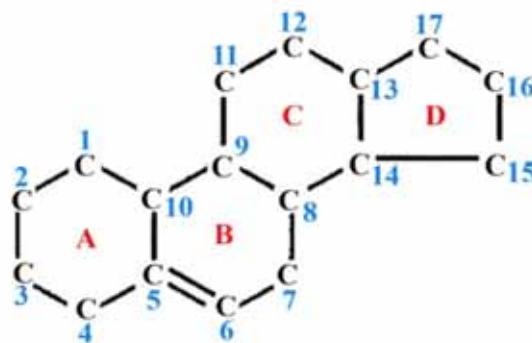
**Fig. 4.** Determinación sexual en el ratón. Las líneas verticales del lado izquierdo y derecho muestran el perfil de expresión de los genes involucrados en la determinación sexual (azul). El grosor de las líneas es proporcional al nivel de expresión relativa (excepto para *WNT4*). El tiempo de expresión se indica a la derecha en días *post coitum*. La parte central de la figura representa el destino sexo específico de tres tipos celulares gonadales: precursores de células de soporte, células germinales primordiales y precursores esteroidogénicos. Se muestran las células mesenquimáticas. Los círculos cruzados representan la regulación inhibitoria. La producción de estrógenos por células de la teca interna es indirecta, estas células sintetizan andrógenos los cuales son convertidos a estrógenos por acción de la enzima aromatasa producida por las células foliculares. El color rojo corresponde a las hormonas secretadas.

Tomada de Vaiman, Pailhoux, 2000 (21).

### 3. Biosíntesis de esteroides gonadales

Las hormonas esteroides se clasifican según su estructura química y actividad biológica. En los mamíferos se distinguen seis familias, entre las que se encuentran las hormonas gonadales: andrógenos, estrógenos y progestágenos, así como los glucocorticoides, mineralocorticoides, la vitamina D y sus metabolitos.

Las moléculas esteroides, derivan de un núcleo central denominado ciclopentanoperhidrofenantreno. Esta estructura está formada por tres anillos hexagonales o ciclohexánicos, A,B,C y un cuarto anillo pentagonal o ciclopentano, el anillo D (42) (Fig. 5).



**Fig. 5.** Estructura básica del ciclopentanoperhidrofenantreno. Modificada de Hall PF, 1998 (46).

El precursor de las seis familias de esteroides es el colesterol, sus 27 átomos de carbono se producen por la adición de 18 unidades de acetato (acetil-CoA) y estas reacciones están catalizadas por 27 enzimas distintas (42).

La biosíntesis de colesterol puede resumirse en cuatro fases:

En la primera se forma un intermediario de 6 carbonos, el ácido mevalónico, por la condensación de tres moléculas de acetato. En la segunda ocurre la conversión del ácido mevalónico en una molécula de 30 carbonos, el escualeno. Posteriormente por oxidación y ciclación del escualeno se forma lanosterol y finalmente éste último se convierte en colesterol por la eliminación de tres grupos metilo y ordenamiento de los dobles enlaces (42).

El colesterol puede sintetizarse de *novo* en los diferentes tejidos esteroideogénicos. Sin embargo, en el tejido ovárico, la placenta y la corteza adrenal, la captación de lipoproteínas sanguíneas, portadoras de colesterol, es la principal fuente para la síntesis de hormonas gonadales. En el caso de la esteroideogénesis testicular la captación de este precursor está regulada hormonalmente y coordinada con la síntesis intracelular, así como con la hidrólisis de los ésteres de colesterol, con la finalidad de asegurar una concentración idónea para la esteroideogénesis (44-45).

La transformación de colesterol en hormonas esteroideas inicia por el rompimiento y la oxidación de su cadena lateral, su conversión a pregnenolona se produce en el interior de la mitocondria por medio de un sistema multienzimático denominado 20, 22 desmolasa. El colesterol y sus productos intermediarios quedan unidos a este sistema enzimático hasta que se forma la pregnenolona la cual es liberada y transportada hacia el retículo endoplásmico liso (REL) (42-44).

La conversión de pregnenolona en progesterona está catalizada por un complejo sistema enzimático integrado por la  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y la  $\Delta^{4,5}$ -isomerasa. La progesterona es secretada por las células del cuerpo lúteo o utilizada como sustrato para la síntesis de andrógenos y estrógenos por los tejidos testicular y ovárico (Fig. 6) (45).

### ***a) Síntesis de andrógenos en tejido testicular***

Los principales andrógenos producidos por los testículos son: la testosterona (T), la androstendiona (AD) y la dehidroepiandrosterona (DHA). De todos ellos el más potente es la T, ésta se sintetiza en las células de Leydig testiculares. En el interior de dicha célula se pueden observar los depósitos de colesterol en forma de gotas lipídicas, así como un extenso REL, complejos de Golgi y numerosos lisosomas (46-47).

Existen dos patrones o vías de síntesis por las cuales la pregnenolona es convertida a testosterona, son las vías delta 4 ( $\Delta^4$ ) y delta 5 ( $\Delta^5$ ), la terminología para estas vías depende de la posición en la que se mantiene el enlace insaturado durante la conversión de los compuestos intermediarios a testosterona (46).

### ***b) Secuencia de las reacciones en la vía $\Delta^4$***

El primer intermediario que se forma a partir de la pregnenolona es la progesterona, su síntesis esta regulada por la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. La progesterona es hidroxilada en el C<sub>17</sub> por la 17-hidroxilasa para formar 17-hidroxiprogesterona (17-OH-P<sub>4</sub>). Esta enzima es una monooxidasa y en el curso de la reacción enzimática interviene NADPH-citocromo P-450 reductasa que transfiere electrones desde el NADPH al citocromo P-450.

El siguiente paso es la síntesis de AD que es producida mediante la ruptura del grupo acetato del C<sub>17</sub> de la 17-OH-P<sub>4</sub> mediante la acción de la enzima C<sub>17</sub>C<sub>20</sub> liasa.

El último paso de esta vía, es la reducción del grupo cetónico situado en el C<sub>17</sub> de la AD dando como producto final T. Esta reacción está catalizada por la enzima  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $17\beta$ -HSD) (46).



*c) Secuencia de las reacciones en la vía  $\Delta^5$*

La secuencia de las reacciones en esta vía difiere un poco de la anterior. En primer lugar la pregnenolona es convertida en 17-hidroxipregnenolona (17-OH-P<sub>5</sub>) por la acción de la 17-hidroxilasa. La (17-OH-P<sub>5</sub>) se rompe mediante la acción de una liasa dando lugar a DHA ésta es convertida en AD por la acción de la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide isomerasa y por último la 17  $\beta$ -HSD convierte la AD en testosterona.

En ambas vías de síntesis, las enzimas provienen del REL y parece que dependiendo de la especie existe mayor o menor preferencia por una vía u otra. Se han observado diferencias entre especies debido a que en los testículos de rata y ratón predomina la vía  $\Delta^4$  mientras que en humano, perro y conejo predomina la  $\Delta^5$  (48).

La T, se sintetiza en las células de Leydig testiculares y también en cantidades fisiológicamente significativas en la zona rugosa de la corteza adrenal, en las células tecaes del ovario y en la placenta (22). En el adulto la hormona luteinizante (LH), regula específicamente la producción de T, sin embargo, durante la vida intrauterina se ha postulado que la gonadotropina coriónica humana GCH producida por la placenta, así como otras hormonas como: la prolactina, el cortisol, y el 17- $\beta$  estradiol pueden regular en grado variable la secreción de testosterona fetal (46).

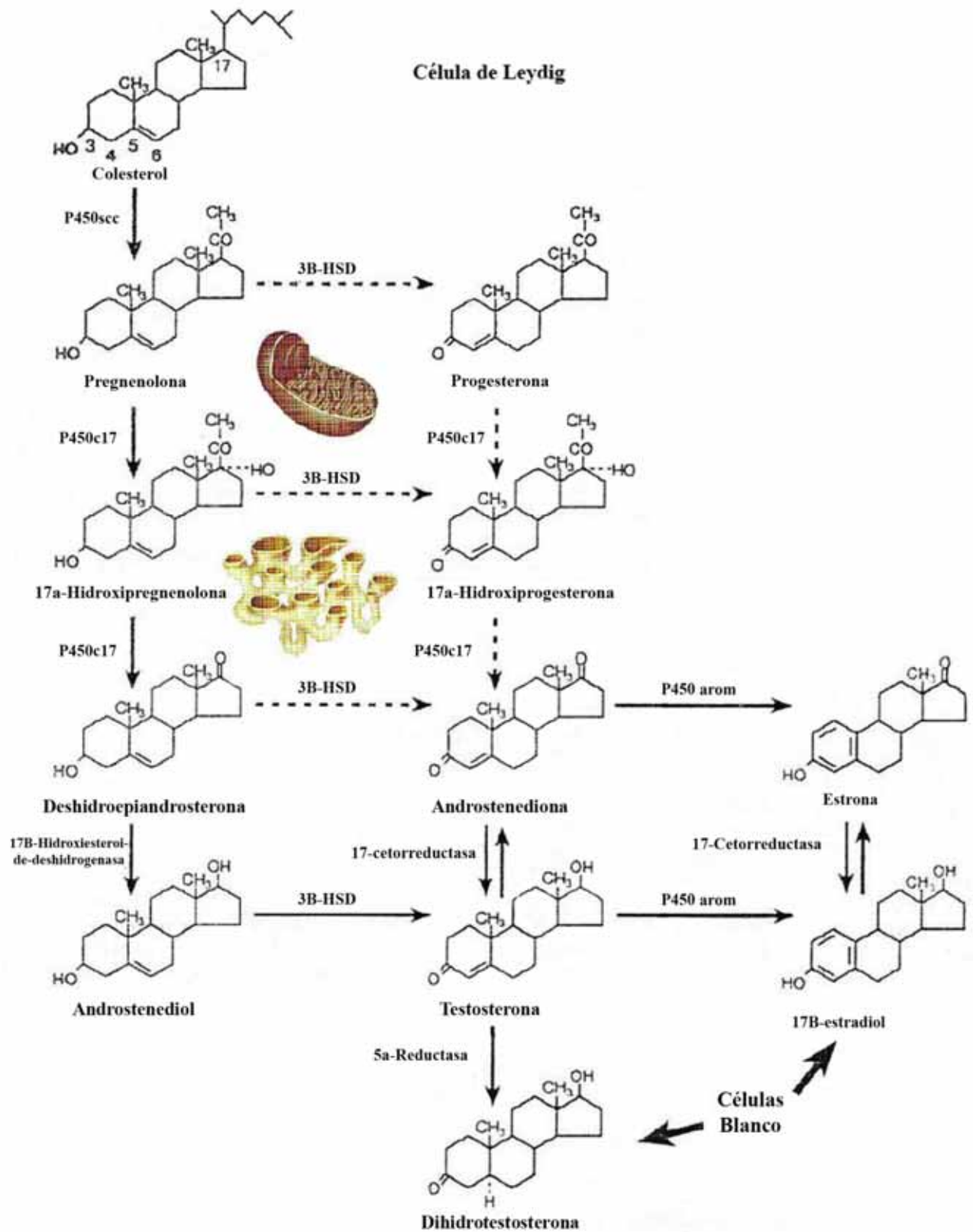


Fig. 6. Biosíntesis de testosterona. Modificada de Baulieu EE. Hormones, 1990 (42).

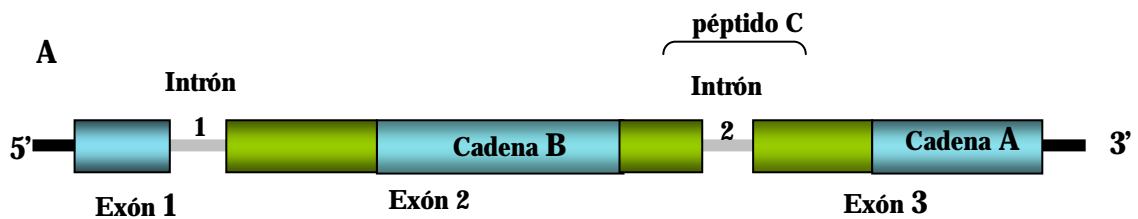
#### **4. Modulación gonadal por insulina y factores de crecimiento similares a Insulina**

Si bien la participación del gen *SRY/Sry* es determinante para la diferenciación de la gónada en testículo, en los últimos años se ha puesto de manifiesto que la insulina y proteínas relacionadas a la familia de esta molécula, como lo son el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I y II (IGF-I, IGF-II) participan de manera fundamental en la diferenciación y crecimiento testicular (49, 50).

La insulina y el IGF-I y II son moléculas de señalización que están íntimamente involucradas en los mecanismos de proliferación y diferenciación celular (51). Se sabe que están presentes desde etapas iniciales del desarrollo y algunos estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* sugieren que estas moléculas participan de manera importante en la esteroidogénesis y regulación gonadal (52, 53).

##### ***a) Organización del gen de la insulina***

El gen que codifica la pre-proinsulina humana está localizada en el brazo corto del cromosoma 11 tiene una longitud de 1355 pares de bases y la región codificante presenta 3 exones y 2 intrones; el primero codifica el péptido señal en la región N-terminal de la pre-proinsulina, el segundo la cadena B y parte del péptido C y el tercero el resto del péptido C y la cadena A (Fig. 7) (54,55).

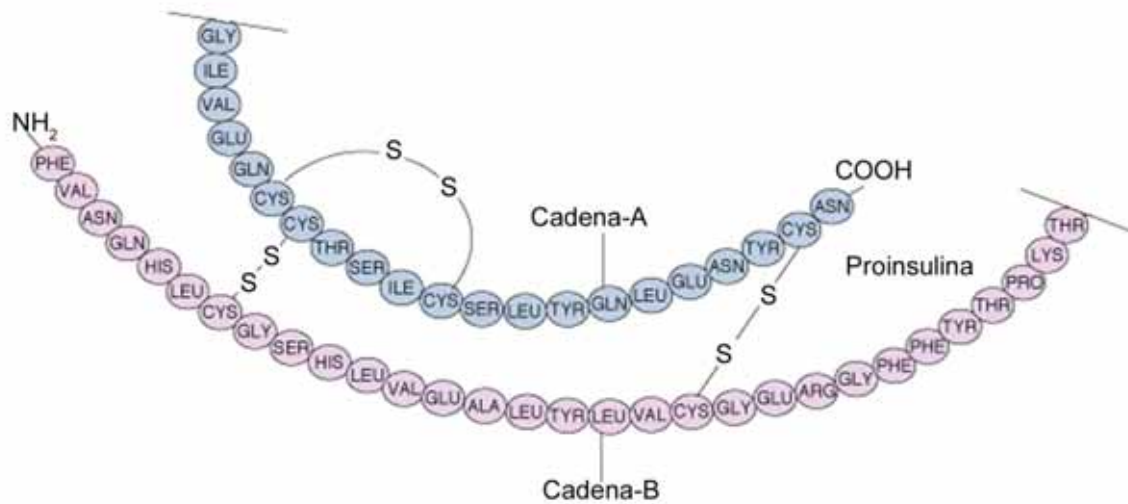


**Fig. 7. A** Estructura del gen de la insulina humana. Modificada de Poitut *et al*, 2006 (55).

En el ratón la insulina es producida a partir de dos genes no alélicos que codifican a la pre-proinsulina I y II respectivamente. El gen que codifica para la pre-proinsulina I se encuentra en el cromosoma 6, mientras que el gen II está localizado en el extremo distal del cromosoma 7. En la rata y el ratón este gen sufrió una duplicación que originó una segunda copia del gen, el cual presenta una delección de 2 a.a. que interrumpen la región del péptido C (56, 57).

### ***b) Organización de la proteína***

La insulina es una hormona esencial para el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en el organismo. Es una proteína dimérica altamente conservada a través de la evolución. Tiene un peso molecular de 5.8 Daltones (D) y está constituida por dos cadenas polipeptídicas A y B, que se unen entre sí por enlaces disulfuro (Fig. 8) (58, 59).



**Fig. 8.** Estructura de la insulina. Modificada de Pathophysiology: concepts of altered health states, 2007 (59).

### c) *Biosíntesis de insulina*

La insulina es sintetizada en humanos y otros mamíferos por las células  $\beta$  del páncreas, en forma de un precursor inactivo conocido como preproinsulina. Esta hormona contiene además de su cadena A y B dos secuencias adicionales de aminoácidos, uno es el péptido C y otro una secuencia líder en la región amino terminal. Esta última dirige a la preproinsulina al retículo endoplásmico para su procesamiento post-traduccion. Dentro del retículo endoplásmico la secuencia señal de la preproinsulina es removida proteolíticamente para formar la proinsulina. Esta continúa su tránsito hacia el aparato de Golgi en donde es almacenada en granulos secretores hasta que llega una señal que induce su secreción, una vez recibida esta señal la proinsulina se convierte en insulina activa por endoproteasas que cortan los enlaces peptídicos (60).

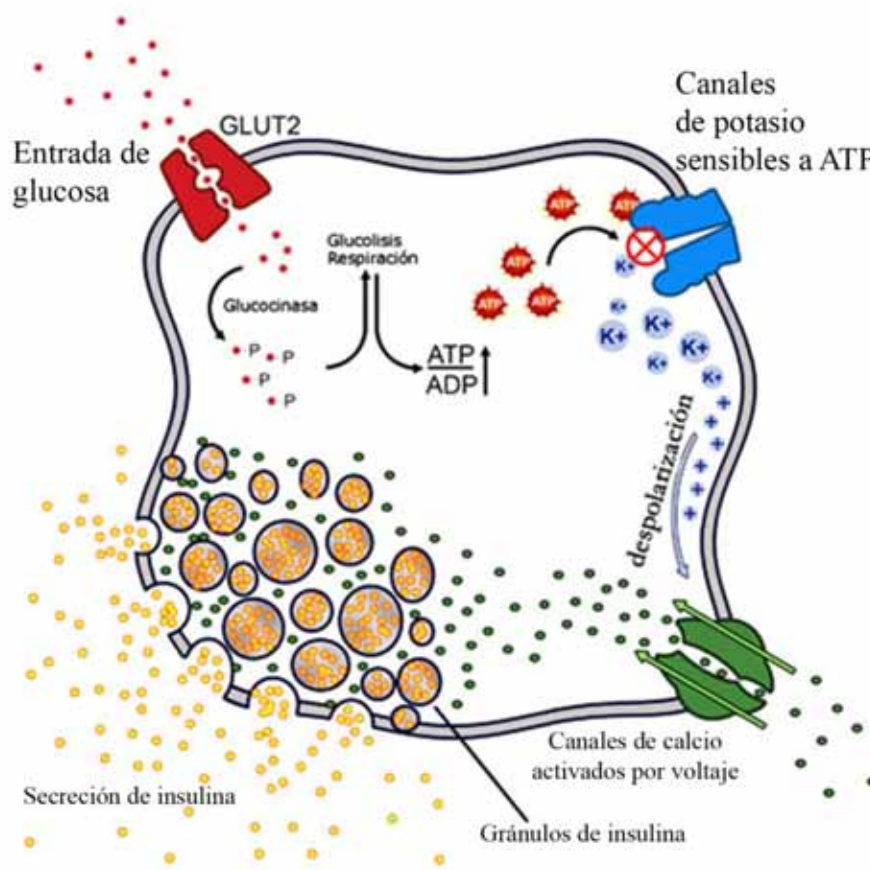
#### ***d) Regulación de la biosíntesis de insulina***

Se conocen diversos factores reguladores de la biosíntesis de insulina, entre estos se encuentran algunos aminoácidos, cuerpos cetónicos, ácidos grasos, algunos mediadores del sistema nervioso como la noradrenalina o la acetilcolina, sin embargo, la glucosa es el principal regulador tanto de la síntesis como de la secreción de esta hormona (61).

La glucosa para poder ser utilizada necesita de moléculas especializadas conocidas como transportadores de glucosa (GLUTs) situados en la membrana plasmática que dirigen la entrada de glucosa al interior celular. Hasta la fecha se han descrito 12 transportadores con sitios de expresión en tejidos específicos (Tabla 2) (62).

<b>Tabla 2. Expresión de los transportadores de glucosa en tejidos de mamífero</b>	
<b>Transportador</b>	<b>Principales sitios de expresión</b>
GLUT1	Placenta, cerebro, riñón, colón y músculo esquelético
GLUT2	Riñón, células- $\beta$ , hígado e intestino delgado
GLUT3	Diversos tejidos, incluyendo cerebro, placenta y riñón
GLUT4	Músculo esquelético, corazón y tejido adiposo
GLUT5	Transportador de la fructuosa en intestino delgado
GLUT6	No se expresa codifica un pseudogen
GLUT7	Hígado (parte del complejo glucosa-6-fosfatasa en el retículo endoplasmático)
GLUT8/GLUTX1	Testículos y blastocitos
GLUT9	Cerebro y leucocitos
GLUT10	Hígado y páncreas
GLUT11	Corazón y músculo esquelético
GLUT12	Músculo esquelético y tejido adiposo

El transportador tipo 2 es el encargado de conducir la glucosa hacia la célula beta, una vez que ingresa al interior de la célula, esta es fosforilada por la enzima glucocinasa y entra al ciclo glicolítico generando un aumento en la concentración de ATP-ADP. Este incremento inactiva canales sensibles a potasio lo que ocasiona un cambio en la polaridad de la membrana, provocando la apertura de canales de calcio y subsecuentemente la liberación exocítica de insulina de los gránulos secretores (Fig. 9) (63,64).

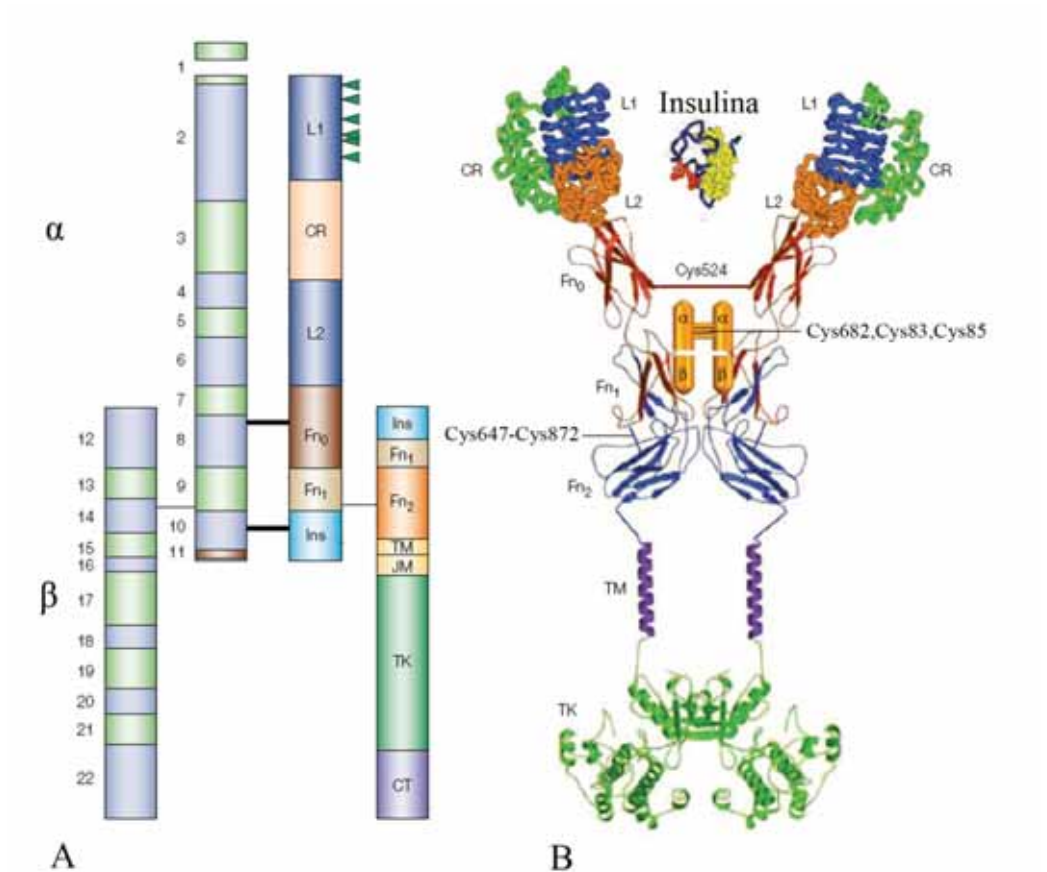


**Fig. 9.** Liberación exocítica de insulina. Tomada de Beta Cell Biology Consortium, 2004 (64).

### ***e) Acción de la insulina***

Una vez que la insulina es secretada al torrente circulatorio se distribuye a los diferentes tejidos blanco y allí actúa a través de un receptor de membrana específico, el cual pertenece a la subfamilia de receptores que tienen actividad tirosina cinasa, incluyen al IGF-I y al receptor relacionado a la insulina (IRR). Son proteínas tetraméricas transmembranales constituidas por dos subunidades  $\alpha$  de 135 kilo daltones (kDa) y dos subunidades  $\beta$  de 95 kDa, unidas entre sí por puentes disulfuro. La subunidad  $\alpha$ , de 719 ó 731 a.a que se encuentra en la parte externa de la membrana, comprende la porción amino terminal del precursor y contiene el dominio de unión a la insulina. La subunidad  $\beta$ , de 620 a. a, corresponde a la porción del carboxilo terminal del precursor, incluye un dominio extracelular de 194 a.a, un dominio transmembranal de 23 a.a, y un dominio citoplasmático de 403 a.a con los elementos estructurales requeridos para la actividad de cinasa (Fig.10) (65, 66).



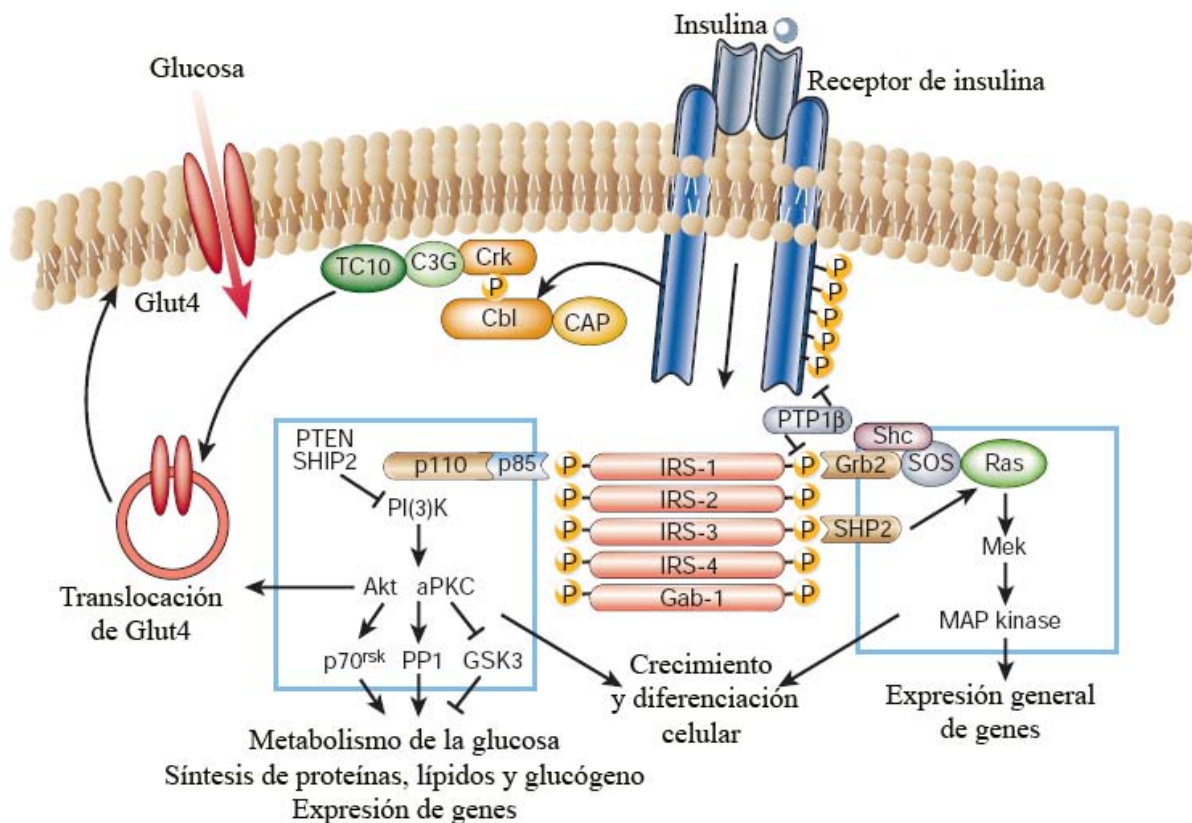


**Fig. 10.** Estructura modular **A** y tridimensional **B** del receptor de insulina.

Subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor de insulina unidas a través de puentes disulfuro (líneas negras y residuos de cisteínas 524,682,683,685,647 y 872). Las puntas de flecha en verde indican el sitio de unión del ligando. Los números 1-22 muestran los 22 exones del gen. L1 y L2 dominios ricos en leucinas, CR dominios ricos en Cisteínas, Fn0, Fn1, Fn2, dominios de fibronectina tipo III, TM dominio transmembranar, JM dominio yuxtamembranal, TK dominio tirocina cinasa, CT extremo carboxilo-terminal. Se muestra también la estructura tridimensional de la molécula de insulina.

Modificada de De Metys and Whittaker, 2002 (66)

El primer evento específico para la acción de la insulina es su unión a las cadenas alfa del receptor, la interacción de la insulina provoca un cambio conformacional en las cadenas alfa y autofosforilación de las cadenas beta. Esto induce una cascada de transducción de señales la cual, por un lado permite al transportador de glucosa translocarse a la membrana para transportar glucosa al interior celular. Por otro lado, esta fosforilación cataliza la fosforilación de proteínas celulares como la familia del sustrato receptor de la insulina (IRS), esto permite activar 2 rutas principales que son: la vía del fosfatidil inositol trisfosfato PI(3) y la vía de las MAP cinasas a través de las cuales la insulina ejecuta una amplia variedad de funciones biológicas como son: la activación y expresión de genes, lo cual resulta en la regulación del metabolismo de la glucosa, síntesis de glucógeno, proteínas, lípidos, crecimiento y diferenciación celular (Fig. 11) (67).



**Fig. 11.** Cascadas de señalización activadas por insulina. Tomada de Saltiel *et al*, 2001 (67).

### *f) Insulina y síntesis del glucógeno*

Además de permitir la absorción de glucosa por tejidos blanco, la insulina promueve su almacenamiento. La glucosa se puede almacenar fundamentalmente en dos formas: como glucógeno y mediante una conversión metabólica en triglicéridos.

El glucógeno es un polímero formado por residuos de glucosa unidos por enlaces 1-4 y 1-6  $\alpha$ . Se deposita en el citoplasma de las células formando agregados, los cuales contienen las enzimas necesarias para su síntesis y degradación. Esta forma de almacenamiento es importante fisiológicamente ya que reduce al máximo los cambios de presión osmótica que la glucosa libre podría ocasionar, tanto en el interior de la célula como en el medio extracelular (43).

Los principales sitios de depósito del glucógeno son el hígado y el músculo esquelético; otros tejidos como el adiposo y el cerebro también almacenan glucógeno pero en cantidades relativamente pequeñas. La manera en que la insulina promueve la síntesis de glucógeno ocurre a través de dos procesos enzimáticos: activa la enzima glucógeno-sintasa promoviendo su defosforilación y por otro lado inactiva la glucógeno-fosforilasa favoreciendo también su defosforilación. El resultado neto es la síntesis de glucógeno y la inhibición de su hidrólisis (43).

## **5. Diabetes**

La deficiencia en la secreción o incorporación de insulina por tejidos blanco, induce una serie de alteraciones metabólicas conocidas como diabetes mellitus (DM). La DM es un padecimiento multifactorial con alteraciones en el metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas. Esta enfermedad afecta a millones de personas a nivel mundial y actualmente en México se considera el principal problema de salud (68).

### ***a) Clasificación***

En general se distinguen cuatro tipos de DM. La primera denominada tipo 1 (DM1) se caracteriza fundamentalmente por la destrucción auto inmune de las células beta pancreáticas. Representa aproximadamente el 10% de los casos, se puede presentar a cualquier edad aunque es más común en niños y adultos jóvenes (69).

Un segundo tipo es la (DM2) en la cual los tejidos que normalmente responden apropiadamente a la insulina dejan de hacerlo, ocasionando de manera paralela defectos en la secreción de esta hormona. Este tipo de diabetes representa cerca del 90% de los casos, aparece en general en la edad adulta y está fuertemente asociada con obesidad e hipertensión arterial (70).

Un tercer grupo comprende otros tipos de diabetes como las inducidas por defectos genéticos a nivel de las células beta, o a nivel de la estructura de la insulina, por enfermedades del páncreas, o endocrinopatías, por sustancias químicas capaces de inducir diabetes, por infecciones o síndromes asociados a la enfermedad (Tabla 3) (71).

El cuarto tipo se refiere a la diabetes gestacional, la cual se manifiesta exclusivamente durante el embarazo. Se presenta en el 3-12% de mujeres embarazadas y se ha observado que 30% de éstas llegan a desarrollar la enfermedad en los años posteriores (72).

<b>Tabla 3. Clasificación etiológica de la diabetes mellitus</b>	
<p><b>I. Diabetes tipo 1**</b></p> <p>Destrucción de células <math>\beta</math> que conduce a una deficiencia absoluta de insulina.</p> <p>A. Mediada por mecanismos inmunológicos</p> <p>B. Idiopática</p>	<p><b>II. Diabetes tipo 2**</b></p> <p>Existen variaciones que van desde el predominio de la resistencia a la insulina con relativa deficiencia de ésta, hasta el defecto predominante en la secreción con resistencia a la acción de la hormona.</p>
<b>III. Otros tipos específicos.</b>	
<p>A. Defectos genéticos de la función de la</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. En cromosoma 12, HNF-1<math>\alpha</math></li> <li>2. En cromosoma 7, glucocinasa</li> <li>3. En cromosoma 20, HNF-4<math>\alpha</math></li> <li>4. En ADN mitocondrial</li> <li>5. Otros</li> </ol> <p>B. Defectos genéticos en la acción de la</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Resistencia a la insulina tipo A</li> <li>2. Leprechaunismo</li> <li>3. Síndrome de Rabson-Mendehall</li> <li>4. Diabetes Iipoatrófica</li> <li>5. Otros</li> </ol> <p>C. Enfermedades del páncreas exócrino.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pancreatitis</li> <li>2. Traumatismo/pancreatectomía</li> <li>3. Neoplasia</li> <li>4. Fibrosis quística</li> <li>5. Hemocromatosis</li> <li>6. Pancreatopatía fibrocalculosa</li> <li>7. Otras</li> </ol> <p>D. Endocrinopatías</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Acromegalia</li> <li>2. Síndrome de Cushing</li> <li>3. Glucagonoma</li> <li>4. Feocromocitoma</li> <li>5. Hipertitoidismo</li> <li>6. Somatostatinaoma</li> <li>7. Aldosterona</li> </ol> <p>Otras.</p>	<p>E. Sustancias químicas o drogas capaces de inducir Diabetes:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pentamidina</li> <li>2. Ácido nicotínico</li> <li>3. Glucocorticoides</li> <li>4. Hormona tiroidea</li> <li>5. Diazóxido</li> <li>6. Agonistas <math>\beta</math>-adrenérgicos</li> <li>7. Tiazidas</li> <li>8. Difenilhidantoína</li> <li>9. <math>\alpha</math>-interferón</li> <li>10. otras</li> </ol> <p>F. Infecciones</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Rubéola congénita</li> <li>2. Citomegalovirus</li> <li>3. Otras.</li> </ol> <p>G. Formas poco comunes de diabetes mediada Inmúlogicamente:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Síndrome del hombre rígido</li> <li>2. Anticuerpos contra el receptor de insulina</li> <li>3. Otras.</li> </ol> <p>H. Otros síndromes que algunas veces se asocian con</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Síndrome de Down</li> <li>2. Síndrome de Klinefelter</li> <li>3. Síndrome de Turner</li> <li>4. Síndrome de Wolfram</li> <li>5. Ataxia de Friedreich</li> <li>6. Corea de Huntington</li> <li>7. Síndrome de Lawrence Moon Beidel</li> <li>8. Distrofía miotónica</li> <li>9. Porfirio</li> <li>10. Síndrome de Prader Willi</li> <li>11. Otros</li> </ol>
<b>IV. Diabetes mellitus gestacional</b>	

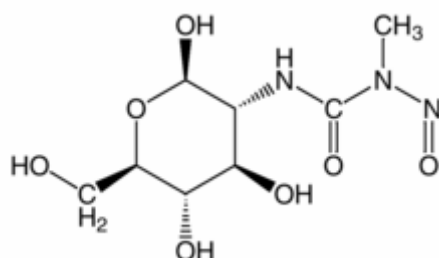
Tomada del reporte de expertos en diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus. Diabetes care, 1997. (72)

### ***b) Inducción experimental de diabetes con estreptozotocina***

una aproximación al entendimiento de la DM se ha logrado con el empleo de modelos animales diabéticos inducidos con estreptozotocina (STZ).

La (STZ, N-(metilnitrosocarbamocil)-D-glucosamina) es un antibiótico de amplio espectro producido por *Streptomyces achromogenes* (73), se ha utilizado ampliamente para inducir diabetes en animales de experimentación en una dosis única que dependiendo de la especie puede ir desde 40 mg/kg vía intravenosa en perros hasta 200 mg/kg en ratones (74). Esta molécula provoca un daño irreversible en las células  $\beta$  del páncreas lo que conlleva a un estado de hiperglicemia severa dentro de los 2-4 días posteriores a su administración (75).

La STZ es estructuralmente similar a la glucosa y es internalizada en la célula  $\beta$  vía el transportador GLUT-2 (Fig. 12) (76).



**Fig. 13.** Estructura de la molécula de estreptozotocina. Modificada de Gunnarsson *et al*, 1973 (77).

La administración de STZ *In vivo* da por resultado la generación de radicales metilo y  $H_2O_2$ . Estos causan la fragmentación del ADN, seguida por disminución en la síntesis y secreción de insulina. El daño provocado, induce la activación de la poli-ADP-

ribosa polimerasa. Esta enzima causa disminución en los niveles de NAD y por lo tanto, la destrucción de la célula beta (76, 77).

En animales con diabetes inducida experimentalmente con STZ es bien conocido que la enfermedad provoca alteraciones en la función reproductora (78). Asimismo, en ratas adultas se han descrito modificaciones en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. La deficiencia en la secreción de diferentes hormonas como la folículo-estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH), prolactina y testosterona, originan problemas de infertilidad (79). En ratas machos con diabetes de larga duración las disfunciones sexuales son muy comunes, se ha documentado la pérdida de la emisión seminal y alteraciones en la espermatogénesis (80).



#### **IV. Justificación**

No obstante que se conocen las alteraciones provocadas por la STZ en animales adultos, durante la etapa embrionaria no se ha descrito su efecto. Los niveles altos de glucosa materna pueden afectar la morfología y función secretora de la células de Leydig fetales.

## **V. Hipótesis**

La diabetes inducida experimentalmente con STZ en ratonas gestantes provoca alteraciones en el testículo fetal. En los fetos macho, las células de Leydig son afectadas en el metabolismo del glucógeno y la producción de testosterona.

## **VI. Objetivos**

- 1.** Determinar si los niveles altos de glucosa inducidos por acción de la estreptozotocina afectan la diferenciación morfológica y fisiológica de las células de Leydig de los fetos de ratonas diabéticas.
- 2.** Conocer si la producción de testosterona en los embriones macho de ratonas gestantes diabéticas es afectada.
- 3.** Identificar los tipos celulares que producen insulina en el testículo fetal a los 16 y 18 días de gestación.

## **VII. Material y Métodos**

### ***a) Reactivos y disolventes***

Todos los reactivos y disolventes orgánicos empleados en la presente investigación fueron de grado analítico y se obtuvieron de diferentes casas comerciales.

### ***b) Animales de experimentación***

Se emplearon ratones hembra adultas de la cepa CDI con un peso entre 20 y 25 gramos, las cuales se aparearon con machos de la misma cepa en relación 3:1 durante toda la noche. Los animales se mantuvieron a una temperatura de 22° C con ciclos de luz oscuridad de 12 horas cada uno, con agua y alimento *ad libitum*. La presencia del tapón vaginal se consideró como el día cero de gestación.

### ***c) Inducción de diabetes por estreptozotocina***

Se emplearon ratonas gestantes al día 7 *dpc*, estas se dividieron en dos grupos un experimental y un control. Al grupo experimental se le administró a través de la vena caudal una dosis única de estreptozotocina de 200-230 mg/kg de peso (Sigma-Aldrich<sup>TM</sup>) reconstituida en una solución amortiguadora de citrato de sodio 1 molar (M) pH 4.5 y al grupo control se les administró únicamente el vehículo. Ambos grupos se mantuvieron en el bioterio con las condiciones de luz y temperatura antes mencionadas y con una dieta alta en grasa (Harlan Tekland México LM-485) y agua estéril acidificada a pH 2.5.

Dos días después de la inoculación de la STZ se cuantificaron los niveles de glucosa sanguínea, se llevó un registro del peso e ingesta de alimento de cada hembra gestante, y adicionalmente se administró un suplemento vitamínico durante toda la gestación. Los niveles de glucosa se determinaron tomando sangre del plexo intraorbital retrobulbar y se cuantificaron con un glucómetro digital (One Touch Basic Plus <sup>TM</sup>). Posteriormente cada dos días y hasta su sacrificio se llevó un registro de las variables mencionadas, peso, glucosa e ingesta de alimento. Niveles superiores a 200 mg/dl de glucosa 48 hrs. después de la administración de la STZ se consideraron indicadores de diabetes.

#### ***d) Cuantificación de glucosa fetal***

Para conocer los niveles de glucosa fetal, los embriones se decapitaron a los 16 y 18 *dpc*, se obtuvieron muestras de sangre y se cuantificaron como se mencionó anteriormente, empleando un glucómetro digital.

#### ***e) Microscopia electrónica***

Para analizar el efecto de la glucosa alta en la diferenciación morfológica de las células testiculares embrionarias, se sacrificaron las ratonas gestantes por dislocación cervical a los 14, 16 y 18 *dpc*. Se obtuvieron los embriones y se extrajeron los testículos, éstos se fijaron durante 8 hrs. en Karnovsky modificado (sin  $\text{Ca}^{++}$ ) pH 7 y posteriormente se procesaron para su análisis en el microscopio electrónico de acuerdo a la técnica descrita por Merchant Larios (81). Brevemente, el tejido se enjuagó con amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M, pH 7.4 por 3 veces 10 minutos (min) cada cambio. Los testículos se posfijaron con tetraóxido de osmio 1 hr. y el tejido se deshidrató con etanol en agua en concentraciones ascendentes del 70 al 90%. Posteriormente se transfirieron a etanol absoluto 15 min y se realizaron 3 cambios. Después el tejido se puso en una mezcla de

EPON y etanol u óxido de propileno 1:1 una hr. y luego 1:3 y después en epon solo toda la noche. El tejido se incluyó con epon en moldes planos a 60°C, 24 hrs.

#### ***f) Cuantificación de testosterona***

Para conocer si la producción de testosterona fetal se ve afectada como resultado de la hiperglicemia producida con el tratamiento de STZ, se aislaron los testículos nuevamente y se realizaron grupos de aproximadamente 40 gónadas por edad, tanto controles como experimentales y se congelaron a -20° C hasta su análisis por radioinmunoanálisis (RIA).

Posteriormente el tejido se homogenizó con medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (Invitrogen) y se extrajeron los esteroides totales, de acuerdo a la técnica descrita por Salame y colaboradores (82). Para esto se adicionó éter etílico en proporción 1:10. La fase orgánica se separó de la acuosa colocando cada tubo en hielo seco y acetona, al congelarse la fase acuosa, la orgánica se decantó a otro tubo. Esta se evaporó a temperatura ambiente o a 32-33°C. La cuantificación de testosterona se realizó por (RIA) empleando un estuche comercial de Diagnostic Systems Laboratories (DSL-4100®).

#### ***g) Cultivo de células de Leydig y Sertoli***

Para identificar el tipo celular que produce insulina en el testículo embrionario del ratón, se realizaron cultivos de células de Leydig y Sertoli de acuerdo a la técnica descrita por Fabre y colaboradores (83).

Brevemente, una vez obtenidas las gónadas, estas se colocaron en medio (DMEM), suplementado con bicarbonato de sodio 7.5%, L-glutamina 200 mM, penicilina-G-sódica con sulfato de estreptomina 5,000 U/μg/mL, Piruvato de sodio 11mg/mL y amortiguador HEPES 25 mM, posteriormente se lavaron con solución

salina libre de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  (PBS) y después se adicionó una mezcla enzimas: Colagenasa Dispasa (0.2 mg/ml) y DNasa (0.1 mg/ml) resuspendidas en PBS. El tejido se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  y se disgregó manualmente. Después de este tiempo la actividad enzimática se inhibió adicionando inhibidor de tripsina al 0.2%.

Una vez disgregado el tejido, éste se centrifugó y se separó el sobrenadante, al centrifugar, las células de Sertoli se precipitan en el fondo del tubo y las células de Leydig se mantienen en la superficie. Las células de Leydig así obtenidas se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron en medio DMEM para posteriormente colocarse en cajas de cultivo (Nunclon<sup>R</sup>).

El tejido sedimentado por gravedad conteniendo a las células de Sertoli se disgregó nuevamente con tripsina al 0.12%, se y se centrifugó, la actividad enzimática igualmente se inhibió con inhibidor de tripsina al 0.2 % y se centrifugó una vez más. Las células de Leydig y Sertolí aisladas de esta manera se sembraron con medio de cultivo DMEM y se incubaron durante 24 hrs. en una estufa de cultivo a  $37^{\circ}\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$ .

#### ***h) Detección Inmunocitoquímica de insulina en cultivo celular***

Se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS 0.1M posteriormente, se fijaron con glutaraldehído al 0.31%, después de este tiempo se retiró el fijador y se lavaron nuevamente. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó incubando las células con de peróxido de hidrógeno (DAKO) 10 minutos. Después se lavaron las células 2 veces con PBS 0.1M y se incubaron con la siguiente solución de bloqueo: albúmina de suero bovino 5% fracción V pH 7.0 (Research Organics), gelatina 1% y Tween 20 0.05 % (Sigma-Aldrich) 1 hr. Posteriormente se retiró la solución de bloqueo y se adicionó el anticuerpo primario anti-insulina (RyD Systems),

resuspendido en solución de bloqueo a una concentración 1:10 24 hr. Posteriormente las células se lavaron con PBS twn 0.1% y se adicionó el anticuerpo secundario resuspendido en PBS a una concentración 1:100 incubándose una hr. Después de este tiempo las células se incubaron 1 hr. con 1:200 de solución Avidina-Biotina peroxidasa (ABC) (Vector laboratories Inc). Posteriormente se lavaron con PBS tween 0.1% y se adicionó diaminobenzidina (DAB) (DAKO) y se incubaron 30 min. La reacción se detuvo lavando con agua bidestilada. Finalmente las células se observaron en un microscopio invertido marca Olympus.



## **VIII. Resultados**

### ***a) Cambios en el peso corporal, niveles de glucosa sanguínea e ingesta de alimento***

En la tabla 1 y 2 se se presentan los cambios en el peso corporal, niveles de glucosa sanguínea e ingesta de alimento de ratonas tratadas con STZ y controles, registrados durante la progresión de la gestación y hasta su sacrificio.

En relación al peso corporal no encontramos diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos, control y experimental, en las dos edades analizadas 16 y 18 d.g.

En relación a los niveles de glucosa sanguínea observamos que la dosis de STZ empleada, 230-250 mg/Kg, dañó severamente a las células beta pancreáticas, debido a que la glucosa se elevó dos días después de su administración, con valores de 200 a 300 mg/dl en el grupo control y valores entre 95 y 100 mg/dl en el experimental. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas \* $P < 0.05$ .

Con respecto a la ingesta de alimento notamos diferencias significativas \*\* $P < 0.05$  entre el día 15 y 17 de la gestación en los grupos experimentales. El consumo en estos fue mayor debido muy probablemente a la sintomatología de la enfermedad, la cual se caracteriza entre otros síntomas por un incremento en el consumo de alimento o polifagia.

### ***b) Niveles de glucosa sanguínea fetales***

En relación a los niveles de glucosa fetales observamos que se incrementaron de manera muy significativa en los fetos de ratonas diabéticas. Los niveles de glucosa de los embriones de ratonas que no tuvieron el tratamiento fueron bajos. Gráfica 1.

**Tabla 1.** Cambios en el peso corporal, niveles de glucosa sanguínea e ingesta de alimento de ratonas gestantes controles y tratadas con STZ sacrificadas a los 16 dpc.

† Edad de gestación (dpc)	Peso corporal (g)		Glucosa sanguínea (mg/dl)		Ingesta de alimento (g)	
	Control	STZ	Control	STZ	Control	STZ
<b>9</b>	29.8 ± 2.4	29.4 ± 2.4	103 ± 11.0	213 ± 14.7*	6.5 ± 0.5	4.7 ± 2.0
<b>11</b>	33.4 ± 3.5	31.8 ± 3.5	106 ± 2.9	255 ± 74.0*	10.5 ± 3.4	7.1±4.6
<b>13</b>	38.4 ± 2.8	35.4 ± 4.0	98.8 ± 4.9	352±196.6*	8.3 ± 1.7	12.1± 4.8**
<b>15</b>	42.6 ± 3.1	39.1 ± 4.7	95.8 ± 6.8	333±103.7*	13.5 ± 5.2	11.4 ± 5.3

† Expresado como *días post coitum*; n=13 en cada grupo.

Los datos representan el promedio ± la desviación estándar.

Niveles de glucosa sanguínea \*P< 0.05 con respecto al control.

Ingesta de alimento\*\*P< 0.05 con respecto al control.

**Tabla 2.** Cambios en el peso corporal, niveles de glucosa sanguínea e ingesta de alimento de ratonas gestantes controles y tratadas con STZ sacrificadas a los 18 dpc.

† Edad de gestación (dpc)	Peso corporal (g)		Glucosa sanguínea (mg/dl)		Ingesta de alimento (g)	
	Control	STZ	Control	STZ	Control	STZ
<b>9</b>	29.6 ± 5.1	27.7 ± 2.3	104.7 ± 12.8	231.5 ± 59.7*	8.0 ± 3.6	4.4 ± 0.5
<b>11</b>	33.8 ± 6.4	29.4 ± 3.5	95.7 ± 13.1	320.6 ± 125.5*	12.3 ± 6.5	7.6 ± 3.3
<b>13</b>	39.3 ± 6.0	33.9 ± 5.5	111.9 ± 7.0	336.7 ± 120.2*	7.3 ± 3.0	12.7 ± 5.5**
<b>15</b>	45.5 ± 7.1	37.2 ± 6.9	117.9 ± 10.5	307.3 ± 83.5*	12.0 ± 4	15.6 ± 5.0
<b>17</b>	50.7 ± 7.6	40.6 ± 8.6	106.1 ± 10.3	307.4 ± 92.74*	12.1 ± 6.6	18.4 ± 5.5**

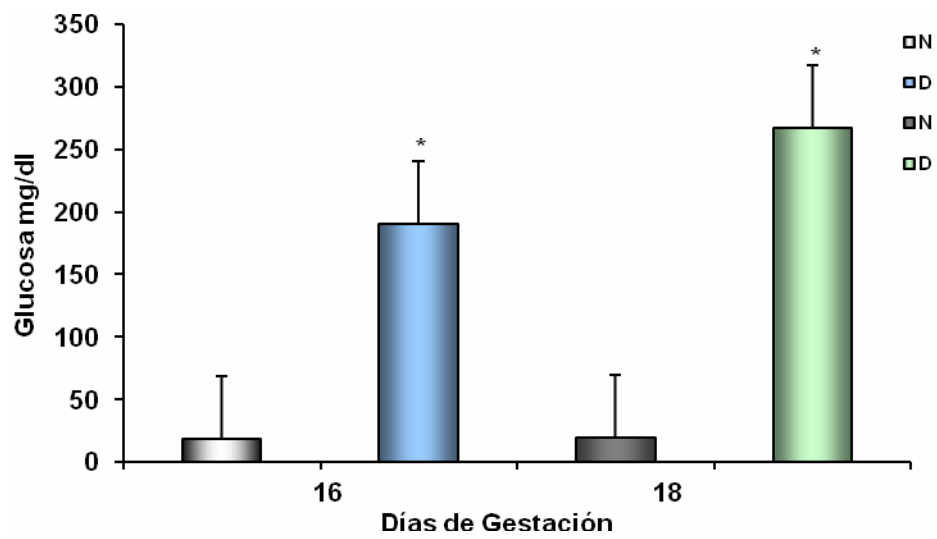
† Expresado como *días post coitum*; n=14 en cada grupo.

Los datos representan el promedio ± la desviación estándar.

Niveles de glucosa sanguínea \*P< 0.05 con respecto al control.

Ingesta de alimento\*\*P< 0.05 con respecto al control.

*b) Niveles de glucosa fetal*



**Gráfica. 1.** Niveles de glucosa sanguínea de embriones de madres normales (N) y diabéticas (D) de 16 y 18 *dpc*. Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar,  $n=5$ . Prueba “t” de Student,  $*P < 0.05$  con respecto al control.

### *c) Microscopía electrónica*

El análisis de microscopía electrónica reveló que las células de Leydig fetales de embriones de ratonas diabéticas fueron afectadas debido a que se observaron abundantes depósitos de glucógeno en su citoplasma desde las etapas más tempranamente analizadas, 14 y 16 *dpc*, así como también en etapas posteriores 18 *dpc*. En cuanto a los demás tipos celulares que se encuentran en el testículo en desarrollo, como son las células de Sertoli, las células mioideas peritubulares y proespermatogonias, no se detectaron cambios aparentes en su ultraestructura.

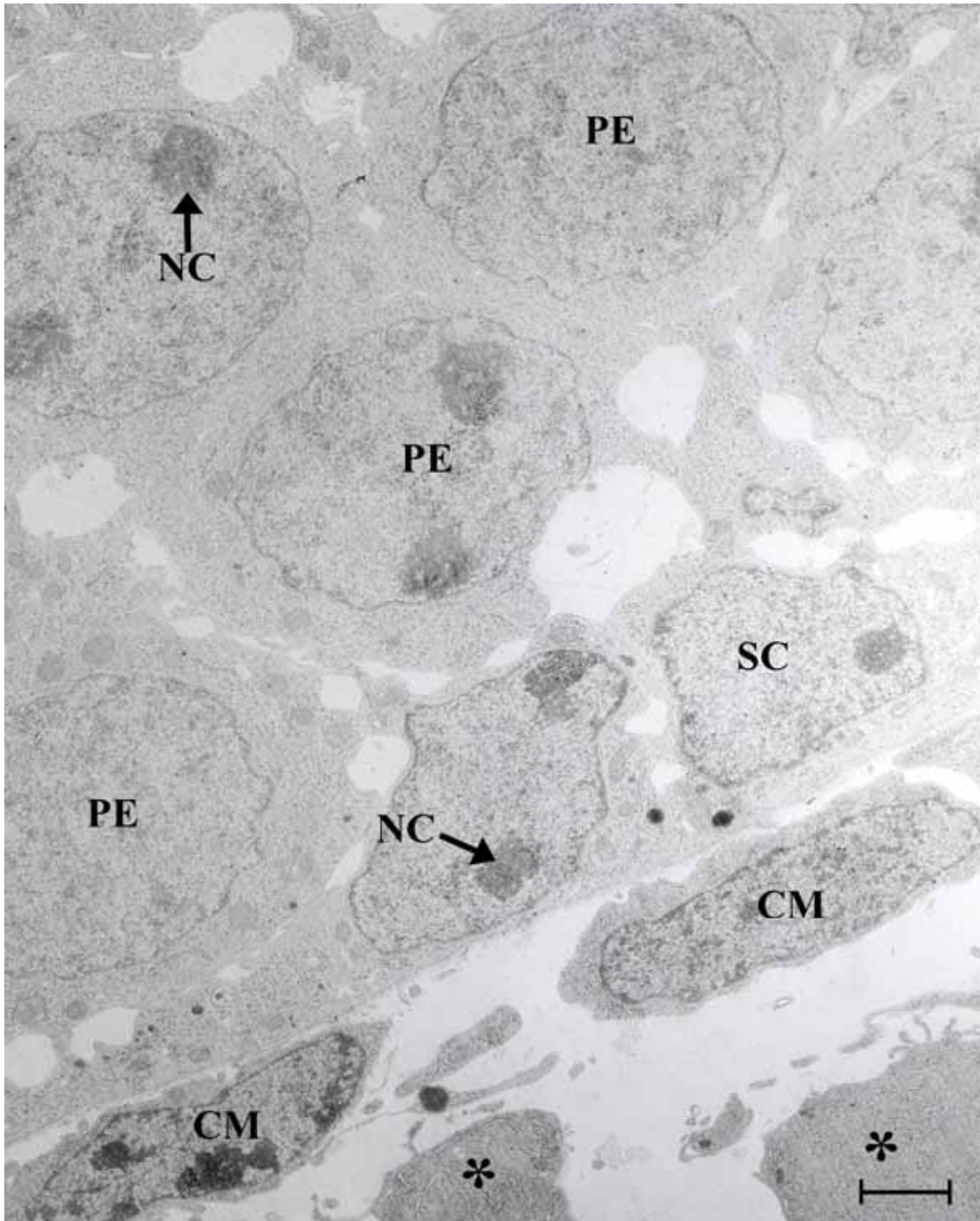
En la figura 1 se muestra un cordón testicular de 14 *dpc* de un embrión de madre normal. Dentro de él se observaron numerosas proespermatogonias, las cuales se caracterizan por tener núcleos muy grandes, y algunas células de Sertoli adosadas a la periferia. Rodeando al cordón se localizaron algunas células mioideas peritubulares.

En la figura 2 se presenta un cordón testicular de la misma edad de gestación, de un embrión de ratona diabética. Se observaron nuevamente los mismos tipos celulares mencionados, así como numerosas mitocondrias sin ningún cambio estructural aparente.

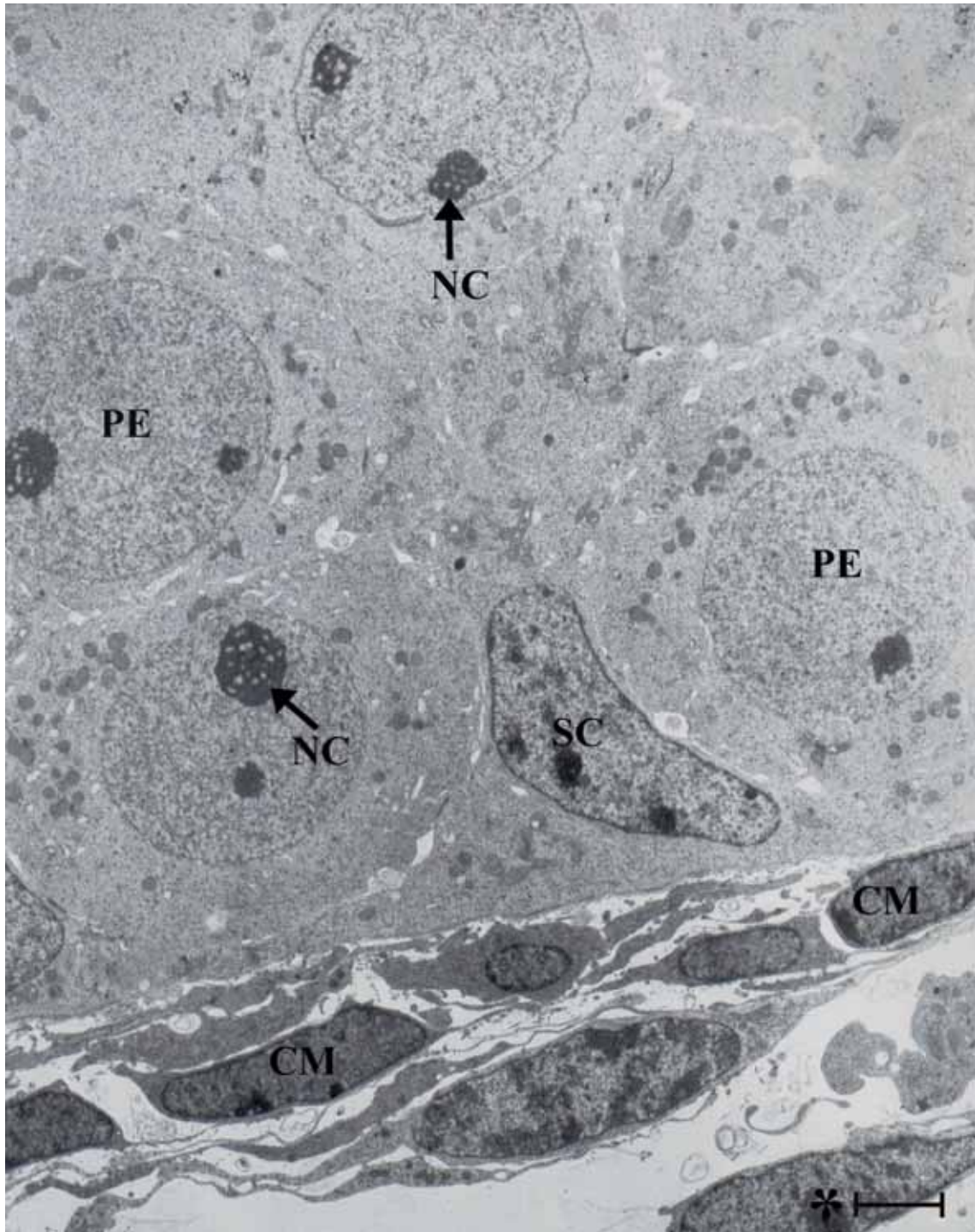
La figura 3 exhibe la región intersticial de un testículo fetal de 14 *dpc* control, en donde se pueden advertir grupos de células Leydig, las cuales se ubican normalmente cercanas a vasos sanguíneos, y se caracterizan por presentar inclusiones lipídicas en su citoplasma, así como mitocondrias con crestas tubulares. A esta edad se hizo evidente la presencia de pequeños depósitos de glucógeno en el citoplasma de estas células, sin embargo, estos fueron considerablemente menores con respecto a los observados en las células de Leydig de embriones de madres diabéticas Fig. 4.

A los 16 *dpc* en el grupo control las células de Leydig mostraron las mismas características descritas a los 14 *dpc*, numerosos lípidos, mitocondrias con crestas tubulares, un retículo endoplásmico liso y rugoso bien desarrollado, así como moderados depósitos de glucógeno Fig. 5. Sin embargo, en los grupos experimentales los acumulos de este carbohidrato fueron notablemente mayores Fig. 6.

A los 18 *dpc* detectamos en el grupo experimental que el almacén de glucógeno fue superior a lo observado en fetos más jóvenes. Numerosas partículas de glucógeno ocupan la mayor parte del citoplasma de las células de Leydig Fig. 8. En el grupo control, sin embargo, la cantidad de partículas es escasa o ausente Fig. 7.

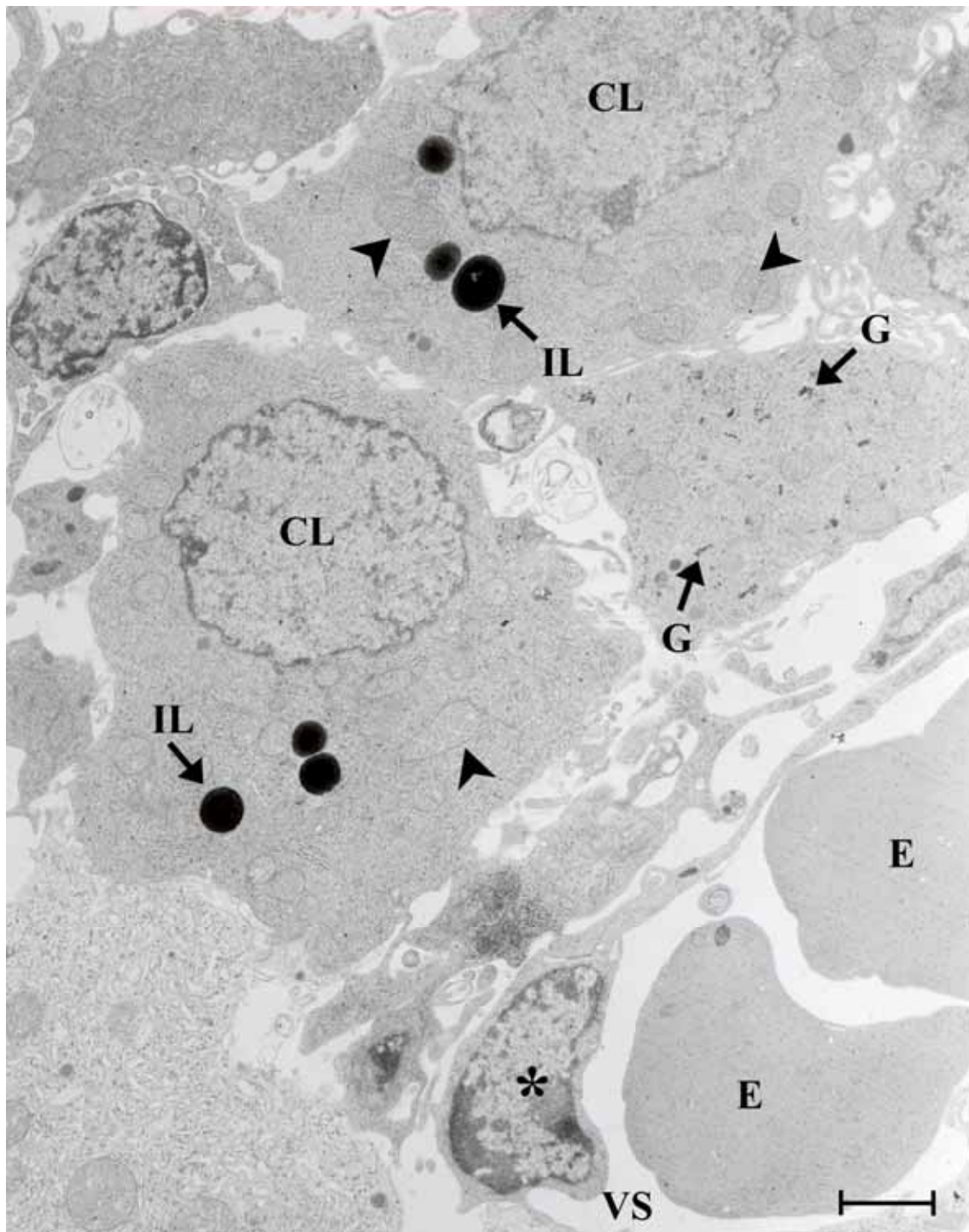


**Fig. 1.** Cordón testicular de 14 *dpc* de embrión de madre normal. Se observan numerosas proespermatogonias (PE). Adosadas a la periferia se encuentran células de Sertoli (CS) con uno o dos nucléolos (NC). Rodeando al cordón se observan dos células mioides peritubulares (CM) en las cuales la distribución de la cromatina varía. Se pueden observar también algunas células tipo fibroblastos (\*). Barra: 2 $\mu$ m.

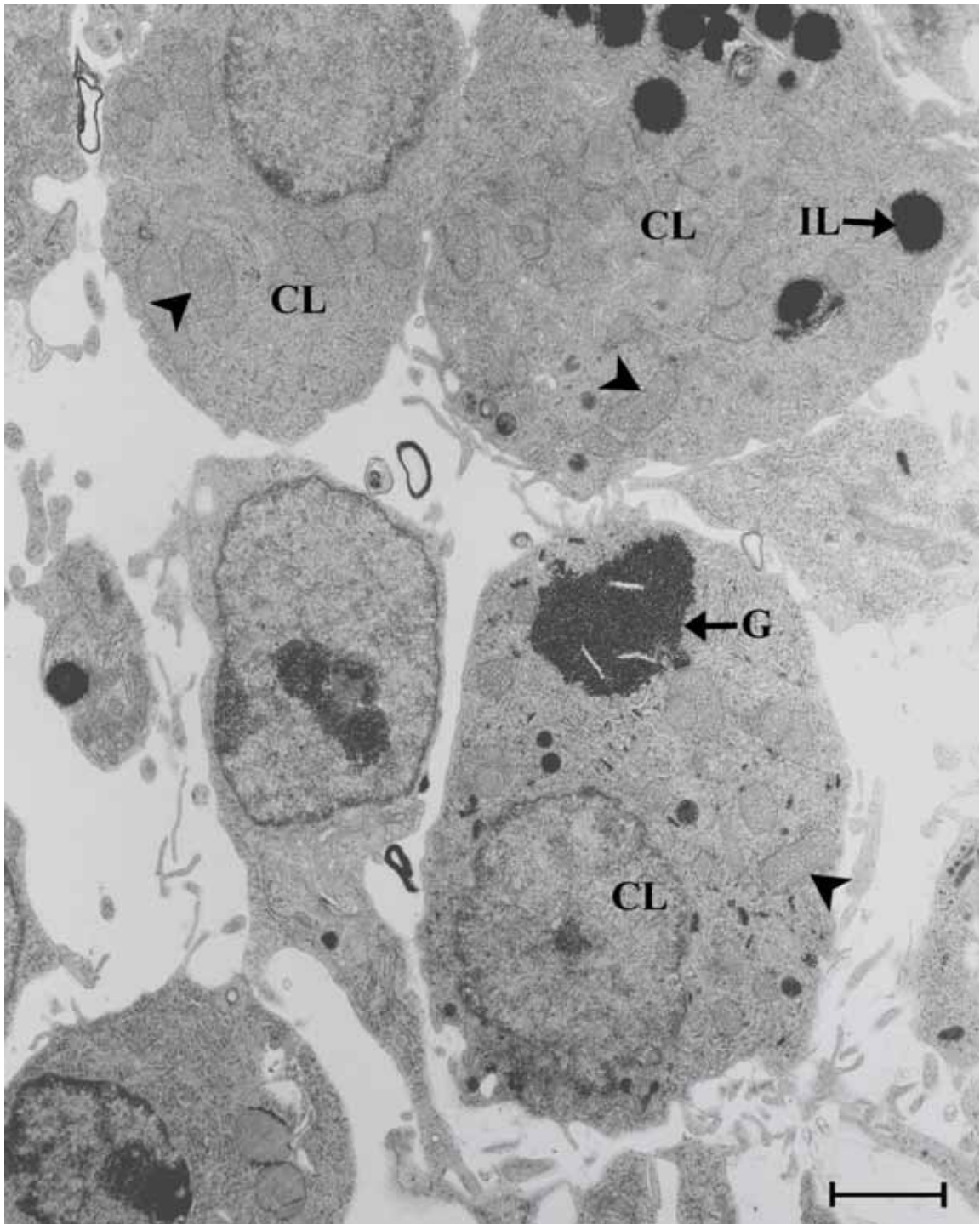


**Fig. 2.** Cordón testicular de 14 *dpc* de embrión de madre diabética. Proespermatogonias (PE). En la periferia del cordón se aprecia una célula de Sertoli (CS). Rodeando al cordón se observan diversas células mioides peritubulares (CM) Se pueden observar también algunas células tipo fibroblastos (\*). Barra: 2 $\mu$ m.

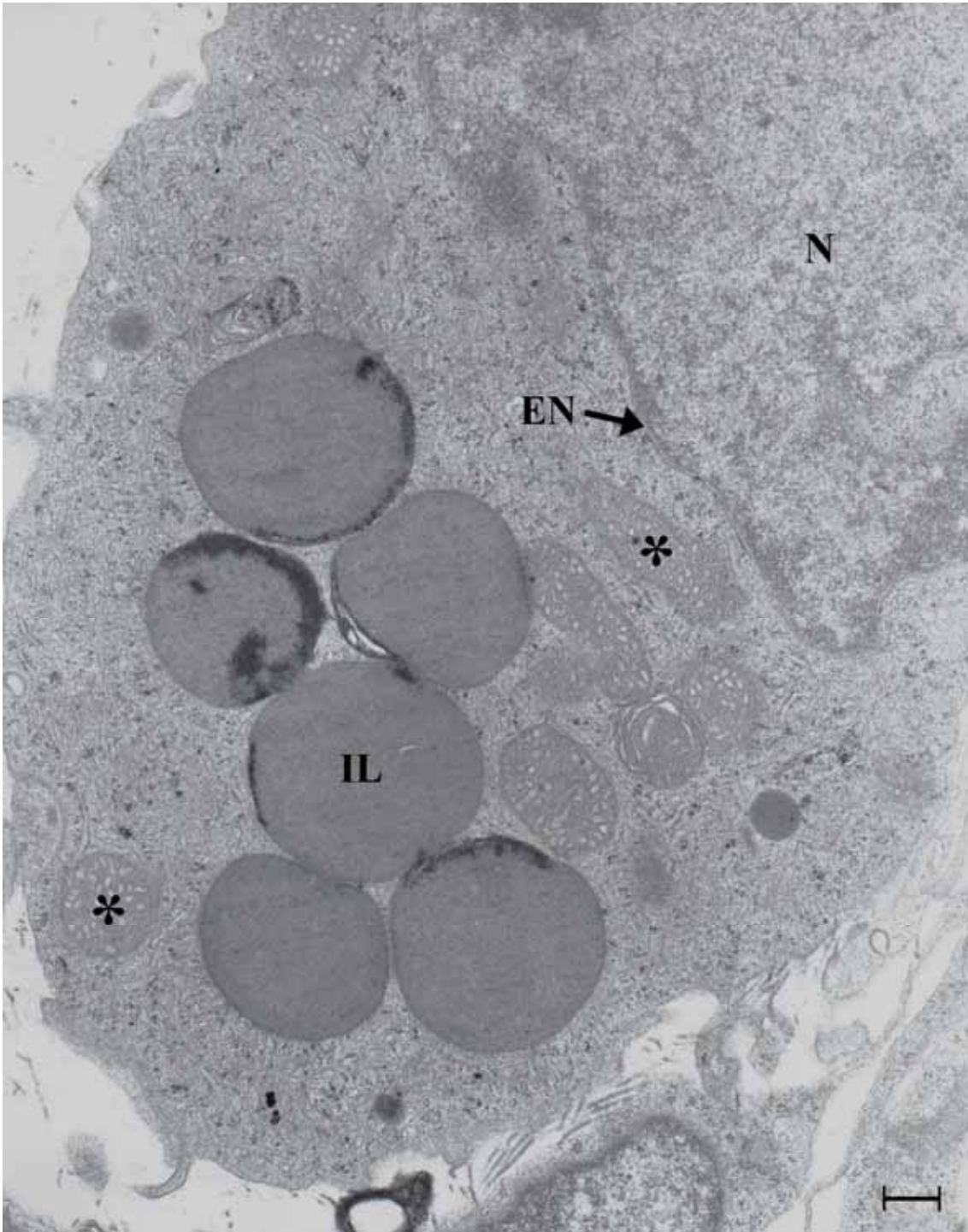




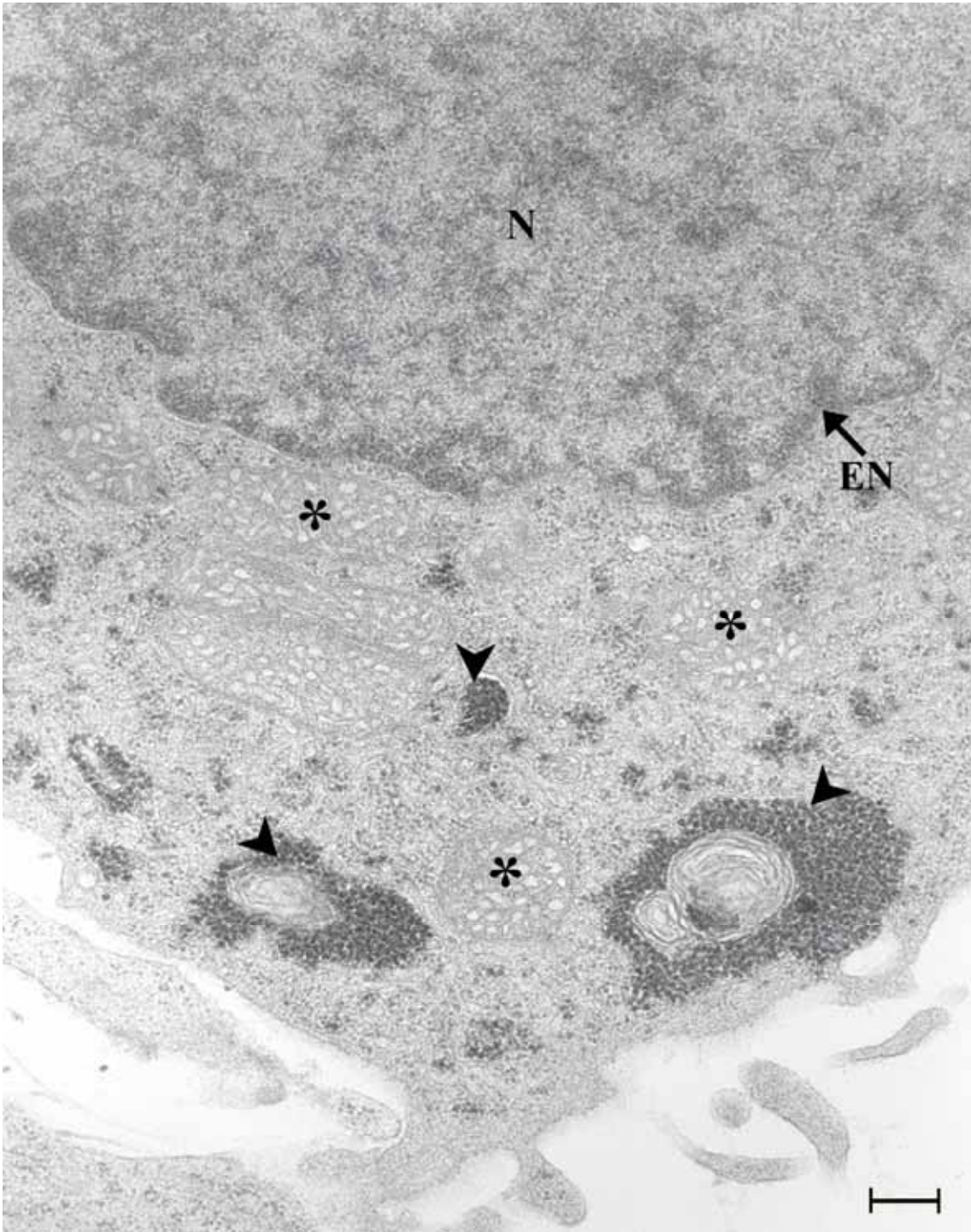
**Fig. 3.** Células de Leydig (CL) de 14 *dpc* de embrión de madre normal. En el citoplasma de estas células se observan mitocondrias con crestas tubulares (puntas de flecha), inclusiones lipídicas (IL) así como pequeños depósitos de glucógeno (G). Se puede observar también el núcleo de una célula endotelial (\*) de un vaso sanguíneo (VS) con dos eritroblastos (E). Barra: 2 $\mu$ m.



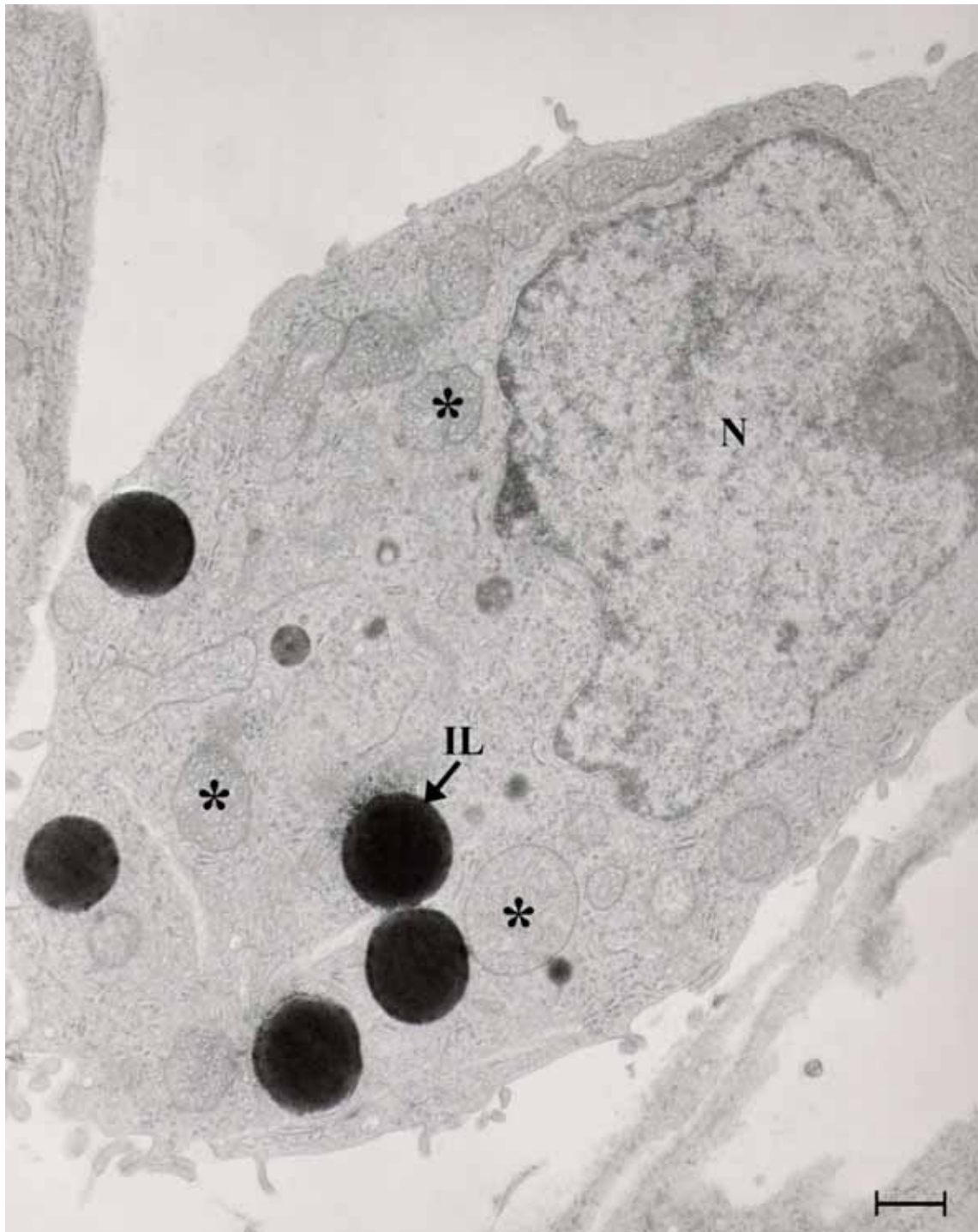
**Fig. 4.** Células de Leydig (CL) de 14 *dpc* de embrión de madre diabética. Se pueden observar abundantes depósitos de glucógeno (G) en el citoplasma de estas células, mitocondrias con crestas tubulares (puntas de flecha), así como algunas inclusiones lipídicas (IL). Barra: 2 $\mu$ m.



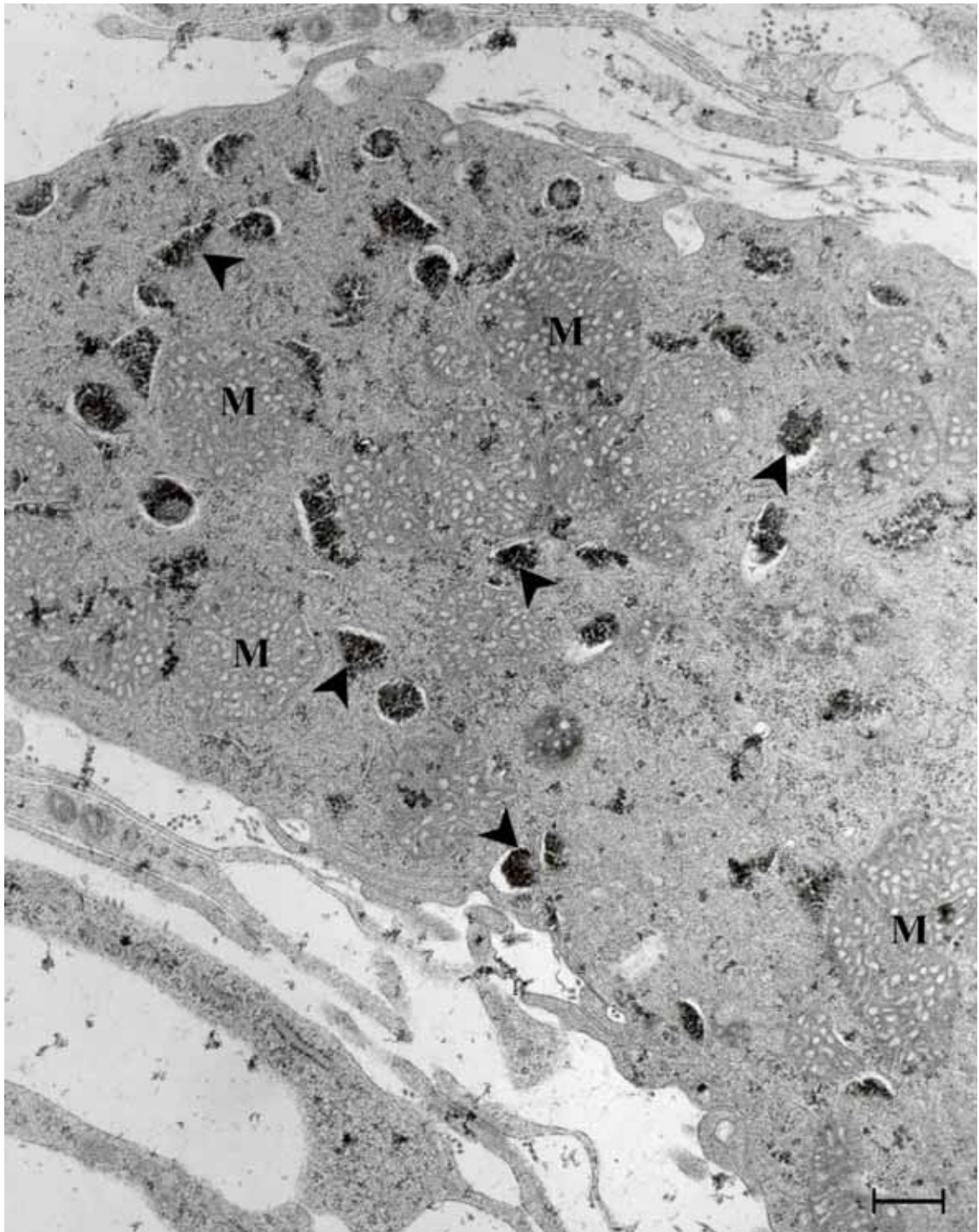
**Fig. 5.** Vista parcial de una célula de Leydig de 16 *dpc* de embrión de madre normal. Se observa el núcleo (N) y la envoltura nuclear (EN) de esta célula, así como abundantes inclusiones lipídicas (IL) en su citoplasma, y mitocondrias con crestas tubulares (\*). Barra: 500nm.



**Fig. 6.** Vista parcial de una célula de Leydig de 16 *dpc* de embrión de madre diabética. Se observa el núcleo (N) y la envoltura nuclear (EN), mitocondrias con crestas tubulares (\*) y abundantes acúmulos de glucógeno en su citoplasma (puntas de flecha). Barra: 500nm.



**Fig. 7.** Vista parcial de una célula de Leydig de 18 *dpc* de embrión de madre normal. Se observa el núcleo de la célula (N), mitocondrias con crestas tubulares (\*) e inclusiones lipídicas (IL) en su citoplasma. Barra: 1 $\mu$ m.

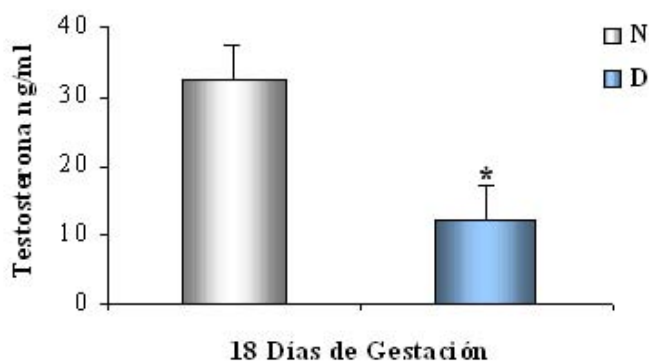
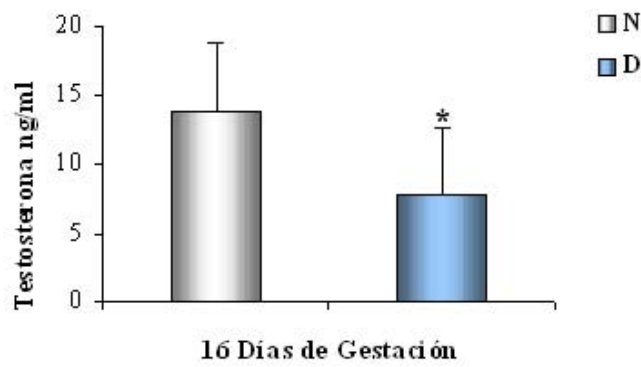


**Fig. 8.** Célula de Leydig de 18 *dpc* de embrión de madre diabética. Se puede observar que la mayor parte del citoplasma está ocupado por depósitos de glucógeno (puntas de flecha). Mitocondrias con crestas tubulares (M) Barra: 500nm.

#### d) Cuantificación de testosterona

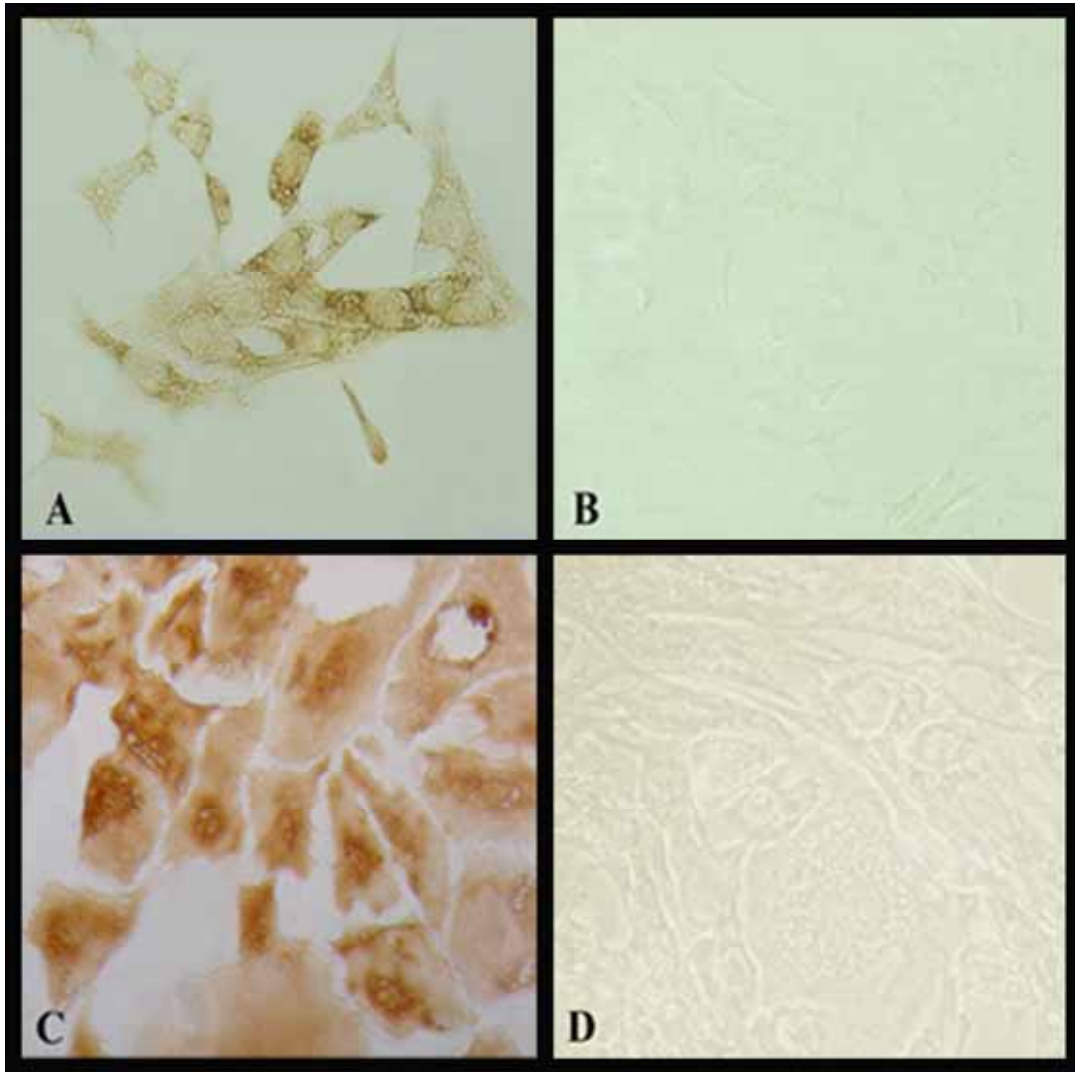
En relación a la cuantificación de testosterona, observamos que a los 16 *dpc* la producción de esta hormona fue de 14ng/ml y estos niveles disminuyeron considerablemente a 8 ng/ml en las gónadas de embriones de ratonas diabéticas Gráfica 2.

A los 18 *dpc* la tendencia observada fue la misma, con valores de 32 ng/ml en las gónadas normales y de 12 ng/ml en los diabéticos Gráfica 3.



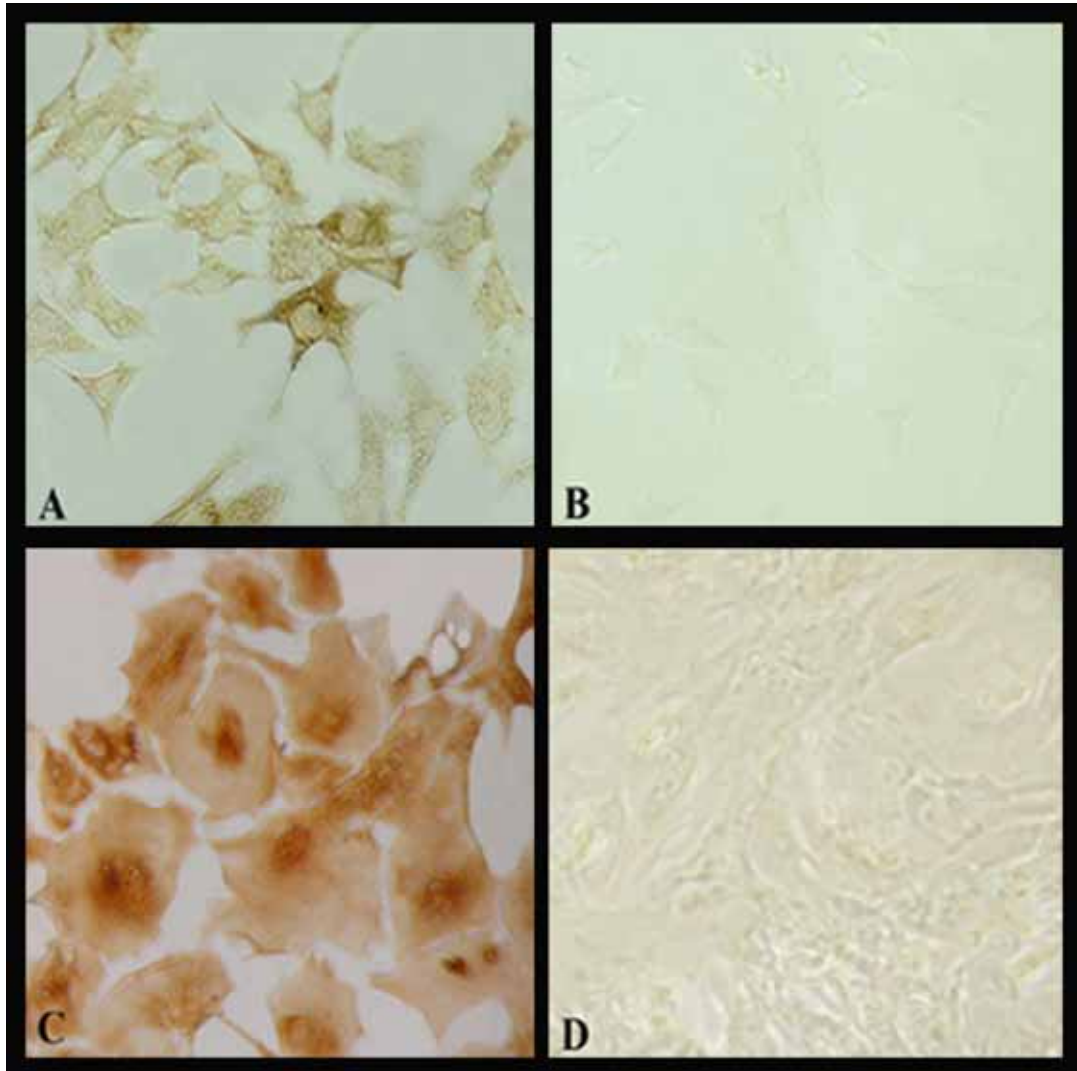
**Gráfica 3.** Producción de testosterona en testículos normales (N) y de embriones de madres diabéticas (D) de 18 *dpc*. Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes. “t” de Student, \*P< 0.05.

En cuanto a la identificación del tipo celular que produce insulina en el testículo fetal, nuestros resultados detectaron la expresión de la proteína tanto en células de Leydig, como en células de Sertoli en cultivo, a los 16 y 18 *dpc* Fig. 9 y 13.



**Fig. 9.** Inmunodetección de insulina en cultivo de células de Leydig y Sertoli. En el panel A y B se muestran células de Leydig de 16 *dpc* experimental y control respectivamente. C y D corresponden a células de Sertoli de la misma edad de desarrollo, experimental y control.





**Fig. 10.** Inmunodetección de insulina en cultivo de células de Leydig y Sertoli. En el panel A y B se muestran células de Leydig de 18 *dpc* experimental y control respectivamente. C y D corresponden a células de Sertoli de la misma edad de desarrollo, experimental y control.

## IX. Discusión

En el presente estudio se describe el tipo celular que produce insulina y el efecto que tiene la hiperglicemia de las madres diabéticas en el metabolismo del glucógeno y la actividad esteroideogénica del testículo fetal.

Los resultados indican que la diabetes inducida experimentalmente con STZ en ratonas gestantes provoca una serie de alteraciones en los testículos de los fetos, particularmente en las células de Leydig.

El efecto observado, puede ser una consecuencia directa de los elevados niveles de glucosa puesto que hasta el momento no se ha establecido si la STZ *per se* pueda ocasionar alteraciones directas en el desarrollo de fetal (84, 85).

Como lo muestra el análisis de microscopia electrónica, las células de Leydig se encuentran severamente afectadas debido a que en su citoplasma se observan abundantes partículas de glucógeno, en todas las etapas estudiadas.

Si bien los principales sitios de depósito de glucógeno son el hígado, músculo esquelético y en menor medida el tejido adiposo y cerebro, recientemente se demostró que durante la diferenciación sexual en el ratón inmediatamente después de la expresión del gen *Sry*, alrededor del día 11.5 *dpc*, ocurre en las células de pre-Sertoli una acumulación de glucógeno en un patrón de distribución que va del centro del testículo hacia los polos. Los autores proponen que los eventos morfogénicos de la gónada masculina tales como, la proliferación celular, migración, vasculogénesis y morfogénesis requieren de una alta energía metabólica comparada con la gónada femenina la cual no exhibe cambios histológicamente aparentes. La distribución de glucógeno está restringida en espacio y tiempo a las células de pre-Sertoli, en las que los gránulos de este carbohidrato disminuyen alrededor de los 12 *dpc* (86).

En lo que respecta a las células de Leydig fetales normales, se ha visto que en el ratón, éstas poseen partículas de glucógeno en su citoplasma, desde los 14 *dpc*. (87). Esto coincide con nuestros resultados ya que en esta misma edad del desarrollo y en condiciones no diabéticas también observamos la presencia de glucógeno. Sin embargo, los depósitos de este carbohidrato en las células de Leydig son considerablemente menores a los que detectamos en las gónadas de fetos de ratonas diabéticas.

La forma de poder entender porque la presencia de los depósitos de glucógeno se encuentra estrechamente relacionada con los altos niveles de glucosa materna, consecuencia del tratamiento con STZ y con el paso de la glucosa a la circulación fetal. Como lo indican nuestros resultados los niveles de glucosa de los fetos de ratonas tratadas con STZ son considerablemente mayores respecto a los de los fetos de ratonas sin el tratamiento.

Se sabe que la glucosa materna puede atravesar la barrera placentaria a través de los transportadores GLUT 1 y GLUT 3 presentes en ella (62) y de esta manera ingresar a la circulación fetal donde es aprovechada por el organismo en desarrollo. Cuando la demanda de glucosa es abastecida entonces se almacena en forma de glucógeno. Como se ha mencionado la insulina estimula la acumulación de glucógeno en diversos tejidos y si bien la insulina materna no atraviesa la barrera placentaria, la insulina producida por el páncreas fetal regula este proceso (88).

En el ratón la producción de insulina por el páncreas fetal ocurre entre los 9 y 10.5 *dpc* (89) e interesantemente existen estudios que indican que la insulina es capaz de producirse antes de la formación del páncreas fetal (90).

Ahora bien en la célula de Leydig del testículo fetal, la insulina, secretada por el páncreas o quizás la producida endógenamente, estaría promoviendo por un lado la translocación de los transportadores de glucosa, específicamente el GLUT 8, la

membrana de la célula para la internalización de glucosa y por otro favoreciendo la acumulación de glucógeno, en respuesta a los elevados niveles de glucosa circulantes.

Es importante mencionar que tanto en el testículo fetal como en el adulto la presencia de los receptores a insulina han sido bien caracterizados, se han detectado tanto en células de Leydig, como en células de Sertoli y en tejidos accesorios del testículo como el epididímo, vesícula seminal y prostata (91, 92). Aunado a esto recientemente, se ha demostrado que el testículo fetal requiere de la familia de los receptores de la insulina para la diferenciación sexual de la gónada masculina (93, 94).

Por otro lado, en cuanto a los niveles de testosterona obtenidos, nuestros resultados indican que la producción de testosterona en las células de Leydig de fetos de madres diabéticas a los 16 y 18 *dpc* disminuye significativamente en comparación con la testosterona detectada en los grupos controles en las mismas etapas de desarrollo.

Estos resultados coinciden con estudios realizados en animales adultos con diabetes experimental, en los que se observa una disminución de los niveles de testosterona con alteraciones morfológicas en las células de Leydig. Así mismo, se ha observado que la diabetes experimental inducida con STZ causa una marcada reducción en los niveles de la hormona luteinizante LH, la estimulante del folículo FSH y la prolactina. También se ha visto que la actividad de enzimas esteroideogénicas de la célula de Leydig como la  $\Delta^{4-5}$   $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa se ven disminuidas (84,95). Aunado a esto, existen evidencias de que los altos niveles de glucosa afectan la expresión de ciertas enzimas del metabolismo de los esteroides o bien del colesterol usado en la biosíntesis de estas hormonas. Lo anterior nos hace pensar que probablemente las células fetales esteroideogénicas, como las células de Leydig, pudieran presentar alteraciones a nivel de las enzimas que participan en la esteroideogénesis.

Finalmente, en relación a la detección de insulina en el testículo fetal, nuestros resultados muestran que está presente en los dos tipos celulares analizados: células de Leydig y Sertoli a los 18 *dpc*. Estos resultados se apoyan con otros estudios realizados en nuestro laboratorio en los que se ha detectado en testículos de ratón de la misma edad, la expresión del RNAm del gen de la insulina por técnicas de RT-PCR. (Datos no publicados, 2008).

Hasta hace algunos años se pensaba que las células beta del páncreas eran el único órgano productor de insulina. Sin embargo, recientes estudios han demostrado la presencia de esta proteína en tejidos extrapancreáticos como lo son el timo, el cerebro, la retina y el saco vitelino (96-98). Otros trabajos han demostraron la presencia de RNAm y la expresión de proinsulina e insulina en el hígado, tejido adiposo, pulmón, médula ósea y timo utilizando diferentes modelos de ratones y ratas diabéticas incluyendo STZ (99), lo que nos hace pensar que posiblemente el testículo fetal pudiera estar también expresando esta proteína para regular múltiples acciones como son: la toma de glucosa para la esteroidogénesis, el crecimiento y la diferenciación celular.

## **X. Conclusiones**

- Los niveles altos de glucosa fetal provocan el almacenamiento de partículas de glucógeno en las células de Leydig de los fetos de ratonas diabéticas.
- No se observó ninguna alteración en la ultraestructura en los otros tipos celulares del testículo fetal.
- Los niveles de testosterona testiculares de los fetos macho de ratonas tratadas con STZ disminuyen de manera significativa.
- Las células de Leydig y Sertoli parecen expresar insulina.
- Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis planteada.

## **XI. Bibliografía**

1. Ohno S. Sex chromosomes and sex-linked genes. In: Labhart A, editor. Monographs on Endocrinology. Berlin: Springer Verlag. 1967; pp. 5.
2. Goodfellow PN, Darling SM. Genetics of sex determination in man and mouse. Development. 1988; 102: 251-258.
3. Sadler TW. Lagman's Medical Embryology. 9 th edition Lippincott 2004; pp. 354.
4. Kofman-Alfaro S, Merchant-Larios H, Pérez-Palacios G. Diferenciación sexual I. Bases biológicas del dimorfismo sexual. Rev Invest Clin. 1982; 34: 349.
5. Merchant-Larios H. Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis. In: Van Blerkom J, Motta P, editors. Ultrastructure of Reproduction. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers. 1984; pp. 19.
6. Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellows M. Genetic evidence equating *SRY* and the male sex determining gene. Nature. 1990; 348: 248-250.
7. Sinclair AH, Berta P, Palmer M, Hawkins J, Griffiths B, Smith M, Foster J, Frischauf A, Lovell-Badge R, Goodfellow P. A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature. 1990; 346: 240-244.
8. Huhtaniemi I. Fetal testis a very special endocrine organ. Eur J Endocrinol. 1994; 130 (1): 25-31.
9. Behringer RR, Finegold JM, Cate LR. Mullerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. Cell. 1994; 79 (3): 415-425.

10. Jamin SP, Arango NA, Mishina Y, Hanks MC, Behringer RR. Genetic studies of the AMH/MIS signaling pathway for Müllerian duct regression. *Mol Cell Endocrinol.* 2003; 211 (1,2): 15-19.
11. Rey R. Diferenciación sexual embrio-fetal: de las moléculas a la anatomía. *Rev Chil Anat.* 2001; 1: 75-82.
12. Nef S, Parada LF. Hormones in male sexual development. *Genes Dev.* 2000; 14: 3075-3086.
13. Tilmann C, Capel B. Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. *Recent Prog Horm Res.* 2002; 57: 1-18.
14. Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev.* 2007; 87: 1-28.
15. Parker KL. The roles of steroidogenic factor 1 in endocrine development and function. *Mol Cell Endocrinol.* 1998; 140: 59-63.
16. Pelletier J, Scahlling M, Buckler AJ, Rogers A, Habers AD, Housman D. Expression of the Wilm's tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev.* 1991; 5: 1345-1356.
17. Koopman P. *SRY* and *SOX9*: mammalian testis-determining genes. *Mol Cell Life Sci.* 1999; 55: 839-856.
18. Kanai Y, Hiramatsu R, Matoba S, Kidokoro T. From SRY to Sox 9: Mammalian testis differentiation *J Biochem.* 2005; 138: 13-19.
19. Swain A, Narvaez P, Burgoyne G, Lovell-Badge R. *Dax 1* antagonizes *Sry* action in mammalian sex determination. *Nature.* 1998; 391: 761-767.



20. Vainio S, Heikkilä M, Kisper A, Chin N, McMahon PA. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*. 1999; 397: 405-409.
21. Vaiman D, Pailhous E. Mammalian sex reversal and intersexuality: deciphering the sex-determination cascade. *Trends Genet*. 2000; 16 (11): 488-494.
22. Honda S, Morohashi K, Nomura M, Takeya H, Kitajima M, Omura T. Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. *J Biol Chem*. 1993; 268 (10): 7494-7502.
23. Lala DS, Rice DA, Parker KL. Steroidogenic factor 1, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu factor 1. *Mol Endocrinol*. 1992; 6: 1249-1258.
24. Ingraham HA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Shen WH, Nachtigal Mw, Abbud R, Nilson JH, Parker KL. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev*. 1994; 8: 2302-2312.
25. Shen WH, Moore CCD, Ikeda Y, Parker KL, Ingraham HA. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell*. 1994; 77 (5):651-661.
26. Achermann JC, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet*. 1999; 22: 125-126.
27. Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H, Lewis WH. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*. 1990; 60: 509-520.
28. Little M, Wells C. A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum Mutat*. 1997; 9: 209-225.

29. Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, Mauer SM, Manivel JC, Striegel JE, Houghton DC, Junien C, Habib R, Fouser L, Fine RN, Silverman BL, Haber DA, Housman D. Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in denys-Drash syndrome. *Cell*. 1991; 67: 437-447.
30. Hammes A, Guo JK, Lutsch G, Leheste JR, Landrock D, Ziegler U, Gubler MC, Schedl A. Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell*. 2001; 106: 319-329.
31. Laudet V, Stehelin D, Clevers H. Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucleic Acids Res*. 1993; 21 (10): 2493-2501.
32. Ferrari S, Harley VR, Pontiggia A, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME. SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J*. 1992; 11 (12): 4497-4506.
33. Hiort O, Holterhus PM. The molecular basis of male sexual differentiation. *Eur J Endocrinol*. 2000; 142: 101-11.
34. Koopman P, Munserberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*. 1990; 348: 450-452.
35. Pontiggia A, Rimini R, Harley V, Goodfellow P, Lovell-Badge R, Bianchi M. Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. *EMBO J*: 1994; 13: 6115-6124.
36. Assumpcao JG, Benedetti CE, Maciel-Guerra AT, Guerra G Jr, Baptista MT, Scolfaro MR, de Mello MP. Novel mutations affecting SRY DNA-binding activity: the HMG box N65H associated with 46,XY pure gonadal dysgenesis and the familial non-HMG box R301 associated with variable phenotypes. *J Mol Med*. 2002; 80 (12): 782-790.

37. Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*. 1994; 372: 525-530.
38. Tommerup N, Schempp W, Meinecke P. Assignment of an autosomal sex reversal locus (SRA1) and campomelic dysplasia (CMPD1) to 17q24.3-q25.1. *Nat Genet*. 199; 34: 170-174.
39. De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol Cell Biol*. 1998; 18: 6653-6665.
40. Pask A, Graves JA. Sex chromosomes and sex determining genes: insights from marsupials and monotremes. *Cell Mol Life Sc*. 1999; 55: 864-875.
41. Zazopoulos, E. et al. DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature*. 1997; 390: 311-315.
42. Baulieu EE, Kelly PA. *Hormones from molecules to disease*. Ed: Chapman and Hall, Londres, 1990.
43. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Ed: Worth Publishers, New York, 2005.
44. Stocco DM, Clark BJ. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr. Rev*. 1996; 17:221-244.
45. Gore-Langton RE, Armstrong DT. *The physiology of reproduction*. Ed: Knobil E y Neill J, Raven press Ltd, New York, 1998.
46. Hall PF. *The physiology of reproduction*. Ed: Knobil E y Neill J, Raven press Ltd, New York, 1998.

47. Haider SG. Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol.* 2004; 233:181-241.
48. Henricks DM. *Reproduction in domestic animals.* Ed: Cupss Pt, Academic Press Inc, San Diego, 1991.
49. Jones JI, Clemmons DR. Insuline-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 1995; 16:3-34.
50. de Pablo F, Scott LA, Roth J. Insulin and insuline-growth factor in early development: peptides, receptors and biological events. *Endocr Rev.* 1990; 11 (4):558-557.
51. Straus DS, Effects of insulin on cellular growth and proliferation. *Life Sci.* 1981; 29:2131-2139.
52. Villalpando I, López-Olmos. Insulin-like growth factor I (IGF-I) regulates endocrine activity of the embryonic testis in the mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003; 86:151-158.
53. Adashi EY, Fabics C, Hsueh AJW. Insulin augmentation of testosterone production in a primary culture of rat testicular cells. *Biol Reprod.* 1982; 26:270-280.
54. Owerbach D, Bell GI, Rutter WJ, Show TB. The insulin gen is located on the short arm of chromosome 11 in humans. *Diabetes* 1981; 30: 267.
55. Poitout V, Hagman D, Stein R, Artner I, Robertson RP, Harmond JS. Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *J Nutr.* 2006; 136 (4): 873-876.
56. Wentworth BM, Schaefer IM, Villa-Komaroff L, Chirwing JM. Characterization of the two nonallelic genes encoding mouse preproinsulin. *J Mol Evol.* 1986; 23:305-312.

57. Soares MB, Schon E, Henderson A, Karathanasis SK, Cate R, Zeitlin S, Chirgwing J, Efstratiadis A. RNA-mediated gene duplication: the rat preproinsulin I gene is a functional retroposon. *Mol Cell Biol*. 1985; 5(8):2090-2103.
58. Smith LF. Species variation in the amino acid sequence of insulin. *Am J Med*. 1966; 40: 662-666.
59. Porth MC. *Pathophysiology: concepts of altered health states*. Ed: Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 2007.
60. Lang J. Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur J Biochem*. 1999; 259:3-17.
61. Pickup J, Goseth W. The hormonal and neural control of endocrine pancreatic function. In *textbook of Diabetes*. Second edition. Volume 1. Blackwell Science. 1997; 9-17.
62. Oquendo PL, Herbert LA. Effect of Insulin and contraction up on glucose transport in skeletal muscle. *Prog Biophys Mol Biol*. 2004; 84:1-27.
63. Pickup J, Goseth W. The biosynthesis and secretion of insulin. In *Textbook of Diabetes*. Second edition. Volume 1. Blackwell science. 1997; 8-13.
64. Beta Cell Biology Consortium, 2004 <http://www.betacell.org/>
65. Gammeltoft S. Insulin receptors: Binding Kinetics and structure function relationship of insulin. *Physiol Rev*. 1984; 64 (4):1321-1378.
66. De Meyts P, Whittaker J. Structural biology of insulin and IGF-I receptors: implications for drug design. *Nature reviews drug discovery*. 2002; 1: 769-783.
67. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001; 414:799-806.

68. Rull JA, Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Rios-Torres JM, Gomez-Perez FJ, Olaiz G. Epidemiology of type 2 diabetes in Mexico. *Arch Med Res.* 2005; 36 (3):188-96.
69. Alba A, Verdaguer J, Vives-Pi M. Diabetes mellitus tipo 1: autoinmunidad frente a la célula beta. *Endocrinol Nutr.* 2004; 51 (3):121-125.
70. Ampuddia-Blasco F.J. Fallo celular beta y progresión dela diabetes mellitus tipo 2. *Endocrinol Nutr.* 2003; 50 (7):274-279.
71. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care.* 1997; 20: 1183-1197.
72. Hare JW, White P. Gestational diabetes and the white classification. *Diabetes care* 1980; 3: 394.
73. Vavra JJ, Deboer C, Dietz L, Hanka Lj, Sokolski WT.eds. Streptozotocin a new antibacterial drug. New York. Antibiotica Inc. 1959-1960.
74. Zhang F, Ye C, Li G, Ding W, Zhou W, Zhu H, Chen G, Luo T, Guang M, Liu Y, Zhan Di, Zheng S, Yang J, Gu Y, Xie X, Luo M. The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters. *Exp Anim.* 2003; 52: 401-407.
75. Tjalve H, Wilander E, Johansson EB. Distribution of labeled streptozotocin in mice: Uptake and retention in pancreatic islets. *J Endocr.* 1976; 69:455-456.
76. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport an cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2 expressing cells. *Diabetes.* 1994; 43 (11):1326-1333.
77. Gunnarsson R, Berne C, Hellerström C. Cytotoxic effects of streptozotocin and N-nitrosomethylurea on the pancreatic B cells with special regard to the role of nicotinamide-adenine dinucleotide. *Biochem J.* 1974; 140:487-494.

78. Jackson FL, Hutson JC. Altered responses to androgen in diabetic male rats. *Diabetes*. 1984; 33 (9):819-824.
79. Perez Díaz J, Benitez A, Fernandez Galaz C. Effect of streptozotocin diabetes on the pituitary-testicular axis in the rat. *Hormon Metab Res*. 1982; 14 (9):479-482.
80. Hassan AA, Hassouna MM, Taketo T, Gagnon C, Elhilali MM. The effect of diabetes on sexual behavior and reproductive tract function in male rats. *J Urol*. 1993; 149 (1):148-154.
81. Merchant-Larios H, Taketo T. Testicular differentiation in mammals under normal an experimental condition. *J Electron Microscop Tech*. 1991, 19(2): 158-171.
82. Salame-Méndez A, Viguera-Villaseñor RM, Herrera-Muñoz J, Mendieta-Márquez E, Salgado-Ugarte I, Castro-Campillo A, Ramírez-Pulido J. Inmunolocalización y contenido de esteroides sexuales en ovarios de hembras de *Peromyscus melanotis* Allen y Chapman, 1897 (rodentia: muridae) durante la primera mitad de la preñez. *Acta Zool, Mex. (n.s.)* 2003; 88:43-57.
83. Rouiller-Fabre V, Lecerf L, Gautier C, Saez JM, Habert R. Expression and effect of insulin-like growth factor I on rat fetal Leydig cell function and differentiation. *Endocrinol*. 1998; 139(6): 2926-2934.
84. Choffling K, Frederlin K, Ditschuneit H, Pfeiffer EF. Disorders of sexual function in male diabetics. *Diabetes*. 1963; 11(6): 519-527.
85. Deucher EM. Efects of streptozotocin on early rat embryos grown in culture. *Experientia*. 1978; 34 (1):84-85.
86. Matoba S, Kanai Y, Kidokoro T, Kanai-Azuma M, Kawakami H, Hayashi Y, Kurohmaru M novel Sry-downstream cellular event which preserves the readily available energy source of glycogen in mouse sex differentiation. *J Cell Sci*. 2005; 118:1449-1459.

87. Russo J, De Rosas JC. Differentiation of Leydig cell of the mouse testis during the fetal period. An ultrastructural study. 1971; 130:461-480.
88. Widness JA, Goldman AS, Susa JB, Oh W, Schwartz R. Impermeability of the rat placenta to insulin during organogenesis. *Teratology*. 1983; 28 (3):327-332.
89. Deltour L, Leduque P, Blume N, Madsen O, Dubois P, Jami J, Bucchini D. *Proc Natl Sci*. 1993; 90:527-531.
90. Spavaventi R, Antica M, Pavelic K. Insulin and Insulin-Like growth factor I (IGF I) in early mouse embryogenesis. *Development*. 1990; 108:491-495.
91. Oonk RB, Grootegoed JA. Identification of insulin receptors on rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1987; 49:51-62
92. Lin T, Haskell J, Vinson N, Terracio L. Characterization of insulin and insulin-like growth factor I receptors of purified Leydig cells and their role in steroidogenesis in primary culture: a comparative study. *Endocrinol*. 1986; 119:1641-1647.
93. Saucier J, Dube J, Tremblay R. Specific insulin binding sites in rat testis: characterization and variation. *Endocrinol*, 1981; 109:2220-2225.
94. Nef S, Verma-Kurvari S, Merenmies J., Vassalli JD, Efstratiadis A, Accili D, Parada LF. Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature* 2003; 426:291-295.
95. Anderson E J, Thilveris J A. Morphometry and cytochemistry of Leydig cells in experimental diabetes. 1987;
96. Kojima H, Fujimiya M, Terashima T, Kimura H, Chan L. Extrapancratic Proinsulin/Insulin-expressing Cells in diabetes Mellitus is History Repeating itself? *Endocrine Journal*. 2006; 53 (6):715-722.



97. Díaz B, Serna J, De Pablo F, de la Rosa EJ. In vivo regulation of cell death by embryonic (pro)insulin and the insulin receptor during early retinal neurogenesis. *Development*. 2000;127:1641-1649.
98. Muglia L, Locker J. Extrapancreatic insulin gene expression in the fetal rat. *Proc Natl Acad Sci*. 1984; 81:3635-3639.
99. Kojima H, Fujimiya M, Matsumara K, Nakahara T, Hara M, Chan L. Extrapancreatic Insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. *PNAS* 2004; 101 (8):2498-2463.