

Estudio de la expresión del gen de la insulina y su receptor en ovocitos y embriones humanos

Study of insulin gene expression and its receptor in human oocytes and embryos

Sánchez-Aparicio P, Martínez M, Cuadros J, Ricciarelli E y Hernández ER

Clínica de Medicina de la Reproducción y Ginecología, FivMadrid, Madrid, Spain

Resumen

La insulina es una hormona polipeptídica que desempeña un papel clave en el metabolismo a lo largo de la vida adulta. Sin embargo, estudios desarrollados en animales experimentales demuestran que la insulina está además implicada en otros procesos biológicos como la diferenciación y la supervivencia durante la vida embrionaria; así como el crecimiento durante la vida fetal. El conocimiento sobre el papel de la insulina en procesos biológicos equivalentes en humanos es muy limitado dado que la mayor parte de estos estudios se han desarrollado en modelos animales. Con objeto de estudiar el posible papel de la insulina en desarrollo embrionario humano, llevamos a cabo el análisis de la expresión del gen de la insulina y su receptor en embriones humanos. Asimismo, evaluamos la expresión del gen de la insulina y su receptor en ovocitos humanos no fecundados, puesto que la implicación de la insulina en maduración ovocitaria ha sido previamente demostrada en otras especies animales. Para ello seleccionamos ovocitos y embriones humano no viables; y analizamos por técnicas de RT-PCR la expresión del gen de la insulina y su receptor en estas muestras biológicas. Nuestros resultados muestran, por primera vez, expresión del gen de insulina y su receptor en ovocitos y embriones humanos. Estos datos sugieren que la insulina podría desempeñar un papel relevante en maduración ovocitaria y desarrollo temprano en humanos, al igual que sucede en otras especies animales. La posibilidad de que la expresión del gen de la insulina y su receptor, en ovocitos y embriones sea productiva de la no viabilidad de estas muestras se discute también en este artículo.

Palabras clave: Embriones Humanos. Ovocitos, Insulina. Receptor Insulina.

Correspondencia: Paloma Sánchez-Aparicio
Paseo de los Olmos, 13- Escalera B, 6º D
28005 Madrid
E-mail: aparicio@fivmadrid.es

Financiación: Este trabajo ha sido financiado en su totalidad de forma privada por la gerencia de la Clínica de Medicina de la Reproducción y Ginecología, FivMadrid

Summary

Insulin is a polypeptidic hormone playing a pivotal role in metabolic function along adult life. However, studies carried out with experimental animals have shown that insulin is also involved in other biological process such us cell differentiation and survival along embryonic development; as well as growth along fetal life. The role played by insulin in these biological process in humans is uncertain as the majority of these studies have been carried out in animal models. In order to study the possible role of insulin in human embryonic development, we studied the gene expression of insulin and its receptor in human embryos. In addition, we also studied the expression of the insulin gene and its receptor in non-fertilized oocytes from human patients since the implication of insulin in oocyte maturation has been previously demonstrated in other species. For this purpose we selected non viable human oocytes and embryos; and we analyzed, by RT-PCR techniques, the expression of the insulin and insulin receptor in these samples. Our results show, for the first time, the gene expression for insulin and its receptor in human oocytes and embryos. These data suggest that insulin could be involved in oocyte maturation and early development in humans, as well as it happens in other animal species. The possibility that the gene expression of insulin and its receptor, in oocytes and embryos could be due to the non-viability of these samples is also discussed in this paper.

Key words: Human embryos. Oocytes. Insulin. Insulin Receptor.

INTRODUCCIÓN

La insulina es una hormona polipeptídica de 51 aa, responsable de mantener la homeostasis de la glucosa en el organismo. Fue descubierta en los años veinte (Banting y Macleod, Premio Nóbel de Fisiología y Medicina 1923); aunque su estructura primaria no llegó a determinarse hasta los años cincuenta (Sanger, Premio Nobel de Química 1958) (1), así como su estructura secundaria y terciaria hasta los años noventa (2, 3).

La molécula de insulina está codificada por un único gen, situado en el cromosoma 11 (11p15.5), que consta de tres exones y dos intrones (4-6). Esta molécula está altamente conservada entre especies; y se sintetiza exclusivamente en las células β de los islotes de Langerhans del páncreas. La expresión tisular tan restringida de esta molécula es posible gracias a una estricta regulación transcripcional, constituyendo éste un modelo ejemplar de expresión génica tejido-específica.

La insulina se sintetiza en forma de precursor inactivo que posteriormente es procesado en el interior de las células del páncreas originando así la forma madura de la insulina. Ante determinados estímulos, se produce la activación transcripcional del gen de insulina, originándose una serie de transcritos que dan lugar a la molécula de preproinsulina (7). Esta molécula, a su vez, se pliega para dar lugar a la molécula de proinsulina (8). Finalmente, la proinsulina es procesada por las endopeptidasas proteinconvertasas PC2 y PC3 dando lugar a la insulina en su forma ma-

dura por la liberación del péptido C. Esta molécula final está exclusivamente constituida por dos cadenas - A y B- unidas por dos puentes disulfuro. Por último, estas moléculas se acumulan en el interior de las células en forma de gránulos secretores; y ante un requerimiento de insulina por parte del organismo, las moléculas acumuladas intracelularmente se liberan por degranulación. La síntesis de novo de insulina es dependiente de los niveles de glucosa, de forma que cuando estos niveles son altos se activa la transcripción del gen (9, 10); y el procesamiento de la molécula de insulina (11-13). La hormona acaba liberándose desde las células β del páncreas y ejerce su acción biológica en todo el organismo.

Las hormonas polipeptídicas, como es el caso de la insulina, interaccionan con un alto grado de afinidad y especificidad con sus receptores de membrana. El receptor de la insulina es una glicoproteína constituida por dos subunidades α y dos subunidades β (14-16). Las subunidades α están situadas en la cara externa de la membrana plasmática y contienen los sitios específicos de unión para la insulina. Por el contrario, las subunidades β son cadenas transmembranas y contienen los dominios en los que reside la actividad tirosina-kinasa del receptor. La interacción receptor-ligando produce una serie de cambios en el receptor que conllevan el cambio conformacional y la fosforilación de dicho receptor (17, 18). Estos eventos conducen a la activación de la actividad tirosina-Kinasa del propio receptor que, a su vez, fosforila residuos de tirosina en una serie de proteínas citoplasmáticas que incluyen la familia de sustratos del receptor de insulina -IRS- (19). La fosforilación

de estas proteínas citoplasmáticas activa la cascada de señalización intracelular, que tiene un efecto metabólico a corto plazo: aumento de la captación de glucosa por movilización de transportadores de glucosa a la membrana. Además, existen efectos a largo plazo que incluyen entre otros, la regulación de las moléculas moduladoras del ciclo celular.

Estudios desarrollados en animales experimentales demuestran el papel esencial de la insulina en el desarrollo embrionario de dichas especies (20- 23); embriones prepancreáticos de pollo expresan el gen de la insulina mientras que la sobre-expresión de insulina supone un fallo en el proceso de morfogénesis. Asimismo, la insulina parece estar implicada en maduración ovocitaria a partir de los ovocitos que durante largo tiempo están detenidos en profase I de la primera división meiótica.

A partir de todos estos datos obtenidos con modelos animales se ha propuesto un modelo de función para la insulina y la proinsulina que se recoge en la figura 1. La insulina, durante la vida adulta e inmediatamente después del nacimiento, desempeña un papel esencial en metabolismo; su papel es clave en

el metabolismo de los hidratos de carbono y participa en el metabolismo de los lípidos. Sin embargo, durante el desarrollo embrionario, la insulina desempeña un papel fundamental en crecimiento aunque su implicación en metabolismo es creciente (24). Más aún, en estadios tempranos del desarrollo embrionario no es la insulina sino la proinsulina la que ejerce su acción biológica en proliferación y diferenciación (25). La proinsulina está además implicada en supervivencia a lo largo del desarrollo aunque su contribución es decreciente.

Teniendo en cuenta que todos estos datos se han obtenido a partir de animales experimentales, el desconocimiento sobre la función de la insulina en humanos es muy amplio, en particular su implicación en maduración ovocitaria y desarrollo embrionario. En este contexto y con estos antecedentes nos planteamos como objetivo prioritario el estudio del posible papel de la insulina en maduración ovocitaria y desarrollo embrionario humano. Como primera aproximación llevamos a cabo el análisis de la expresión del gen de insulina y de su receptor en ovocitos y embriones humanos cultivados in vitro.

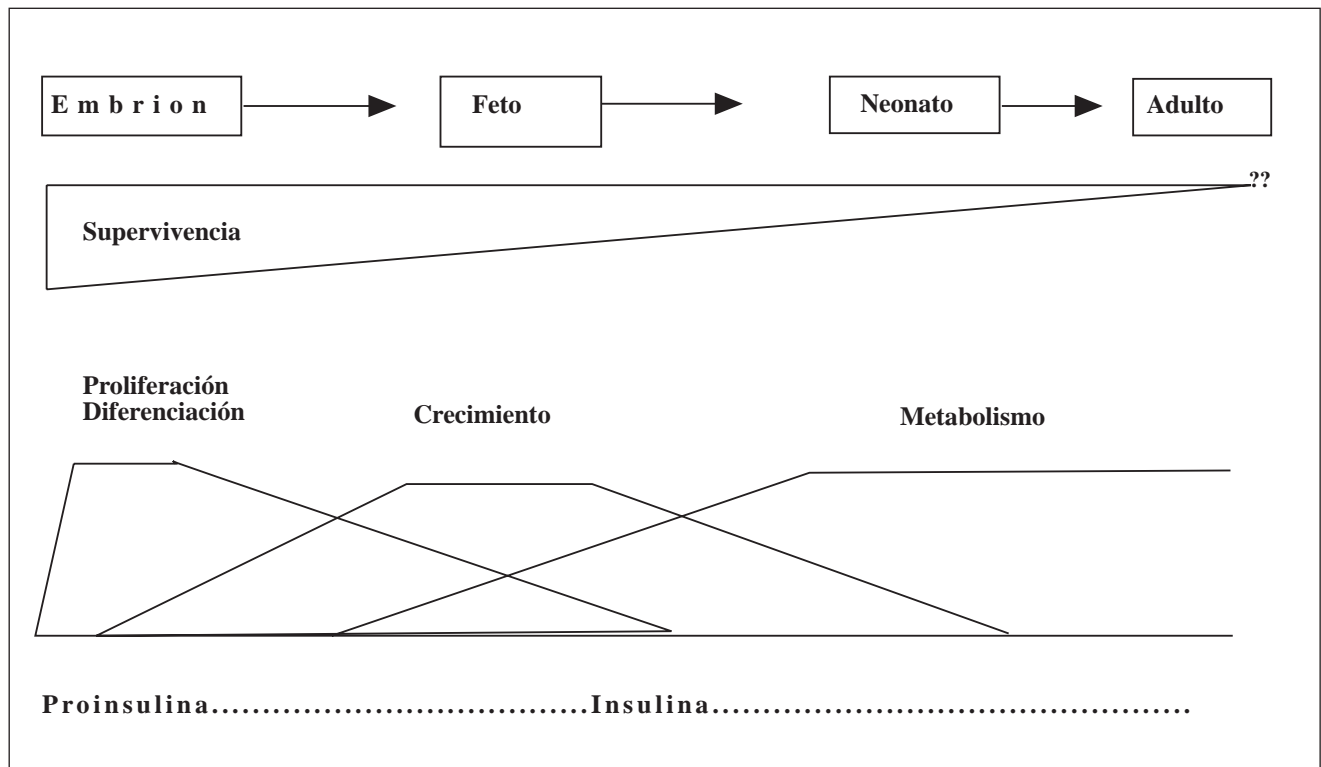


Figura 1

Modelo propuesto a partir de animales experimentales sobre las implicaciones de la insulina y la proinsulina. Adaptación Hernández-Sánchez C. et al.2006

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras biológicas.

Se seleccionaron ovocitos y embriones humanos cultivados in vitro a partir de pacientes sometidas a punción folicular. En todos los casos se trataba de embriones no viables y, por tanto, desechados para su posterior utilización por su mala calidad embrionaria.

Recogida de muestras.

Los embriones y ovocitos se lavaron cuidadosamente con PBS para evitar el medio de cultivo de dichas muestras. Las células de la granulosa se eliminaron con hialuronidasa para descartar posibles contaminaciones de material genético de otro linaje celular. Las muestras se mantuvieron en buffer de conservación (guanidino y β -mercaptoetanol) y se congelaron a -20°C hasta su utilización. Todas las muestras se almacenaron en condiciones óptimas de conservación para su análisis posterior por técnicas de RT-PCR.

Técnicas de RT-PCR.

La extracción de ARN se llevó a cabo, a partir de las muestras congeladas, utilizando un kit comercial estándar de extracción y purificación. A continuación, se obtuvo el ADNc a partir del ARN por retrotranscripción (RT); y se procedió a una primera ronda de amplificación de 35 ciclos y una segunda PCR semi-anidada de 35 ciclos para aumentar la sensibilidad de la técnica. Utilizamos oligonucleótidos específicos para detectar el gen de la insulina y su receptor, así como primers específicos para valorar la expresión del gen de la β -actina que se utilizó como control positivo (ver Tabla 2).

RESULTADOS

Ovocitos y embriones humanos incluidos en el estudio

Los ovocitos y embriones humanos no viables se seleccionaron a partir de pacientes sometidas a un procedimiento de fecundación in vitro en el contexto de un tratamiento de reproducción asistida. Se emplearon, por tanto, embriones humanos descartados para ser transferidos a pacientes sometidas a un ciclo de reproducción. En todos los casos se trata de embriones cultivados in vitro que se seleccionaron en

día D+2, D+3, D+4, D+5 o D+6 post-fecundación; no viables en ningún caso; y con alguna de las características mencionadas a continuación: 1PN, 3PN, multinucleados, 40% fragmentación o más, y blastocistos de mala calidad. El número total de muestras analizadas en este estudio es de 49; incluyendo desde ovocitos hasta blastocistos pasando por embriones en distintos estadios evolutivos de su cultivo in vitro. Estos últimos se agruparon en dos categorías: embriones antes de compactación (Pre-Compactación) y embriones ya compactados en estadio de mórula (ver Tabla 1).

Análisis por RT-PCR de la expresión del gen de insulina y su receptor

Las muestras seleccionadas y almacenadas a -20°C , se procesaron para la obtención de ARN. Una vez extraído el ARN, se obtuvo el ADNc completo por retrotranscripción (RT). A continuación, se llevó a cabo la amplificación empleando dos rondas de PCR, una primera de 35 ciclos y una segunda semi-anidada también de 35 ciclos, con objeto de aumentar la sensibilidad de la técnica. La tabla II muestra los oligonucleótidos específicos utilizados en cada caso para los experimentos de PCR.

Una vez finalizada la segunda PCR, el producto de amplificación obtenido de cada una de las muestras analizadas se sometió a electroforesis en gel de agarosa. La figura 2 corresponde a la fotografía de un gel, visualizado al transiluminador, con las muestras cargadas en cada pocillo: el primero y el último carril corresponden al producto de amplificación obtenido a

Tabla1

Ovocitos y embriones humanos no viables incluidos en el estudio. Los embriones analizados se agruparon en tres categorías: embriones antes de haber sufrido el proceso de compactación (embriones Pre-compactación), embriones ya compactados en estadio de mórula y embriones que ya han alcanzado el estadio de blastocisto. El número de muestras analizadas de cada una de las categorías se muestra en la tabla.

Estadio	Número de muestras
Ovocitos	4
Embriones Pre-Compactación	15
Embriones en estado de mórula	11
Blastocistos	19

Tabla 2

Oligonucleotidos empleados en los experimentos de RT-PCR para cada uno de los genes analizados en el estudio. Las parejas de primers utilizados en el estudio para cada gen así como las secuencias específicas de cada uno de ellos se incluyen en esta tabla

Oligonucleotidos	Secuencia	Gen
R1	ACTCAGGATTCTCACGACTCT	Receptor Insulina Humana (RIH)
R2	TTCGCTTTCCTCTGGTTTG	Receptor Insulina Humana (RIH)
R3	GGTGCTTTCCTTCCATCTGC	Receptor Insulina Humana (RIH)
hinsfo	AGCCTTTGTGAACCAACACC	Insulina Humana (IHleft)
hinsre	GCTGGTAGAGGGAGCAGATG	Insulina Humana (IHright)
minsfl	GGCTTCTTCTACACACCCA	Insulina Humana (IHleft)
A1	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	Actina Humana (AHleft)
A2	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	Actina Humana (AHright)
β -actin NestedR	TGAAGGTAGTTTCGTGGATGC	Actina Humana (AHright)

partir de sendos embriones en estado de mórula; el segundo, tercero, quinto, sexto y séptimo carril corresponden al producto de amplificación obtenido a partir de embriones en estadio de blastocisto; el cuarto carril corresponde al producto de amplificación obtenido a partir de un embrión en estadio de dos células. Como se puede apreciar en la imagen, tanto el embrión en estadio de dos células (incluido en la categoría embriones Pre-Compactación) así como los embriones en estado de mórula presentan expresión de los transcritos de proinsulina. Sin embargo, en ninguno de los blastocistos analizados se detectaron dichos transcritos. La detección de expresión del gen de la β -actina, empleado como control positivo, demuestra la especificidad de los resultados obtenidos; esto es, la detección de transcritos de nuestro gen control garantiza que la extracción de ARN, la retro-transcripción (RT), y la amplificación (PCR) en dicho procedimiento han funcionado correctamente y confirma la ausencia específica de los transcritos de nuestro gen de estudio que es la insulina (ver fig. 1).

La tabla 3 recoge los resultados, expresados en porcentaje, del total de los casos analizados; en el 33,33% de los ovocitos estudiados se detectaron transcritos del gen de la insulina, así como en el 15,38% y el 25% de los embriones pre-compactación y en estadio de mórula respectivamente. Sin embargo, en ninguno de los blastocistos analizados (19 casos) detectamos transcritos de proinsulina.

Una vez analizada la expresión del gen de la insulina llevamos a cabo el análisis de la expresión del gen del receptor de la insulina. La tabla III recoge los

resultados obtenidos para el análisis de la expresión del gen del receptor de la insulina; se detectó expresión de este gen en ovocitos (66,66%), embriones pre-compactación (53,84%) y en embriones en estado de mórula (80%). Contrariamente a lo sucedido con la expresión del gen de la insulina, en todos los blastocistos analizados (19 casos) se detectó expresión del receptor de insulina. Por tanto, estos resultados indican que el gen del receptor de insulina, a diferencia de la insulina, se expresa en todos los estadios madurativos embrionarios analizados.

En resumen, nuestros resultados muestran expresión del gen de la insulina y su receptor en ovocitos y embriones humanos (ver figura 3). Sin embargo, la expresión del gen de la insulina –a diferencia de su receptor– no se detecta en estadios madurativos embrionarios más avanzados como el caso de los blastocisto.

DISCUSIÓN

Los resultados aquí mostrados muestran por primera vez la expresión del gen de la insulina y su receptor en ovocitos y embriones humanos. Sin embargo, mientras que la expresión del gen del receptor de la insulina se detecta en todos los estadios madurativos de embriones humanos cultivados in vitro, incluyendo el estadio de blastocisto, los transcritos de insulina se detectaron exclusivamente en algunos estadios, coincidiendo con las fases más tempranas del desarrollo embrionario. Nuestros resultados indican claramente la ausencia de expresión del gen de la

Tabla 3

Expresión del gen de insulina y su receptor en ovocitos y embriones. La tabla muestra el porcentaje de ovocitos y embriones estudiados en los que se detectan transcritos de proinsulina y/o transcritos del receptor de la insulina. En ninguno de los blastocistos analizados existe expresión del gen de insulina

Estadio	Transcritos Proinsulina	Transcritos Receptor Insulina
Ovocitos	33,33%	66,66%
Embriones Pre-Compactación	15,38%	53,84%
Embriones en estado de mórula	25%	80%
Blastocistos	0%	100%

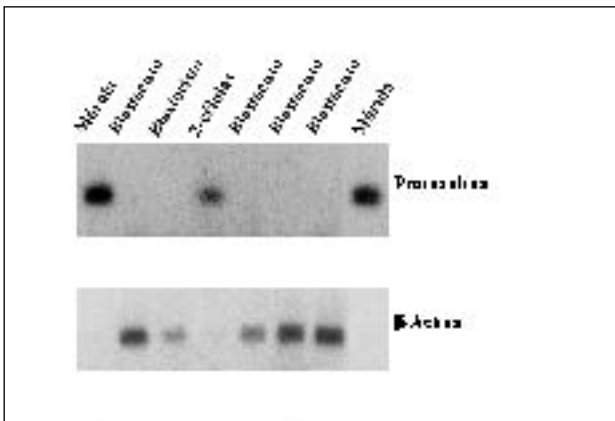


Figura 2

Análisis de la expresión del gen de insulina en embriones humanos por técnicas de RT-PCR. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amolificación de las muestras analizadas por RT-PCR

insulina en el estadio de blastocisto humano aunque no así de su receptor.

Teniendo en cuenta que los ovocitos y los embriones en sus primeros estadios de desarrollo presentan transcritos del gen de insulina; pero no así en un estadio más avanzado, el de blastocisto, cabría pensar que la expresión del gen de la insulina se pierde cuando el embrión avanza en su proceso de desarrollo. Sin embargo, no hay que olvidar que los ovocitos utilizan transcritos de origen materno hasta que llega el momento de la activación del genoma zigótico (ZGA); pasando el cigoto a utilizar el ARNm recién sintetizado tras la activación transcripcional de determinados genes del propio genoma zigótico. En embriones humanos, la ZGA tiene lugar entre el estadio de cuatro (D+2) y ocho células (D+3) encuadrado en el periodo pre-compactación del desarrollo embrionario; inicialmente se activan los genes reguladores que al transcribirse controlan, a su vez, a los genes ejecutores.



Figura 3

Expresión del gen de insulina y su receptor en embriones humanos cultivados in vitro. De izquierda a derecha: ovocito fecundado en dos pronúcleos, embrión de dos células, embrión de cuatro células, embrión de ocho células y embrión en estado de blastocisto

Por tanto, antes de que tenga lugar la ZGA los únicos transcritos que existen en el embrión son de origen materno. Esto significa, que en este estudio, los transcritos de insulina detectados en ovocitos y embriones pre-compactación, e incluso en estado de mórula, podrían ser de origen materno. De acuerdo con esto, en estados más avanzados como es el caso de los blastocistos en la que los transcritos de origen materno han desaparecido puesto que han terminado por consumirse no se detectarían, como es el caso. Por el contrario, en estos mismos blastocistos fuimos capaces de detectar transcritos del receptor de insulina. Obviamente, la presencia de estos transcritos indican la existencia de transcripción activa del gen del receptor de la insulina en este estadio, lo que hace pensar en éste gen como en uno de los genes ejecutores que se activan inmediatamente después de la ZGA. Estos datos resultan de especial relevancia para nuestro grupo de trabajo que en la actualidad está especialmente interesado en el estudio de los genes reguladores y ejecutores que se activan inmediatamente después de la ZGA en embriones humanos.

El receptor de la insulina forma parte de una familia de receptores de membrana que incluye, además, el receptor del factor de crecimiento tipo insulina IGF-I y un receptor híbrido (26). Todos los miembros de esta familia son capaces de interactuar con la molécula de insulina. A su vez, el propio receptor de insulina es capaz de interactuar no sólo con la molécula de insulina sino también con la molécula de proinsulina, así como con otros ligandos como IGF1 e IGF2. La interacción de cada uno de estos receptores con sus distintos ligandos tiene lugar con una afinidad diferencial que a su vez desencadena una cascada de señalización distinta en cada caso que, finalmente, converge en la activación de ras y las MAPKinasas (27). Teniendo en cuenta que nuestros resultados muestran expresión de transcritos del receptor de insulina en blastocistos, sin que exista expresión del gen de insulina, podría ser que dicho receptor estuviera utilizando algún otro de los ligandos descritos como por ejemplo IGF1 o IGF2 o incluso insulina de origen extraembrionario. Por otra parte, no hay que olvidar que la existencia de transcritos de un gen no garantiza la expresión a nivel de proteína de la molécula que codifica dicho gen. Podría darse la circunstancia que aún habiendo transcritos del receptor de insulina éste no se esté expresando a nivel de proteína, o incluso habiendo expresión a nivel de proteína éste no esté funcionando como un receptor funcional. Asimismo, la ausencia de transcritos del gen de insulina en estadios avanzados del desarrollo embrionario podría deberse a la mala calidad de los embriones

analizados, pues en todos los casos se trataba de embriones descartados para ser transferidos a pacientes por su deficiente calidad.

En conclusión, nuestros resultados muestran por primera vez expresión del gen de insulina y su receptor en ovocitos y embriones humanos en estadios tempranos de su desarrollo, indicando que la insulina podría desempeñar un papel en humanos similar al descrito en animales experimentales. Así pues, la insulina podría desempeñar un papel esencial en maduración ovocitaria humana a través del control del ciclo celular o incluso desarrollar un papel clave en las etapas más tempranas del desarrollo embrionario. Resultaría de máximo interés ampliar el tamaño de la muestra de análisis e incluir en este estudio embriones humanos viables de buena calidad donados para la ciencia al amparo de la nueva Ley de Reproducción Asistida (14/2006), para confirmar así la especificidad de los resultados obtenidos en este estudio.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos muy sinceramente la colaboración técnica de Catalina Hernández-Sánchez (Centro de Investigaciones Biológicas, CIB, CSIC, Madrid). Asimismo, agradecemos a la Prof. Flora de Pablo (Centro de Investigaciones Biológicas, CIB, CSIC, Madrid) su inestimable apoyo y colaboración sin las cuales este trabajo no hubiera sido posible. Este trabajo ha sido financiado en su totalidad de forma privada por la gerencia de la Clínica de Medicina de la Reproducción y Ginecología, FivMadrid.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Sanger F.:** Chemistry of insulin: determination of the structure of insulin opens the way to greater understanding of life processes. *Science*, 1959; 129: 1340-1344.
2. **Jorgensen AM, Kristensen SM, Led JJ, Balschmidt P.:** Three-dimensional solution structure of an insulin dimer. A study of the B9(Asp) mutant of human insulin using nuclear magnetic resonance, distance geometry and restrained molecular dynamics. *J Mol Biol*, 1992; 227 (4): 1146-63.
3. **Jorgensen AM, Olsen HB, Balschmidt P, Led JJ.:** Solution structure of the superactive monomeric des-(Phe(B25)) human insulin mutant: elucidation of the structural basis for the monomerization of des-(Phe(B25)) insulin and the dimerization of native insulin. *J Mol Biol* 1996; 257 (3): 684-99.

4. **Bell GI, Pictet RL, Rutter WJ, Cordell B, Tischer E, Goodman HM.:** Sequence of the human insulin gene. *Nature*, 1980; 284: 26-32.
5. **Owerbach D, Bell GI, Rutter WJ, Shows TB.:** The insulin gene is located on chromosome 11 in human. *Nature*, 1980; 286: 82-84.
6. **Harper ME, Ullrich A, Saunders GF.:** Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. *Proc Natl Acad Sci*, 1981; 78(7): 4458-60.
7. **Sures I, Goeddel DV, Gray A, Ullrich A.:** Nucleotide sequences of human preproinsulin complementation DNA. *Science*, 1980; 208: 57-59.
8. **Steiner DF, Oyer PE.:** The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proc Natl Acad Sci*, 1967; 57: 473-480.
9. **Itoh N, Okamoto H.:** Translational control of proinsulin synthesis by glucose. *Nature*, 1980; 283: 100-102.
10. **Leiberr B, Molde T, Schwarz T, et al.:** Short-term regulation of insulin gene transcription by glucose. *Proc Natl Acad Sci*, 1998; 95: 9307-9312.
11. **Permutt MA.:** Effect of glucose on initiation and elongation rates in isolated rat pancreatic islets *J Biol Chem*, 1974; 249(9): 2738-42.
12. **Brunstedt J, Chan SJ.:** Direct effect of glucose on the preproinsulin mRNA level in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982; 106: 1383-1389.
13. **Welsh M, Scherberg N, Gilmore R, Steiner DF.:** Translational control of insulin biosynthesis. Evidence for regulation of elongation, initiation and signal-recognition-particle-mediated translational arrest by glucose. *Biochem J*, 1986; 235: 459-467.
14. **Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K et al.:** The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell*, 1985; 40: 747-758.
15. **Chan SJ, Cao QP, Steiner DF.:** Evolution of the insulin superfamily: cloning of a hybrid insulin/insulin-like growth factor cDNA from amphioxus. *Proc Natl Acad Sci*, 1990; 87: 9319-9223.
16. **de Meyts.:** Insulin and its receptor: structure, function, and evolution. *Bioessays*, 2004; 26: 1351-1362.
17. **Saltiel AR, Pessin JE.:** Insulin signalling in microdomains of the plasma membrane. *Traffic*, 2003; 4: 711-16.
18. **Watson RT, Kanzaki M, Pessin JE.:** Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter in adipocytes. *Endocr Rev*, 2004; 25: 177-204.
19. **Chang L, Chiang S-H and Saltiel R.:** Insulin signalling and the regulation of glucose transport. *Mol Medic*, 2004; (10) 7-12: 65-70.
20. **Serrano J, Bevins CL, Young SW, de Pablo F.:** Insulin gene expression in chicken ontogeny: pancreatic, extrapancreatic, and prepancreatic. *Dev Biol*, 1989; 132(2): 410-8.
21. **de Pablo F, Roth J.:** Endocrinization of the early embryo: an emerging role for hormones and hormone-like factors. *Trends Biochem Sci*, 1990; 15: 339-342.
22. **Pérez-Villamil B, de la Rosa EJ, Morales AV, de Pablo F.:** Developmentally regulated expression of the preproinsulina gene in the chicken embryo during gastrulation and neurulation. *Endocrinology*, 1994; 135: 2342-2350.
23. **de la Rosa EJ, Bondy CA, Hernández-Sánchez C, et al.:** Insulin and insulin-like growth factor system components gene expression in the chicken retina from early neurogenesis until late development and their effect in neuroepithelial cells. *Eur J Neurosci*, 1994; 6: 1801-1810.
24. **Hernández-Sánchez C, Bartulos O, De Pablo F.:** Proinsulin: much more than a hormone precursor in development. *Rev Endrocr Metab Disord*, 2005; 6: 211-216.
25. **Hernández-Sánchez C, Mansilla A, de la Rosa EJ, De Pablo F.:** Proinsulin in development: new roles for an ancient prohormone. *Diabetologia*, 2006; 125: 0232-5.
26. **Dupont J, LeRoith D.:** Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction. *Horm Res*, 2001; 55(2): 22-6.
27. **Kim JJ, Accili D.:** Signalling through IGF-1 and insulin receptor: where is the specificity? *Growth Horm IGF Res*, 2002; 12: 84-90.