

00551



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

Efecto del Acido Retinoico Sobre la Actividad y  
Expresión del Gen de la Glucocinasa Pancreática  
y Hepática.

T E S I S

para obtener el grado de

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
(BIOQUIMICA)

presenta

Biol. Ma. Gabriela Cabrera Valladares



México, D. F.

2000



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.

*"Nosotros somos los descendientes de esos hombres. Es de ellos sin duda, que hemos heredado la existencia de la explicación, la angustia que nos impulsa a buscar el sentido de la existencia. Angustia creadora de todos los mitos, de todas las religiones, de todas las filosofías y de la ciencia misma. No dudo por mi parte que esta imperiosa necesidad sea innata, que esté inscrita en alguna parte del lenguaje del código genético y que se desarrolle espontáneamente."*

*Jacques Monod, "Le hasard et la nécessité". 1970*

*Este trabajo se realizó en la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas, U. N. A. M. Con el apoyo de la Dirección General de Personal Académico (D.G.A.P.A.).*

*Con todo mi amor:*

*A Dios.*

*A Mauricio y a Danya*

*A mis Papás: Lupita y Arturo*

*A mis hermanos: Arturo, Esteban,  
Alicia, Leticia y José*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mis profesores y sinodales en este trabajo: Dra. Cristina Fernández, Dr. Enrique Piña, Dr. Marco Cerbón, Dr. Alejandro Zentella, Dr. Vicente Díaz, Dr. Ignacio Camacho y Dr. Armando Pérez.*

*A mis amigos y compañeros de laboratorio: Memo, Sumiko, Alberto, Zazil y Naika.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México*

# INDICE

pag.

RESUMEN .....	4
ABSTRACT.....	5
INTRODUCCION.....	6
ANTECEDENTES	
GLUCOCINASA .....	8
CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DEL GEN DE LA GLUCOCINASA .....	11
GLUCOCINASA PANCREATICA .....	12
MECANISMOS DE SECRECION DE INSULINA .....	13
DIVERSOS FACTORES QUE REGULAN LA GLUCOCINASA PANCREATICA.....	15
GLUCOCINASA HEPATICA .....	17
DIVERSOS FACTORES QUE REGULAN LA GLUCOCINASA HEPATICA .....	17
GLUCOCINASA Y DIABETES .....	20
VITAMINA "A" .....	21
TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE VITAMINA "A" .....	23
MECANISMO DE ACCION MOLECULAR DEL ACIDO RETINOICO .....	25
PAPEL DE LOS RETINOIDES EN EL DESARROLLO ONTOGENICO .....	28
HIPOTESIS.....	29
OBJETIVOS.....	30

<b>MATERIALES Y METODOS</b>	
AISLAMIENTO DE ISLOTES DE RATA ADULTA.....	31
AISLAMIENTO DE ISLOTES FETALES .....	31
AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS DE RATA ADULTA .....	32
AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS DE RATA DE 15 A 18 DIAS DE NACIDAS .....	33
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE GLUCOCINASA .....	33
EXTRACCION DE RNA .....	35
ANALISIS DE RNA .....	35
CONSTRUCCION DE PLASMIDO Y TRANSFECCION DE ISLOTES FETALES .....	38
ENSAYO DE CAT (Cloranfenicol acetil transferasa) .....	38
TRANSFECCION DE CELULAS COS-1 .....	38
AISLAMIENTO DE PROTEINAS NUCLEARES .....	39
ENSAYOS DE GELES DE RETARDO .....	40
SECRECION DE INSULINA .....	41
ANALISIS DE LA SECRECION DE INSULINA .....	41
ESTADISTICA .....	42
<b>RESULTADOS</b>	
PANCREAS .....	43
HIGADO .....	54
RESUMEN DE RESULTADOS .....	61
DISCUSION .....	62
REFERENCIAS .....	67

## Resumen

La glucocinasa forma parte del grupo de las hexocinasas, también es conocida como hexocinasa tipo IV. Es una enzima tejido-específica presente en los hepatocitos, y en las células beta pancreáticas. Esta enzima juega un papel clave en la homeostasis de la glucosa, regulando la secreción de la insulina en respuesta a la glucosa en las células beta del páncreas y regulando la entrada de la glucosa en el hígado. En el ser humano, las mutaciones en el gen de la glucocinasa causan la diabetes tipo MODY 2.

Existe diferente regulación de la actividad y de la expresión del gen de la glucocinasa en el hígado y en el páncreas. Esta diferencia puede deberse a las diversas funciones de estos dos órganos en la homeostasis de la glucosa. Se ha demostrado la existencia de dos distintos promotores en un solo gen. La existencia de dos promotores puede explicar la regulación por distintos factores de la glucocinasa en el hígado y la célula beta pancreática. En el hígado, la glucocinasa se regula en respuesta al ayuno y a la realimentación, siendo la insulina y el AMPc los mediadores de esta respuesta. En contraste, en la célula beta pancreática, son los niveles de la glucosa los que inducen la actividad de la glucocinasa. Los glucocorticoides y las hormonas tiroideas han demostrado afectar la expresión de la enzima hepática y pancreática. El desarrollo de la enzima entre el páncreas y el hígado también es diferente. En el páncreas la enzima está presente desde la vida fetal y la glucocinasa en el hígado aparece dos semanas después del nacimiento, y su expresión depende de un estatus hormonal y alimenticio. Se ha mostrado que el ácido retinoico aumentó los niveles de RNA mensajero de la glucocinasa en las células de insulinoma RIN-m5F; sin embargo, no puede eliminarse la posibilidad de que el efecto del ácido retinoico en la glucocinasa de las células RIN-m5F fuera inherente a la línea celular o estuviera relacionado con su capacidad de diferenciación. En este trabajo se demostró que, a concentraciones fisiológicas el ácido retinoico es capaz de estimular la actividad de la glucocinasa tanto en islotes fetales e islotes de rata adulta como en hepatocitos de rata neonato y de adulto. Por medio de la técnica del DNA ramificado (bDNA), una técnica sensible de amplificación de señal, se demostró que éste efecto es mediado por un aumento en niveles del RNAm de la glucocinasa.

## **Abstract**

Glucokinase, one of the isoenzymes of the hexokinase group, also known as hexokinase type IV, is a tissue-specific enzyme present in hepatocytes, and in pancreatic beta cells. Glucokinase plays a key role in glucose homeostasis, regulating insulin secretion in response to glucose in the beta cells and uptake of glucose in the liver. In humans, mutations in the glucokinase gene cause maturity onset-diabetes of the youth (MODY 2).

Differential regulation of glucokinase activity and gene expression in the liver and pancreas has been reported. This difference might be expected considering the different functions of these two tissues in glucose homeostasis. Comparison of the pancreatic and hepatic glucokinase gene transcripts reveals the existence of two distinct promoters in a single glucokinase gene. The existence of two promoters support the concept that different factors regulate glucokinase transcription in the liver and pancreatic beta cell. In the liver, glucokinase is regulated in response to fasting and refeeding, being insulin and cAMP the mediators of this response. In contrast, in the pancreatic beta cell glucose levels are the ones which induce islet glucokinase activity. Glucocorticoids and thyroid hormones have demonstrated to affect the expression of hepatic and pancreatic isoenzymes. The development of the enzyme between the pancreas and the liver is also different. In the pancreas the enzyme is already present in fetal life. In the liver glucokinase first appear two weeks after birth, and its expression depends upon hormonal and nutritional status. It has been shown that retinoic acid increases glucokinase activity and mRNA levels in the insulinoma cell line RIN-m5F; however, the possibility that the effect of retinoic acid on RIN-m5F glucokinase was inherent to the cell line or related to its differentiation capacity cannot be rule out. In this work we demonstrated that physiologic concentrations of retinoic acid are able to stimulate glucokinase activity as in fetal and adult islets as well as in neonatal and adult hepatocytes. Using the branched DNA (bDNA) assay, a sensitive signal amplification technique, we demonstrated that these effect is mediated by increases in glucokinase mRNA levels.

## INTRODUCCION

Los estudios bioquímicos en los últimos 25 años han establecido que la glucocinasa (ATP:D-hexosa 6-fosfotransferasa EC 2.7.1.2) juega un papel primordial en el control de la euglucemia, regulando el metabolismo de la glucosa tanto en el hígado como en las células beta del páncreas (Iynedjian y cols. 1989).

Se define como euglucemia a las concentraciones de glucosa en la sangre dentro del intervalo de 4 a 6 mM (70-110 mg/dl), y este nivel se debe mantener a pesar de los cambios en la alimentación y los consumos diarios.

Varios órganos se encuentran involucrados en mantener este estado euglucémico, dentro de los cuales, el hígado y el páncreas son, sin duda, los principales.

El hígado es por unidad de peso el sitio más importante de almacenamiento de glucosa en estados de hiperglucemia, los hepatocitos la remueven del torrente sanguíneo para convertirla en glucógeno o alguna otra forma de energía. Durante periodos de hipoglucemia, el hígado degrada el glucógeno y permite la salida de glucosa a la circulación. Las células beta del páncreas, por otro lado, contribuyen a la homeostasis de la glucosa en el organismo ajustando los niveles circulantes de insulina y glucagon. Cuando los niveles de insulina se elevan, el hígado responde coordinando la inducción de enzimas mediadoras de la glucólisis y glucogenogénesis, y al mismo tiempo quedan inhibidas las enzimas reguladoras de la glucogenólisis y gluconeogénesis. Así cuando los niveles de insulina bajan y los de glucagon se elevan, los procesos de regulación para dichas vías metabólicas se invierten.

En contraste, la glucólisis en las células beta es regulada por los niveles circulantes de glucosa y no de insulina (Liang y cols. 1992).

La característica en común de ambas células, hepatocitos y células beta del páncreas, que contribuye a mantener la homeostasis de la glucosa, es la expresión del gen de la enzima hexocinasa IV, mejor conocida como glucocinasa (Iynedjian y Girard, 1990).

Esta enzima sólo se encuentra en las células del parénquima hepático, en las células beta del páncreas, en las células neuroendócrinas del tracto gastrointestinal y en el hipotálamo (Matschinsky 1996; Jetton y cols.1994). La presencia de la glucocinasa en las células L-enteroendócrinas dispersas a lo

largo del epitelio medio y posterior del intestino y en las neuronas del hipotálamo ventromedial sugiere algún papel en la modulación de la conducta de la alimentación, captación y utilización de nutrientes (Jetton y cols. 1994).

Estudios sobre la estructura y gen de la glucocinasa demostraron la existencia de un único gen con dos promotores diferentes separados entre sí por más de 12kb (Magnuson, 1990).

La regulación transcripcional de la glucocinasa hepática se encuentra bajo control hormonal y nutricional (Burch y cols. 1982), sin embargo, se sabe muy poco sobre el efecto de estos factores sobre la glucocinasa pancreática (Matschinsky an cols.1968).

El descubrimiento de la existencia de dos promotores con diferentes secuencias nucleotídicas controlando la transcripción del gen de la enzima, sugiere una regulación diferencial de la glucocinasa en los tejidos.

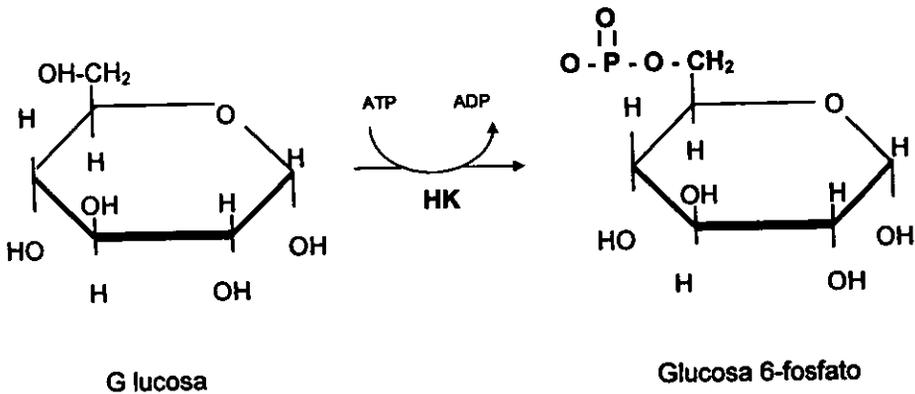
El hallazgo reciente de que la actividad incrementada de la glucocinasa pancreática en ratones transgénicos es capaz por sí sola de regular los niveles de glucosa sanguínea (Epstein y cols. 1992.), además del hecho de que pacientes con diabetes mellitus de tipo MODY 2, presentan mutaciones en esta enzima (Stoffel y cols.1992), subrayan el papel determinante de la isoenzima en el control de la glucemia.

En este trabajo se estudió el efecto del ácido retinoico sobre la expresión del gen de la glucocinasa, así como también el efecto del retinoide en la actividad de la enzima en páncreas y en hígado en diferentes estadios de desarrollo. A continuación se presentarán algunos antecedentes necesarios para comprender con más detalle el importante papel de la glucocinasa en el metabolismo de la glucosa y su relación estrecha con la secreción de insulina en respuesta a la concentración de glucosa. También se abordarán los estudios previos en el conocimiento de la regulación de la glucocinasa hepática y pancreática y por último la relación que se ha encontrado entre la glucocinasa y la diabetes mellitus.

# ANTECEDENTES

## Glucocinasa

El transporte y la fosforilación de la glucosa son los pasos iniciales para su utilización por todos los tejidos. El primer paso es el movimiento de la glucosa a través de la membrana celular por medio de transportadores específicos. Existen reportados cuatro diferentes transportadores designados como GLUT 1 al 4 (Thorens y cols.1988). El segundo paso es su fosforilación, pasando de glucosa a glucosa 6-fosfato (Fig.1), paso que es catalizado por la familia de enzimas denominadas hexocinasas (HK).



**Fig.1 Fosforilación de la glucosa**

Los miembros de esta familia presentan diferentes propiedades catalíticas que dependen del tejido donde se encuentren así como de su distribución intracelular (Middleton, 1990). En mamíferos están presentes cuatro isoenzimas de esta familia: hexocinasas I, II, III, IV.

Las HK de la I a la III tienen propiedades en común, que incluyen un peso molecular de aproximadamente 100 kd, la posibilidad de fosforilar otras hexosas y su relativamente alta afinidad por la glucosa. Además de que son inhibidas por

elevadas concentraciones del producto de la reacción que catalizan: glucosa 6-fosfato.

La hexocinasa IV, más comunmente llamada glucocinasa (EC 2.7.1.2), es estructural y funcionalmente diferente a las otras isoenzimas. Su peso molecular es de aproximadamente 50 Kd, tiene una baja afinidad por la glucosa, mucho menor afinidad para otras hexosas y no existe inhibición por el producto de la reacción que cataliza (Tabla 1).

<i>Hexocinasa</i>	<i>Peso Molecular</i>	<i>K<sub>m</sub>(glucosa)</i> (mM)	<i>G6F(-)<sup>d</sup></i>	<i>Tejido</i>
<i>I</i>	<i>≈100 kd</i>	<i>0.04<sup>a</sup></i>	<i>Si</i>	<i>Cerebro, Riñón</i>
<i>II</i>	<i>≈100 kd</i>	<i>0.13<sup>d</sup></i>	<i>Si</i>	<i>Músculo, Adipocitos</i>
<i>III</i>	<i>≈100 kd</i>	<i>0.02<sup>b</sup></i>	<i>Si</i>	<i>Hígado, Riñón</i>
<i>IV</i>	<i>≈ 50 kd</i>	<i>5.0<sup>c</sup></i>	<i>No</i>	<i>Hígado, Páncreas</i>

*a Cinética hiperbólica*  
*b Inhibido por exceso de glucosa*  
*c Cinética sigmoidal (K<sub>m</sub>=KHill)*  
*d G6F(-) inhibición por glucosa 6-fosfato*

**Tabla 1. Características estructurales y funcionales de las hexocinasas.**

Son 3 propiedades enzimáticas que distinguen a la glucocinasa de las otras hexocinasas de mamífero: 1) su baja afinidad por la glucosa, 2) su falta de inhibición por glucosa 6-fosfato y 3) la cinética cooperativa con la glucosa.

La falta de inhibición por la glucosa 6-fosfato a baja concentración, asocia la ausencia de sitios de unión alostérica en la glucocinasa para el producto de la reacción. La tercera propiedad de la glucocinasa, su cooperatividad cinética con la glucosa, es tanto fisiológica como teóricamente, interesante: la cooperatividad cinética con la glucosa le permite tener cambios en su tasa de reacción en respuesta a los cambios de concentración de glucosa. La glucocinasa tiene un solo sitio de unión y funciona en estado monomérico (Conolly y Trayer 1979). Por esto, el modelo clásico de cooperatividad para enzimas multiméricas no es

aplicable. Un mecanismo llamado "inducción por ligando de transición lenta" es la explicación más favorecida para el comportamiento cooperativo de la glucocinasa (Cárdenas y col 1984). La base del modelo es la existencia de dos estados conformacionales y cinéticamente distintos de la enzima y la posibilidad de la interconversión entre ellos en función de la concentración ambiental del sustrato. Una consecuencia de la relativa lentitud con la que se da la transición conformacional a la tasa catalítica consiste en que le confiere a la enzima "memoria" de su interacción con el sustrato. Esta propiedad es el aspecto central del modelo de cooperatividad "nemotécnico" de las enzimas monoméricas (Cornish-Bowden y Storer 1986).

Resulta interesante también señalar que, en general, existe un paralelismo entre un transportador particular y una hexocinasa específica, es decir, el transportador con más baja  $K_m$  se encuentra generalmente presente con hexocinasas de  $K_m$  pequeña (GLUT-1 con HK 1), y el transportador de alto  $K_m$  se encuentra presente en tejidos donde se encuentra la hexocinasa IV (GLUT-2 con GK)

El sistema GLUT-2/GK presente en el hígado y en las células beta del páncreas, juega un papel muy importante en el proceso de regulación de la glucemia; a concentraciones por arriba de 8 mM, la glucosa entra a la célula por medio de los transportadores localizados en la membrana plasmática. La  $K_m$  para el transportados GLUT-2 es de aproximadamente 15-20 mM (Mueckler, 1991). Una vez dentro de la célula, la glucosa es fosforilada por la glucocinasa cuya constante de afinidad es de aproximadamente 5 mM. La diferencia existente entre la  $K_m$  del GLUT-2 y la glucocinasa indica que el transporte de glucosa hacia el interior de las células no es el paso limitante de la reacción, siendo entonces la modulación de la velocidad de la fosforilación de la glucosa por la glucocinasa la limitante en la velocidad de utilización de la misma por las células (Printz y cols. 1993).

La cinética sigmoideal de la glucocinasa describe un considerable aumento en su actividad fosforilante a concentraciones de glucosa entre 5-10 mM. Por otra parte como ya se mencionó, no existe un mecanismo de

retroalimentación negativa por medio de la glucosa 6-fosfato. Estos indicadores otorgan a la glucocinasa la característica de permitir que el metabolismo de la glucosa varíe en función de la concentración de la glucosa sanguínea. (Shimizu y cols. 1988).

### **Característica de la estructura del gen de la Glucocinasa**

En los últimos 10 años las técnicas de biología molecular han sido de gran importancia para el estudio de la glucocinasa. Para poder entender los mecanismos de regulación tejido-específico de esta enzima se requirió la clonación del DNA complementario (cDNA). El gen de la glucocinasa fue primeramente clonado de la rata y su estructura sirvió como un estándar de referencia para otras especies (Magnuson y cols. 1989)

La característica más notable en este gen es la presencia de promotores alternativos, los cuales son los responsables de la iniciación de la transcripción en diferentes sitios del DNA.

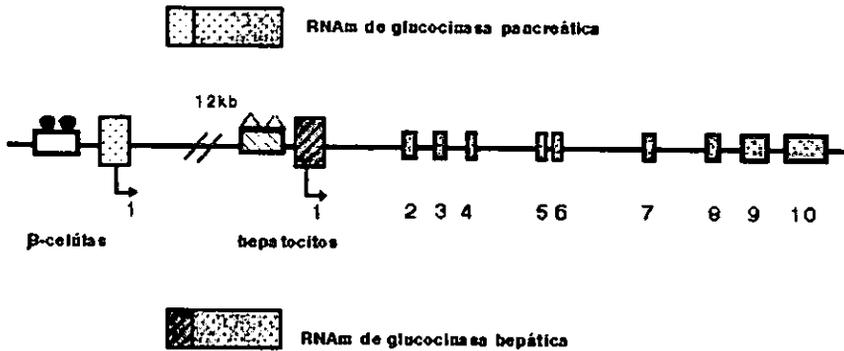
La primera clave de la existencia del promotor tejido-específico provino de estudios de secuencias de DNA complementario de hígado de rata y de insulinooma. Magnuson y colaboradores (1989) identificaron nueve exones numerados del 2 al 10 en la unidad de transcripción. La secuencia del exón 1 difiere entre la forma pancreática y la hepática, dando como consecuencia una diferencia de 15 aminoácidos en la región N terminal de la proteína; en tanto que los exones restantes son idénticos en ambos tejidos (Fig. 2).

El promotor localizado en la parte 5' distal regula la transcripción del gen en las células beta, en tanto que el promotor 5' proximal regula la transcripción del gen en los hepatocitos (Tanizawa y cols. 1991).

El descubrimiento de que dos promotores separados entre sí por más de 12 kilobases, con diferentes secuencias nucleotídicas controlan la transcripción del gen de la enzima, puede explicar la regulación diferencial de la glucocinasa en los hepatocitos y en las células beta pancreáticas (Bedoya y cols. 1986; Iynedjian y cols. 1989).

En el humano el gen de la glucocinasa se localiza en la banda 13 del brazo corto del cromosoma 7. La secuencia de los 465 residuos de aminoácidos

de la glucocinasa de rata y de humano es idéntica en un 98%. El gen de ambas especies consta de una estructura similar en cuanto a exones e intrones (Tanizawa y cols.1991).



**Fig.2 Gen de la glucocinasa.** Se ha demostrado la existencia de un único gen que codifica para la glucocinasa, con dos diferentes promotores separados entre sí por más de 12 kb. La secuencia del exón 1 también difiere entre las dos productos resultantes, sin embargo, el resto de los exones son idénticos.

El gen de la glucocinasa es un interesante ejemplo de una unidad trascricional con promotores tejido-específicos los cuales son afectados por estímulos nutricionales y hormonales.

### Glucocinasa Pancreática

En el páncreas, la glucocinasa juega un papel esencial en el mecanismo que permite a las células beta secretar insulina en respuesta a los niveles de

glucosa sanguínea (Ashcroft 1980. Miwa y cols.1990). La liberación de insulina inducida por los niveles post-prandiales de glucosa (10mM) se dispara coincidiendo con el momento en que la actividad de la glucocinasa aumenta (Matschinsky 1996).

### **Mecanismo de secreción de insulina.**

La insulina es secretada por las célula beta del páncreas, las cuales se encuentran localizadas en los islotes de Langerhans. Los islotes están compuestos diferentes tipos y de células: células  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y PP, productoras de glucagon, insulina, somatostatina, polipéptido intestinal y polipéptido pancreático respectivamente.

La secreción de insulina ocurre de manera basal (constitutiva) y también estimulada (regulada). La secreción basal tiene periodicidad de 9 a 14 min y es inherente a la célula beta y posiblemente sea modulada por mecanismos neuronales.

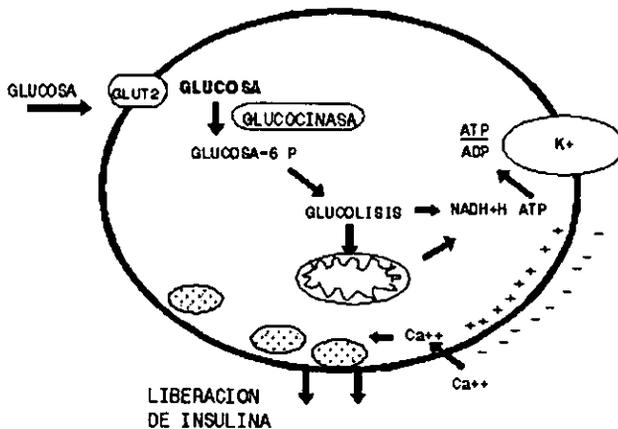
La secreción de insulina estimulada por glucosa es regulada por un complejo mecanismo en el que está involucrado el metabolismo de la glucosa, la generación de segundos mensajeros y en un efecto eléctrico mediante el cual se despolariza la membrana de la célula beta. Esta despolarización provoca la entrada de calcio, dando como resultado la fusión de los gránulos de insulina con la membrana plasmática y finalmente liberando la hormona al torrente sanguíneo (Ashcroft y cols. 1980).

La primera etapa para la secreción de insulina en respuesta a la concentración de glucosa es su entrada a la célula por medio del transportador GLUT-2 que, como ya se mencionó, tiene una  $K_m$  alta para la glucosa (15-20 mM). Una vez dentro de la célula la molécula es fosforilada por medio de la glucocinasa. La glucosa 6-fosfato resultante continua su catabolismo en la célula beta del páncreas a través de la vía glucolítica y posteriormente de la oxidación mitocondrial. Este proceso genera un cambio en la tasa ATP/ADP, con lo cual ocurre un cierre de canales de potasio sensibles a ATP, lo que ocasiona una despolarización en la membrana plasmática, así se desencadena un cambio en

el potencial de voltaje de la célula que permite la apertura de canales de calcio y con ello la entrada de este catión (Fig.3).

A su vez el aumento de calcio intracelular, activa proteínas como la calmodulina, que a su vez activa proteínas cinasas, las cuales producen fosforilación de miosina y tubulina, que a su vez favorecen el movimiento y fusión de los gránulos que contienen insulina con la membrana.

Los segundos mensajeros involucrados en el proceso de secreción de insulina no se encuentran totalmente definidos. Es claro que para que haya secreción de insulina se requiere de procesos como la glucólisis y la oxidación mitocondrial, pues el gliceraldehído o alimentadores del ciclo de Krebs como la leucina actúan como secretagogos.



**Fig.3 Célula B- pancreática. Esquema de secreción de insulina.**

Secuencia de eventos: 1)Entrada de glucosa a la célula  $\beta$  por medio del transportador *Glut2*; 2)Fosforilación de la glucosa por la GK; 3)Entrada de la glucosa-6fosfato a ciclos catabólicos; 4)Cambio en la tasa de ATP/ADP; 5)Cierre de canales de K sensibles a ATP; 6)Despolarización de la membrana plasmática y apertura de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje; 7)Aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular y fusión de vesículas con la membrana.

## **Diversos factores que regulan la glucocinasa pancreática**

**Ejercicio.** En ratas sometidas a ejercicio se encontró una disminución del contenido de RNAm de la glucocinasa, y de forma paralela se produjo una disminución en el RNAm de la proinsulina (Koranyi y cols.1991), lo cual sugiere que el ejercicio modula la glucocinasa y la síntesis de insulina. En estos resultados se encuentra una alta correlación entre la disminución del RNA de la glucocinasa y la proinsulina, sugiriendo que la expresión de estos genes puede estar regulada de manera paralela.

**Glucosa.** Algunos estudios con animales en los cuales se implantó un insulinoma con el fin de provocar hiperinsulinemia e hipoglucemia, demuestran que bajo estas condiciones, la actividad de la glucocinasa hepática se encuentra aumentada, debido al alto nivel de insulina en el plasma y a los bajos niveles de glucosa en el mismo fluido; sin embargo, la actividad de la glucocinasa pancreática no se modifica (Bedoya y cols. 1986). La disminución de insulina en el plasma y el incremento de glucosa cuando el insulinoma es removido provoca un aumento en la actividad de la glucocinasa pancreática y una disminución de la actividad de la hepática, sugiriendo con esto que la glucosa es el principal regulador de la expresión de la glucocinasa en las células beta. Este tipo de estudios *in vivo* e *in vitro* demostraron que la glucosa induce la actividad de la glucocinasa, sin embargo, existe controversia sobre el mecanismo. Algunos estudios sugieren que el efecto es mediado por un aumento en el RNAm (Tiedge y Lenzen 1991), en tanto que otros informes apoyan un mecanismo ligado a un efecto sobre la actividad catalítica de la enzima (Iynedjian y cols.1989 y Liang y cols. 1990).

**Hormonas tiroideas.** Poco se sabe del efecto de las hormonas sobre la glucocinasa pancreática. los estudios sobre la regulación de la glucocinasa han sido llevados a cabo en línea celular de insulinoma de rata RIN-m5F. En estos estudios se observa que el glucocorticoide dexametasona aumenta la actividad y los niveles de RNAm de la isoenzima, en tanto que el tratamiento con hormona tiroidea produce una disminución del RNAm sin afectar la actividad de la enzima (Fernández-Mejía y Davison 1992), lo cual difiere del efecto estimulante de esta hormona sobre la isoenzima hepática (Höppner y Seitz 1989).

**Hormonas sexuales.** El embarazo está asociado con cambios adaptativos entre los que se incluyen un aumento en la secreción de insulina en respuesta a la glucosa y una disminución del umbral de la estimulación por glucosa. Magnaterra y cols. (1997) demostraron que existe una inducción, dosis dependiente y tiempo dependiente, de la actividad de la glucocinasa en células RIN 1046-38 por estradiol y progesterona. Este aumento en la actividad de la glucocinasa resulta en un incremento en la liberación de insulina en respuesta a la glucosa. Estos resultados sugieren que el aumento de estos esteroides durante el embarazo afectan la expresión de la glucocinasa en las células beta del páncreas, y esto contribuye al desarrollo de la hiperinsulinemia observada durante el embarazo.

**Prolactina.** Weinhaus y cols. (1996) demostraron que la actividad de la glucocinasa de islotes pancreáticos de ratas preñadas aumenta de un 50 a 60% del control observado en ratas no preñadas. Así mismo realizaron experimentos adicionando prolactina al medio de cultivo de islotes de ratas no preñadas y observaron que este tratamiento incrementa la actividad de la glucocinasa en un 60%, efecto similar al obtenido en los islotes de ratas preñadas.

### **Vitaminas y Derivados**

**Acido Retinoico.** Ensayos sobre la línea celular de insulinoma de rata RIN-m5F, tratadas con ácido retinoico, derivado de la vitamina A, demostraron que el ácido retinoico aumenta la actividad y expresión del gen de la enzima (Fernández-Mejía y Davison 1992). Este estudio también pone de manifiesto la probable existencia de una regulación paralela del gen de la glucocinasa y el gen de la insulina.

**Biotina.-** Borboni y cols. (1996) demostraron que en la línea celular pancreática RIN1046-28 la biotina tiene un efecto estimulador, dosis dependiente, sobre el RNAm de la glucocinasa, después de 24 h de tratamiento. Estudios recientes han demostrado que la adición de biotina a cultivos de islotes de rata adulta, estimula la expresión del gen de la glucocinasa y su actividad (Romero y cols. 1998. Datos no publicados)

## **Glucocinasa Hepática**

En el hígado, la glucocinasa se regula de forma diferente al páncreas. La actividad de la glucocinasa hepática se induce durante periodos de hiperglucemia donde existe un aumento en la concentración de insulina. Durante periodos de ayuno la concentración de insulina decae y la concentración de glucagon aumenta, y ésta última hormona disminuye la actividad de la glucocinasa.

### **Diversos factores que regulan la glucocinasa hepática**

**Insulina.** Se ha demostrado, en diferentes modelos experimentales, que la insulina induce la actividad de la glucocinasa en el hígado. Estudios *in vivo* tanto en ratas diabéticas después del tratamiento con insulina (Sibrowsky y cols.1982) como en condiciones post-prandiales (Sibrowsky y cols. 1980) demuestran que esta hormona incrementa rápida y sustancialmente la actividad de la glucocinasa. Existen estudios en hepatocitos aislados sobre los cuales también se observa un aumento en la actividad y en la síntesis de la glucocinasa (Spence y Pitot 1979), efecto que se debe al aumento en la velocidad de transcripción (lynedjian y cols. 1988. Magnuson y Shelton1989).

**Glucagon.** Esta hormona hiperglucemiante produce una disminución en la actividad de la glucocinasa (Weinhouse, 1976), en los niveles de RNAm (Sibrowsky y cols. 1984) y en la velocidad de transcripción del gen (lynedjian y cols.1989). Este efecto está mediado por AMP cíclico (Sibrowsky y Seitz, 1984). El glucagon anula la acción estimulante de la insulina sobre la transcripción del gen (lynedjian y cols.1989).

**Hormonas tiroideas.** En estados hipotiroideos, la glucocinasa hepática se encuentra disminuída (Höppner y Sietz, 1989). La restauración de los niveles de hormonas en ratas tiroidectomizadas (Sibrowsky y cols. 1981) o su adición al medio de cultivo de hepatocitos aislados aumenta la actividad y la síntesis de la glucocinasa (Spence y Pitot, 1979). En estados hipertiroideos, sin embargo, la glucocinasa no se encuentra incrementada (Sibrowsky y cols.1981). El rápido

efecto de la  $T_3$  y la correlación entre la velocidad de transcripción y la cantidad de enzima (Hoepner y Seitz, 1989) sugieren que a nivel de la transcripción la hormona tiroidea regula la glucocinasa. Decaux y col. (1997) demostraron que la triiodotironina induce una rápida acumulación de RNAm de glucocinasa, de manera secundaria a la estimulación de la transcripción del gen durante las primeras 24 h de cultivo de hepatocitos aislados de rata de 10 días de nacidas.

**Glucocorticoides.** Se ha demostrado que estas hormonas son necesarias en la inducción de glucocinasa producida por insulina (Minderop y cols. 1987). La dexametasona es capaz de aumentar la actividad y la masa protéica de la glucocinasa en hepatocitos aislados, independientemente de la presencia de la insulina en el medio (Spence y Pitot, 1979), lo que sugiere que el efecto es directo sobre la inducción de la enzima. Se conoce poco sobre los mecanismos moleculares por los cuales los glucocorticoides ejercen su efecto sobre la glucocinasa, sin embargo, se sabe que la falta de éstos produce una considerable disminución en la estabilización del RNAm de la glucocinasa. Por otro lado, estudios por Sibrowsky y cols. (1980) demuestran que los glucocorticoides aumentan la vida media de la proteína, lo que sugiere un efecto dual de los glucocorticoides sobre la glucocinasa (Minderop y cols. 1987).

**Biotina.** Esta vitamina incrementa la actividad de la glucocinasa de hepatocitos aislados (Dakshinamurti y cols. 1970) y en animales que poseen baja actividad de glucocinasa por condiciones de ayuno o por dieta rica en grasas. El mecanismo molecular de este efecto consiste en un aumento en la transcripción del gen (Chauhan y Dakshinamurt, 1991). Se ha demostrado que la adición de biotina a una concentración de  $10^{-6}$  M al medio de cultivo de hepatocitos aislados de rata, incrementa cuatro veces la actividad de la glucocinasa, observándose la máxima actividad a las 6 h después del tratamiento (Spence y Koudelka, 1984).

**Fármacos.** El hipoglucemiante oral glibenclamida induce la actividad de la glucocinasa (Lenzen y cols. 1986), sin embargo, hasta el momento se desconoce el mecanismo molecular del efecto.

**Acido Retinoico.** Decaux y cols. (1997) demostraron que la adición de diferentes dosis de ácido retinoico o triiodotironina al cultivo de hepatocitos

aislados de rata de 10 días de nacidas provoca un aumento de la transcripción del gen durante las primeras 24 h de cultivo. Sin embargo, el efecto individual de estas hormonas no es aditivo.

**EFFECTO DIFERENCIAL DE HORMONAS Y NUTRIMENTOS SOBRE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LA GLUCOCINASA**

	<b>Hígado</b>		<b>Páncreas</b>	
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
<b>Diferenciación</b>		Se expresa 15 días después del nacimiento		Se expresa desde la etapa fetal
<b>Insulina</b>	↑ actividad ↑ RNAm	↑ actividad ↑ RNAm		Sin efecto
<b>Glucagon (AMPc)</b>	↓ actividad ↓ RNAm	↓ actividad ↓ RNAm	↑ actividad ↑ RNAm ↑ actividad del promotor	
<b>Glucosa</b>	sin efecto	sin efecto	↑ actividad	↑ actividad
<b>Ejercicio</b>	?	?	?	↓ RNAm
<b>Glucocorticoides</b>	↑ actividad ↑ RNAm	↑ actividad	↑ actividad ↑ RNAm	?
<b>Hormona tiroidea</b>	↑ actividad ↑ RNAm	↑ actividad ↑ RNAm	En RIN-m5F No afecta actividad ↓RNAm	?
<b>Ácido retinoico</b>	↑ actividad ↑ RNAm	?	↑ actividad ↑ RNAm ↑ actividad promotor En RIN-m5F ↑ actividad ↑ RNAm	?
<b>Biotina</b>	↑ actividad	↑ actividad ↑RNAm	↑ actividad ↑RNAm	?

## Glucocinasa y Diabetes

La Diabetes Mellitus no insulino dependiente (DMNID, Diabetes tipo II) es un trastorno metabólico caracterizado por la alterada e ineficaz secreción de insulina en respuesta a glucosa y por la resistencia de tejidos blanco a la acción de la insulina. Ambos defectos contribuyen al desarrollo de una hiperglucemia en estado de ayuno.

La etiología de la DMNID no es del todo comprendida en detalle, aunque, se conoce que existe un fuerte determinante genético en la aparición de la DMNID (Zimmet, 1991).

Como una regla general, la enfermedad se clasifica como uno de los síndromes multifactoriales-poligenético. Sin embargo, existe un subtipo de la enfermedad con un modelo simple autosómico dominante, la diabetes tipo MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young). Este subtipo de Diabetes Mellitus representa entre el 1-2% de los casos de DMNID y se calcula que hasta el 13% de las familias diabéticas de origen Caucásico en Francia son MODY (Froguel y cols. 1991).

Los genes candidatos para ser estudiados se basan en el extenso conocimiento de los mecanismo bioquímicos glucoreguladores. Debido a que el principal impacto de la homeostasis de la glucosa en sangre está en la glucocinasa, el gen de esta enzima tomó un papel importante en la lista de genes potenciales de susceptibilidad a la diabetes.

Ahora ya es claro que existe más de una causa de MODY y que cada una resulta de diferentes genes alterados. Se han encontrado hasta el momento 5 genes asociados a diabetes mellitus no insulino dependientes tipo MODY:

MODY 1 en la que defecto está en el gen que codifica para el factor nuclear de hepatocitos HNF4 $\alpha$ .(Yamagata 1996a)

MODY 2 en el gen de la glucocinasa (Bell y cols. 1993) y

MODY 3 en el gen que codifica para el factor nuclear de hepatocitos HNF1 $\alpha$  (Yamagata y cols. 1996b).

MODY 4 en el gen IPF1 que codifica también para un factor transcripcional (Stoffers y col 1997)

MODY 5 en el gen que codifica para el factor nuclear HNF1 $\beta$  (Horikawa y cols. 1997)

El 50-60% de los pacientes franceses con MODY tienen mutaciones en el gen de la glucocinasa (Frogel y cols. 1993). Por otra parte, también en estudios japoneses se encontraron mutaciones en el gen de la glucocinasa en un gran número de individuos diabéticos tipo II (Sakura y cols. 1992, Eto y cols. 1993).

Meglasson y Matschinsky (1984) postularon que pequeñas reducciones en la actividad de la glucocinasa en la célula beta podrían propiciar un mayor requerimiento de glucosa para inducir la secreción de insulina.

El hallazgo de que mutaciones en el gen de la glucocinasa causan diabetes mellitus no insulino dependiente tipo MODY, ha confirmado el papel de esta enzima como regulador de la secreción de insulina.

Por otra parte estudios experimentales han dejado establecido que la glucocinasa es determinante en la secreción de insulina y regulación de la glucemia. Ratones transgénicos que expresan hexocinasa B de levadura (semejante a la glucocinasa) muestran niveles mas bajos de glucosa sanguínea y aumento en la secreción de insulina estimulada por glucosa (Epstein y cols. 1992).

Los estudios en ratones knock-out, heterocigotos para el gen de la glucocinasa hepática, sugieren que la deficiencia de la glucocinasa para el hígado juega un papel significativo en la homeostasis de la glucosa (Bali y cols. 1995). Por otra parte los ratones homocigotos para alteraciones en la glucocinasa pancreática presentan diabetes severa y mueren en la primera semana de vida (Grupe y cols. 1995).

Se han obtenido datos que señalan que aproximadamente 45% de los sujetos que son heterocigotos para las mutaciones de la glucocinasa tienen diabetes, 22% tienen intolerancia a la glucosa y 33% tienen niveles de glucosa mínimamente elevados (6 a 7.7 mM) en ayunas (Frogel y cols. 1993).

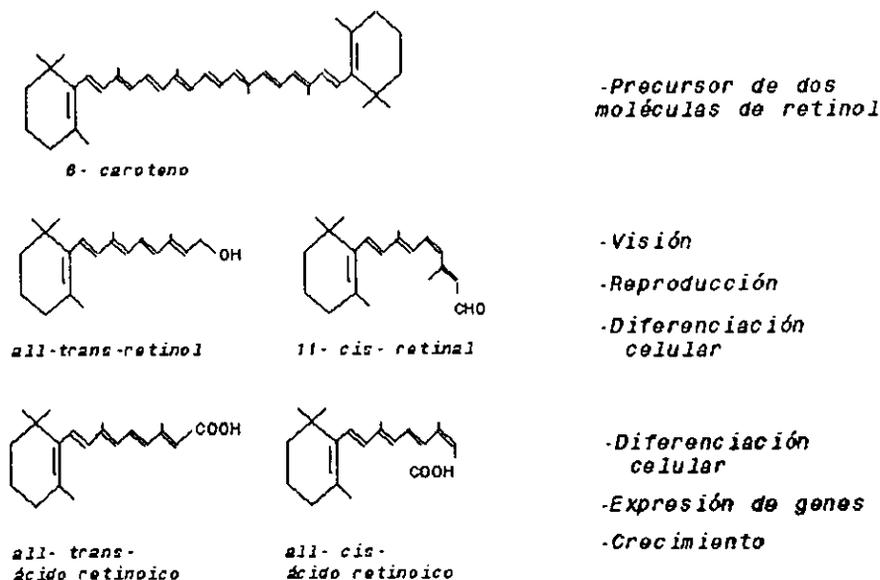
## **Vitamina A**

Desde el reconocimiento de la vitamina A como un factor de crecimiento esencial su mecanismo de acción ha sido estudiado por nutriólogos, fisiólogos, bioquímicos y biólogos celulares. Los principales modelos de experimentación están basados en el monitoreo de células en cultivo y/o de animales deficientes en vitamina A o con exceso de ésta.

El interés en el estudio de la vitamina A ha aumentado en los últimos años debido a su acción como antioxidante (Krinsky, 1993), a su acción como inhibidor de mutagénesis y transformación e inhibición de lesiones premalignas, por su asociación con la disminución de algunos tipos de cáncer (Haq y Chyntil, 1991) y como proto-oncogen (Mangelsdorf y cols. 1992).

La vitamina A tiene también funciones de morfógeno (Mangelsdorf y cols.1992) y es nutrimento indispensable para el crecimiento y diferenciación celular de muchos tejidos epiteliales y en el desarrollo embrionario (De Luca, 1991)

Existen diferentes estados de oxidación de la vitamina A: alcohol, aldehído y ácido, que corresponden al retinol, retinal y ácido retinoico, los cuales están relacionados con diferentes funciones biológicas (Fig. 4).



**Fig. 4. Retinoides**

Las formas fisiológicas de la vitamina A involucradas en el transporte interórgano o en su almacenamiento, incluyen al retinol, al ácido retinoico y a los retinil-ésteres. Con excepción de los retinil-ésteres (Ong y cols. 1987), todas estas formas son hidrofóbicas; sin embargo, los retinil-ésteres al unirse con las diferentes proteínas específicas que fijan retinoides se transforman en compuestos hidrosolubles.

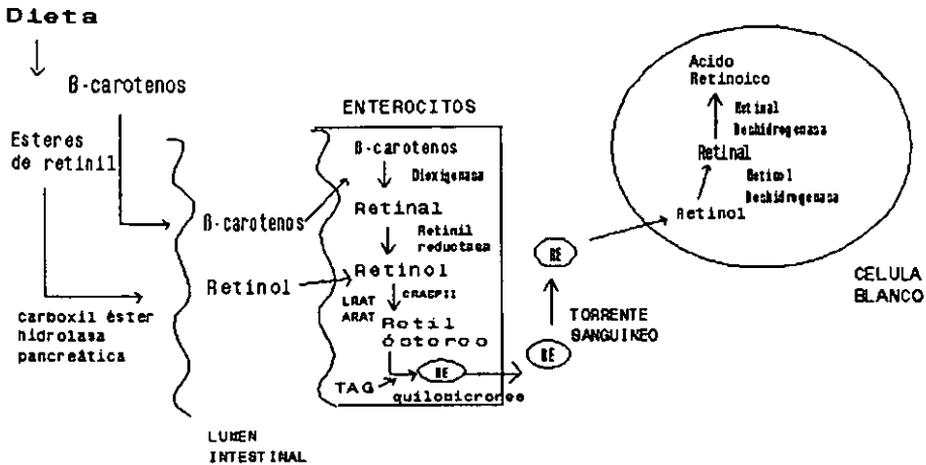
La vitamina A ejerce su acción sobre la expresión de genes específicos a través del ácido (AR). En los mamíferos, se lleva a cabo la conversión de retinol a retinal, y la oxidación del aldehído a ácido retinoico en un proceso irreversible.

### **Transporte y almacenamiento de vitamina A**

La principal fuente de vitamina A en la dieta son: el  $\beta$ -caroteno precursor proveniente de los vegetales y los retinil-ésteres de los tejidos animales. Durante la digestión proteolítica en el estómago se obtienen los retinil-ésteres y los carotenoides, que forman agregados junto con otros lípidos. Todos los retinil-ésteres son enzimáticamente convertidos a retinol en la luz intestinal antes de su absorción por los enterocitos, en tanto que una porción de los carotenoides son convertidos a retinol directamente en los enterocitos. El retinol formado se esterifica posteriormente por medio de la lecitin-retinol aciltransferasa y por la Acil-CoA-retinol aciltransferasa. Los retinil-ésteres y los  $\beta$ -carotenos se incorporan posteriormente a los quilomicrones, los cuales se transportan por vasos linfáticos hacia la circulación sistémica, y de ahí hacia el hígado donde son hidrolizados y reesterificados antes de ser almacenados o procesados para formar retinol. En el hígado el retinol se une a proteínas específicas (RBP) para circular hacia los tejidos y posteriormente se une a otra proteína llamada transtiretina. Este complejo retinol-RBP-transtiretina moviliza el retinol a varias células blanco donde un receptor sobre la superficie celular regula su entrada.

En los hepatocitos los retinil-ésteres se hidrolizan por medio de la enzima retinil-éster hidrolasa que está asociada a la membrana plasmática para formar retinol. El retinol puede tomar diferentes vías: 1) dar lugar a retinil-ésteres que puedan ser transferidos a las células estrelladas para su almacenamiento; 2) parte del retinol también puede ser oxidado a retinal por la retinol deshidrogenasa y posteriormente a ácido retinoico por la retinal deshidrogenasa;

3) por otra parte el retinol puede formar directamente ácido retinoico por medio de una deshidrogenasa que funciona como retinol deshidrogenasa (Fig. 5).



**Fig. 5. Metabolismo de retinoides. LRAT: lecitin-retinol aciltransferasa. ARAT: acil CoA-retinol aciltransferasa. CRABP: proteína celular que fija retinol. TAG: triacilgliceroles. RE: retinil ésteres.**

En los últimos años muchos estudios sobre vitamina A se han enfocado en la función de las diferentes proteínas que unen retinoides (Tabla 2).

Se han postulado dos hipótesis de la función de estas proteínas: 1) como amortiguadores para secuestrar y limitar la concentración de retinoides libres en las células; y 2) la de dirigir a los retinoides unidos a ellas hacia las enzimas específicas para su transformación, de manera que la reacción sólo se lleve a cabo cuando la proteína que une retinoides (RBP) esté unida al retinoide.

<b>PROTEÍNA</b>	<b>RETINOIDE (LIGANDO)</b>	<b>FUNCION</b>
<i>RBP</i>	<i>retinol</i>	<i>Transporta retinol del hígado a tejidos extrahepáticos</i>
<i>CRBP</i>	<i>retinol</i>	<i>Transporta retinol al núcleo de células</i>
<i>CRBP-II</i>	<i>retinol</i>	<i>Participa en la absorción del retinol en intestino</i>
<i>CRABP-I</i>	<i>ácido retinoico</i>	<i>Transporta retinoico al núcleo de células</i>
<i>CRABP-II</i>	<i>ácido retinoico</i>	<i>Regula el acceso del retinoico a receptores nucleares</i>
<i>CRALBP</i>	<i>11-cisretinal</i> <i>11-cisretinol</i>	<i>Une retinal o retinol para que se oxide en retina</i>
<i>IRBP</i>	<i>11-cisretino</i>	<i>Transporta retinol entre las diferentes partes pan-transretinol del sistema visual.</i>

**TABLA 2. Proteínas que fijan retinoides (Tomado de Torres y Torres, 1995)**

Como se mencionó con anterioridad, las células estrelladas del hígado, están involucradas en el metabolismo de la vitamina A. El hígado contiene células parenquimatosas (hepatocitos) y células no parenquimatosas. Dentro de las no parenquimatosas se encuentran las células estrelladas perisinusoidales, las células endoteliales y las células de Kupffer. Es precisamente dentro de las células estrelladas donde los retinil-ésteres se almacenan si hay una cantidad adecuada de vitamina A. El tejido adiposo es el principal tejido extrahepático de almacenamiento de retinol, y de la movilización del mismo.

#### **Mecanismo de acción molecular del ácido retinoico**

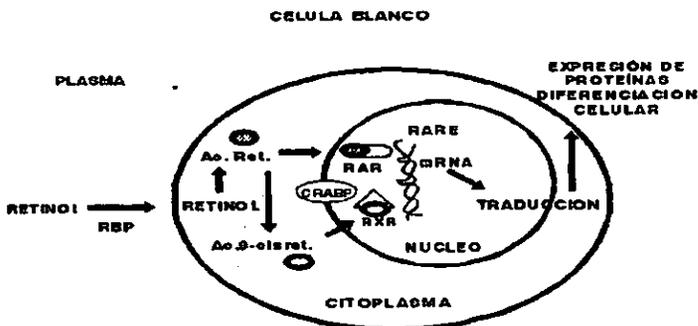
Dentro de la célula, el ácido retinoico es transportado del citoplasma al núcleo a través de proteínas celulares que unen ácido retinoico (CRBP) (Petrovich y cols.1987), que a su vez lo transportan hacia un receptor específico de alta afinidad (RAR o RXR).

La función de las CRABP es la de modular las concentraciones de ácido retinoico libre, secuestrándolo y conduciéndolo hacia los receptores (RAR) (Fiorella y Napoli, 1991).

En 1987 se aisló un DNA complementario que codificaba para una proteína receptora de ácido retinoico muy parecido a los receptores nucleares para hormonas esteroideas (Petrovich y cols. 1987). En la actualidad se encuentra bien definido que las proteínas receptoras de ácido retinoico pertenecen a la superfamilia de reguladores transcripcionales activados por ligandos, que incluyen a los receptores de esteroideas, de hormonas tiroideas y de vitamina D.

Dos familias de receptores nucleares a retinoides han sido caracterizadas (Leid y cols. 1992): receptores a ácido retinoico (RARs, tipos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y sus isoformas,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  a  $\beta 4$  y  $\gamma 1$  y  $\gamma 2$ ) los cuales son activados por ácido retinoico *all-trans* y *9-cis*; y receptores a retinoides (RXRs) (tipos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y sus isoformas) los cuales sólo son activado por ácido retinoico *9-cis*.

Al ser activados por el ligando, estos receptores, actúan como factores transcripcionales nucleares regulando la iniciación de la transcripción por unión a una secuencia de bases localizadas en la región promotora de un gen conocida como RAREs: elementos de respuesta al ácido retinoico (Haq y cols. 1991) (Fig.6).

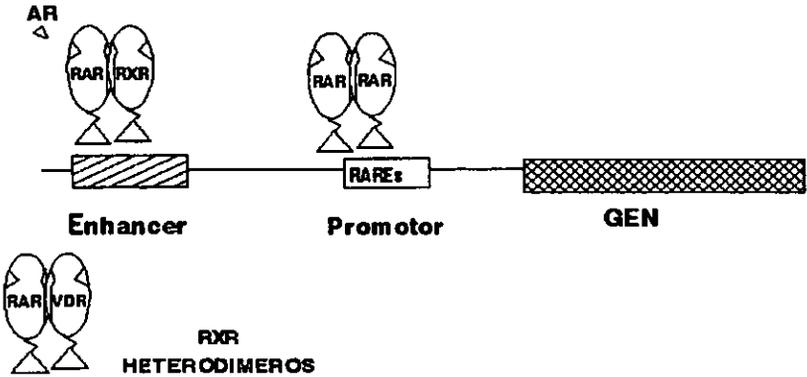


**FIG. 6 Mecanismo de acción del Acido Retinoico.**

Los elementos de respuesta a ácido retinoico (RAREs) consisten de repeticiones de una secuencia motif de genes específicos (Leid y cols. 1992), cuya transcripción es inducida por el ácido retinoico y presumiblemente altera la expresión de los genes (Chytil y Ong, 1987).

La estructura que permite la interacción entre DNA-proteína en cada receptor de ácido retinoico, es una región altamente conservada de aproximadamente 65 aminoácidos con ocho residuos de cisteína, que se unen a dos átomos de zinc para formar dos "dedos de zinc". Estos "dedos" interactúan con los RAREs de genes específicos.

La complejidad de los mecanismos de señalización por retinoides se incrementa por el hecho de que, al menos *in vitro* los receptores a ácido retinoico (RARs) se unen formando heterodímeros con receptores a retinoides (RXRs) y a su vez se unen a las secuencias de respuesta en el DNA. Sin embargo, los RXRs pueden unirse al DNA como homodímeros y también formar heterodímeros con otros receptores nucleares como TRs (receptores a hormona tiroidea), VDR (receptor a vitamina D) o PPARs (receptores a proliferadores de peroxisomas) (Mangelsdorf y Evans, 1995) (Fig 7).



**Fig.7 Elementos de respuesta al ácido retinoico (RARE's)**

## **Papel de los retinoides en el desarrollo ontogénico.**

Durante el desarrollo, la fuente natural de retinoides para el tejido embrionario es el retinol materno. (Dolle y cols.1990).

El ácido retinoico es esencial para numerosos procesos fisiológicos y de desarrollo. La privación de vitamina A durante la gestación tiene como consecuencia numerosos defectos congénitos, entre ellos están los defectos oculares, en las glándulas salivales, en la piel, en los elementos esqueléticos (Lohnes 1995), defectos en las células epiteliales de pulmón (Grummer y cols. 1994. McMenemy y Zachman, 1986). Además se produce una importante reducción de las funciones de digestión y absorción intestinales (Sinha y Grosh, 1994).

En vista de sus efectos pleiotrópicos, parece ser que el ácido retinoico es oxidado del retinol en áreas del embrión cercanas a su sitio de acción (Dolle y cols.1990). Esto también ha sugerido que la función de las proteínas citosólicas que unen retinoides es concentrar y mantener al retinol en sitios donde el ácido retinoico se requiera en altas concentraciones. La sobreexpresión de CRABPI (Pérez-Castro y cols. 1993) sugiere la importancia del retinoide en el desarrollo y diferenciación pancreática.

La existencia de varios receptores nucleares para ácido retinoico, cuya expresión puede ser espacio-temporal regulada durante el desarrollo puede ser causa de la diversidad de sus efectos. En general se ha descrito una expresión diferencial de los genes de receptores a ácido retinoico durante la embriogénesis de ratón y en tejidos de ratón adulto (Dolle y cols. 1989).

## **HIPÓTESIS**

Dado que el ácido retinoico ha demostrado tener un efecto inductor sobre la actividad y expresión del gen de la glucocinasa en la línea celular pancreática RIN-m5F, es de esperarse que este efecto se observe también sobre los islotes del páncreas y sobre los hepatocitos aislados de rata.

Dado que el gen de la glucocinasa posee dos promotores y un diferente proceso de regulación de la transcripción en el hígado y en las células beta del páncreas produciendo diferentes isoenzimas, es de esperarse que el ácido retinoico regule la transcripción de manera diferente en los dos tejidos.

## **HIPÓTESIS NULA**

Dado que ácido retinoico ha demostrado tener un efecto inductor sobre la actividad de la glucocinasa en la línea celular pancreática RIN-m5F, es de esperarse que este efecto sea inherente a la línea celular o este relacionado a su capacidad de diferenciación, y que este efecto no se observe sobre los islotes del páncreas ni sobre los hepatocitos aislados de rata.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto del ácido retinoico sobre la actividad enzimática y la expresión del gen de la glucocinasa en cultivos de islotes pancreáticos y en cultivos de hepatocitos aislados de rata.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

Conocer el efecto del ácido retinoico sobre la actividad y expresión del gen de la glucocinasa en cultivos de hepatocitos aislados de rata adulta, y de hepatocitos de aislados de rata de 15 a 18 días de nacidas, para determinar si el retinoide tiene un efecto diferenciante.

Conocer el efecto del ácido retinoico sobre la actividad y expresión del gen de la glucocinasa en cultivos de islotes pancreáticos de rata adulta, y de islotes pancreáticos de fetos de rata de 21 días de gestación, para determinar si el retinoide tiene un efecto diferenciante.

Conocer el efecto del ácido retinoico sobre la secreción de insulina y expresión del gen de la insulina en cultivos de islotes pancreáticos de rata adulta, y de islotes pancreáticos de fetos de rata de 21 días de gestación, para determinar si el retinoide tiene un efecto diferenciante.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Aislamiento de islotes de Langerhans.**

Se utilizaron ratas macho, cepa Wistar de 200-300 g de peso, alimentadas *ad libitum*, anestesiadas con pentobarbital sódico.

Los páncreas de 4 ratas adultas fueron insuflados con solución Hank's-BSA (4% disuelta en sales de Spinner), a través del conducto biliar, para poder ser escindidos (Hiriart y Ramírez, 1991). Una vez separados, los páncreas fueron colocados en un vaso de precipitados con colagenasa tipo P (Boehringer Mannheim) (3 mg por páncreas) y se fragmentaron con tijeras pequeñas durante aproximadamente 3 min. Posteriormente se colocaron en un matraz de plástico, durante 10 min, a 37°C, en un baño con agitación (Precision Scientific Modelo 25).

Una vez que los páncreas fueron digeridos con colagenasa se llevó a cabo una centrifugación a 2000 rpm, sin freno, en un gradiente de Ficoll al 27, 23, 20 y 11%. Después de la centrifugación los islotes quedaron suspendidos entre la capa de 20 y 11% de Ficoll.

Finalmente se realizó la recolección de los islotes pancreáticos bajo microscopio de disección. Los islotes fueron sembrados en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con antibiótico-antimicótico y con suero fetal de bovino al 10%. Los cultivos se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en cajas de cultivo de 60 X 15 mm, con los tratamientos correspondientes, Control: DMSO (0.01%), como vehículo, y Ácido retinoico: a concentraciones de 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-6</sup> por 3, 24 y 48 h.

### **Aislamiento de islotes fetales**

Se obtuvieron fetos de rata Wistar de 21 días de gestación. De cada feto (en promedio 8 fetos por rata) se disecó el páncreas y fue puesto en solución Hank's. Posteriormente, sobre una gasa, los páncreas se separaron de cualquier otro tipo de tejido y se colocaron en un vaso de precipitados donde fragmentaron con tijeras pequeñas durante aproximadamente 5 min hasta obtener trozos de tejido de aproximadamente 2-3 mm (German y cols. 1990). Inmediatamente

después se procedió a la digestión con colagenasa tipo D (Boehringer Mannheim) (3 mg por 10 fetos), durante 3 min, en un baño de agitación a 37°C. El tejido digerido se centrifugó dos veces a 1200 rpm durante 1 minuto y se resuspendió en medio de cultivo. Una vez obtenidos, los islotes fueron incubados a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en presencia del tratamiento con DMSO como control y ácido retinoico a concentraciones 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-6</sup> por 3, 24 y 48 h. en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con antibiótico y con suero fetal de bovino 10%.

### **Aislamiento de hepatocitos adultos.**

Los hepatocitos de rata adulta fueron obtenidos por perfusión de hígado con solución Hank's sin calcio, introduciendo una cánula a través de la vena porta en un aparato de perfusión (modificado de Berry y Friend, 1969), permitiendo que la solución circulara por aproximadamente 5 min para eliminar la mayor cantidad de sangre del hígado. Posteriormente, se cambió el flujo de solución Hank's sin calcio, por flujo de solución conteniendo colagenasa tipo H (Boehringer Mannheim) (20 mg), disuelta en solución Hank's con calcio, por aproximadamente 5 min más. El hígado fue escindido y disgregado en una caja de cultivo con medio RPMI 1640, con ayuda de un tubo cónico de 15 ml. El tejido disgregado se filtró a través de una malla de diámetro 0.5 mm y se centrifugó a 500 rpm, durante 5 min, por 3 veces, con su respectivo lavado con RPMI 1640, para eliminar los restos de células dañadas y eritrocitos.

Una vez aislados los hepatocitos se calculó el rendimiento y viabilidad por la técnica de tinción con azul de tripano. En cajas de cultivo primario (Falcon "Primaria"), las cuales tiene una matriz para facilitar la adhesión de las células, se cultivaron 5 millones de células por condición, se incubaron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con antibiótico y 10% de suero fetal de bovino a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> por 24 h, y posteriormente a éste tiempo, se añadió DMSO como control o ácido retinoico a concentraciones de 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-6</sup> durante 3, 24 y 48 h.

## **Aislamiento de hepatocitos de rata de 15 a 18 días de nacidas.**

El hígado de ratas de 15 a 18 días de nacidas se escindió directamente del animal. Los hígados fueron colocados en solución Hank's con calcio, posteriormente fueron cortados en trozos pequeños de menos de 5 mm. Estos fueron colocados en un matraz de plástico e incubados a 37° en un baño de agitación, durante 15 min, con EGTA disuelto en TD-Salino 1X (concentración final: Tris 25 mM, NaCl 137 mM, KCl 50 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4 mM) para eliminar el calcio del tejido y facilitar la disgregación celular.

Posteriormente al tejido se le agregó colagenasa tipo D (Boehringer Manneheim) (0.1%) y se incubó a 37°C, en agitación, durante otros 15 min. Inmediatamente después de la incubación, la suspensión del tejido fue filtrada a través de una malla de organdi de aproximadamente 0.5 mm de diámetro, El tejido filtrado se lavó con solución Hank's y se centrifugó durante 5 min a 1,500 rpm, 3 veces consecutivas, con lavados intercalados, para eliminar los restos de células dañadas.

Los hepatocitos aislados se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640-suero fetal de bovino 10% y antibiótico. Se calculó el rendimiento y viabilidad por el método de tinción de azul de tripán y se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> por 24 h en cajas de cultivo (Falcon "Primaria"); al finalizar este período de incubación se añadió el tratamiento correspondiente.

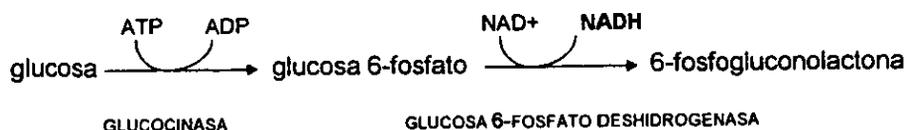
## **Determinación de la actividad de la glucocinasa**

Una vez terminado el tiempo de tratamiento respectivo, indicado en las figuras, las células fueron cosechadas y centrifugadas a 2000 rpm durante 5 min. El botón celular fue lisado con 500 µl de solución de lisis (Reporter Lysis. Promega). Para asegurar la lisis completa se sometió a un proceso de congelación-descongelación y posteriormente fue sonicado (Ultrasonic Processor) por 15 seg.

Al producto sonicado se le añadió 500 µl de solución de extracción de glucocinasa (concentraciones finales: Tris 20 mM, KCl 200 mM, MgSO<sub>4</sub> 8 mM, EDTA 10 mM y ditiotreitól 2 mM), y se ultracentrifugó a 35000 rpm durante 1 h a 4°C, con el objeto de eliminar los microsomas (específicamente la enzima glucosa 6-fosfatasa que se encuentra en ellos).

Los sobrenadantes fueron recuperados y su actividad enzimática se analizó por medio de la técnica descrita por Walker y Parry (1966).

## PRINCIPIO DE LA REACCIÓN



Los extractos celulares, los cuales contienen enzimas como la hexocinasa y glucocinasa, se analizaron en presencia de glucosa, ATP,  $\text{Mg}^{2+}$ . La formación del primer producto (glucosa 6-fosfato) es proporcional a la actividad fosforilante de hexocinasa y glucocinasa presente en el extracto. La cantidad del producto formado se determinó por su deshidrogenación en presencia de un exceso de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* (Sigma) y NAD como coenzima. La formación de  $\text{NADH} + \text{H}^+$  se midió a través de cambios en la absorbancia a 340 nm y es proporcional a la cantidad de glucosa 6-fosfato proveniente de la primera reacción.

Dado que los extractos celulares también poseen actividad fosforilante de la glucosa por la presencia de hexocinasa (baja  $K_m$  por la glucosa), la actividad de fosforilación se determinó a dos diferentes concentraciones finales de glucosa: 0.5 y 100 mM.

El cambio en la densidad óptica obtenido en la reacción con glucosa a una concentración de 0.5 mM es el que representa la actividad de la hexocinasa y el obtenido en la reacción con glucosa con la concentración final de 100 mM es el que representa la suma de ambas: hexocinasa y glucocinasa. Por ello, al restar el valor obtenido a baja glucosa del valor a alta glucosa se obtuvo el valor correspondiente a la actividad la glucocinasa.

La actividad enzimática fue estandarizada en función de la cantidad de proteína. Esta fue determinada por el método colorimétrico de Bradford (Bio-Rad), a una longitud de onda de 595 nm. El principio de este método se basa en la determinación de la cantidad de proteína por unión específica del colorante

ácido azul de Coomassie, a residuos de aminoácidos básicos y aromáticos (Bradford, 1976). El cambio producido en la actividad de la glucocinasa se expresó en porcentaje.

### **Extracción de RNA**

Al finalizar el tiempo de tratamiento, las células hepáticas o los islotes pancreáticos fueron retirados de las cajas de cultivo y centrifugados a 2,000 rpm durante 5 min. Todo el material utilizado en la extracción de RNA m fue esterilizado y tratado previamente con dietilpircarbonato (DEPC Sigma), para evitar la acción de RNAsas.

El paquete celular obtenido fue transferido a tubos Eppendorf, a los cuales se les agregó 1 ml de Trizol (Gibco BRL) por tratamiento, hasta conseguir una mezcla homogénea. Después de incubar 5 minutos a temperatura ambiente se les agregó 200 µl de cloroformo, para separar las fases donde se encuentran proteínas y los ácidos nucleicos. Se agitó en Vortex y se centrifugó a 10,000 rpm, por 15 min, a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo Eppendorf y se le agregó 500 µl de isopropanol para precipitar el RNA y se incubó a -20°C toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm, 10 min, a 4°C, se desechó el sobrenadante, se lavó el precipitado con etanol al 70%, se centrifugó a 12,000 rpm, por 5 min, a 4°C, se desechó nuevamente el sobrenadante, se dejó secar el precipitado por unos min y éste se resuspendió en agua bidestilada. Esta solución se incubó a 55°C, durante 10 min para asegurar su total solubilización. Una vez solubilizado en agua el RNA se mantuvo a -70°C hasta ser analizado.

### **Análisis de RNA**

El RNAm de la glucocinasa y de la actina se cuantificaron utilizando la técnica de amplificación de señales de bDNA (branch DNA), la cual permite determinar cantidades muy pequeñas de RNA (Fig.8) El fundamento de la técnica consiste en la amplificación de la señal del RNAm a través de sondas ramificadas conjugadas a una enzima (fosfatasa alcalina), la cual transforma su sustrato en un producto luminiscente. La amplificación de la señal luminiscente es directamente proporcional al mensaje original. Este método es altamente sensible y específico. Todos los componentes, incluyendo los amortiguadores y

los reactivos de DNA usados en esta técnica, son exclusivos de Chiron Corporation.

El RNAm de la glucocinasa se procesó como lo describe Wang y cols. (1997) para la cuantificación del preRNA y el RNAm de la insulina. Las muestras de RNA se incubaron a 63°C, en presencia de 200 µl de amortiguador de extracción [78 mM Hepes, pH 8.0; 12.5 mM EDTA, pH 8.0; 6.27 mM LiCl; 1.6% de sulfato de litio lauril; proteinasa K (1mg/ml); DNA de una sola cadena (19 µg/ml); 7.8% de formamida; 0.05% de azida de sodio; 0.05% Proclin 300], en proteinasa K y con sondas de captura específicas acopladas a placas de 96 pozos aisladas con sellador adhesivo (Microtiter Plate Sealer, Flow Laboratory) de placas, durante una noche, para capturar el RNAm de la glucocinasa y fijarlo a la superficie de los micropozos. Después de enfriar la placa por 10 min a temperatura ambiente, los pozos se lavaron 2 veces con la solución A [citrate estándar (SSC) y 0.1% de SDS]. Se añadieron 50 µl de solución de amplificación de bDNA a una concentración de 1 pmol/ml, en diluyente de amplificación [que se preparó incubando 50% de suero de caballo; 1.3% SDS; 6 mM Tris-HCl, pH 8.0; SSC 5X; proteinasa K (0.5 mg/ml), seguido de la adición de 1mM de fenil sulfonil fluoruro para inactivar la proteinasa K, 0.05% de azida de sodio y 0.05% de Proclin 300] e hibridizado a 53°C por 30 min. Después de enfriar y enjuagar como se describió anteriormente, se añadieron 50 µl de una mezcla conteniendo fosfatasa alcalina conjugada con la sonda de marca (2 pmol/ml) en diluyente de marca ( diluyente de amplificación) e hibridizado a 53°C por 15 min. Se dejó enfriar la placa y se procedió a lavar dos veces con la solución A como en el paso anterior y 3 veces con la solución B (SSC 0.1X). Finalmente, se añadió a la placa 50 µl de sustrato (Lumiphos 530) para la fosfatasa alcalina, reacción que se efectuó en 25 min a 37°C. Se determinó la emisión de luz en un luminómetro a 37°C. Cada experimento se realizó por triplicado y fue estandarizada con RNAm de actina.

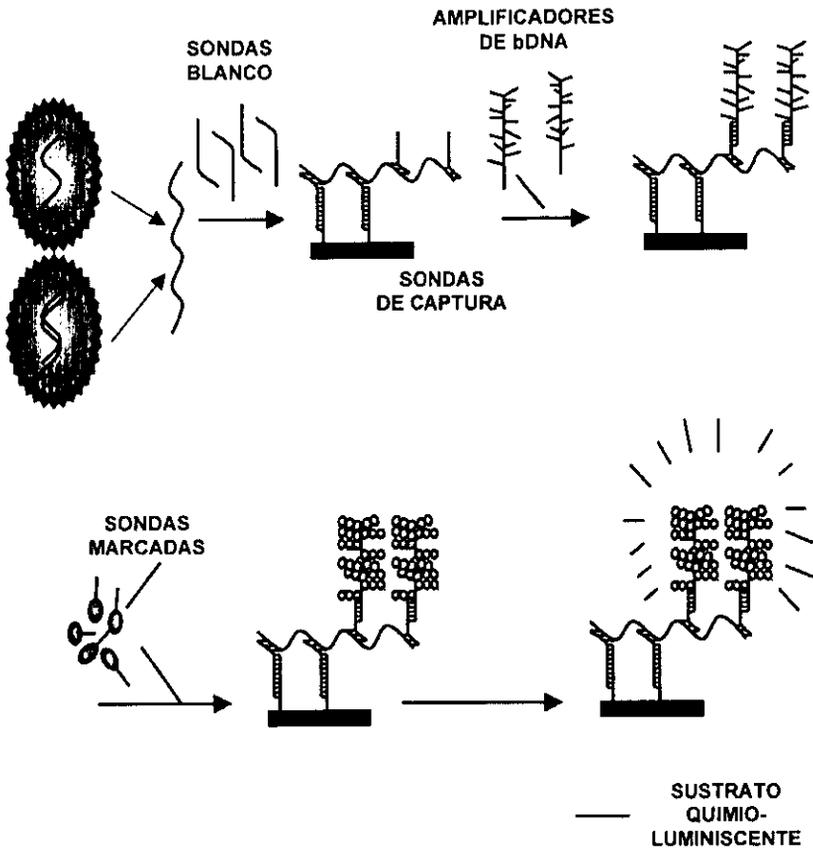


Figura 8 . Ensayo de amplificación del bDNA.

## **Construcción de plásmido**

El promotor -1000 pb de la glucocinasa pancreática de rata, otorgado por el Dr. Magnuson de la Universidad de Vanderbilt (Shelton y cols.1992), fue clonado en el vector de expresión pFOXCAT1 (German y Wang, 1994; Odagiri y cols. 1996).

## **Transfección de islotes fetales**

Los experimentos fueron realizados con base en la técnica descrita por German y cols. (1990): Los páncreas de los fetos de 21 días de gestación fueron aislados y digeridos por 5 min con colagenasa D y 2 ml de DNAasa I.

Después de 3 h de cultivo para depletarlos de fibroblastos, los islotes fueron recuperados y dispersados con tripsina 0.05% / 0.53mM de EDTA. Los islotes dispersados fueron incubados a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Después de otras 3 h de cultivo para depletar de fibroblastos, las células fueron cosechadas y lavadas con PBS (solución salina de fosfatos) dos veces a temperatura ambiente, y resuspendidas con 25 µg de plásmido purificado por el método de cloruro de cesio (Sambrook y cols. 1989) que contiene una construcción de -1000 pb del promotor de glucocinasa pancreática y el gen reportero CAT (cloranfenicol acetil-transferasa). Se colocaron en celdas especiales para electroporación y se les dió una descarga de 175 volts, 2,000 µfarads en un electroporador BTX modelo 600.

Las células transfectadas se incubaron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero fetal de bovino al 10% y con antibiótico-antimicótico y posteriormente se les añadió ácido retinoico (10<sup>-6</sup> M) o vehículo (DMSO 0.01%), por aproximadamente 48 h, antes de extraer la proteína.

## **Ensayo de CAT (Cloranfenicol acetil transferasa)**

Para llevar a cabo el ensayo de CAT (Sambrook y cols. 1989) las células transfectadas se despegaron manualmente de las cajas de cultivo con PBS, se colocaron en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 1,200 rpm, durante 2 min. El

botón celular obtenido se lisó con 150  $\mu$ l de Tris 200 mM, pH 7.5. Los extractos provenientes de la lisis se centrifugaron a 14,000 rpm, durante 15 min, para eliminar fragmentos celulares. Después de la centrifugación se midió la concentración de proteína de cada muestra. La determinación de la actividad de CAT se efectuó con 25  $\mu$ g de proteína del extracto en presencia de 20  $\mu$ l de acetil CoA (25mg/ml), 2  $\mu$ l de cloranfenicol radiactivo ( $C^{14}$  10 $\mu$ Ci) y 130  $\mu$ l de Tris (200mM). La reacción se llevó a cabo por 3h a 37°C. Al finalizar el tiempo de incubación el cloranfenicol acetilado y el no acetilado se extrajeron por adición de acetato de etilo. Las muestras se secaron en un liofilizador (Savant Instruments Inc.) durante 30 min. Una vez secas la muestras se realizó una cromatografía de capa fina (Silica Gel. Merck) para separar el sustrato y el producto. La separación se efectuó en una solución de cloroformo al 95% y de metanol al 5%. La radioactividad presente en el cloranfenicol acetilado se determinó en Phosphoimager 425 (Molecular Dynamics).

### **Transfección de células COS-1**

La transfección de esta línea celular se efectuó por el método de precipitación con cloruro de calcio (Gorman y cols. 1982).

Las células ( $6 \times 10^5$  en 5 ml) fueron sembradas en cajas de cultivo para alcanzar un 80-90% de confluencia un día antes de la transfección. Después de 24 h de haber sido sembradas, se les agregó un co-precipitado de cloruro de calcio con el plásmido (10  $\mu$ g) a introducir en la célula: pSG5 (vector vacío) o pSG5-RAR $\alpha$  (vector que contiene las secuencias codificantes para el receptor para ácido retinoico alfa). Después de 3 h de incubación, las células se sometieron a un choque con glicerol. Se restituyó el medio de cultivo y se mantuvieron durante 48 h en tratamiento, hasta que se cosecharon para el aislamiento de núcleos.

### **Aislamiento de Proteínas Nucleares**

Para el aislamiento de las proteínas nucleares y de los núcleos se siguió el protocolo básico descrito por Zerivitz y Kusjarvi (1989). Una vez que las células COS-1 transfectadas fueron tratadas durante 48 h con ácido retinoico,

éstas fueron cosechadas, lavadas en solución amortiguadora de fosfatos y centrifugadas a 1200 rpm, durante 5 min, a 4°C. Las membranas se rompieron por congelamiento en hielo seco y posteriormente se les agregó buffer A (10 mM) Hepes a pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 1 mM de DTT), se dejó reposar por aproximadamente 2 min. Los núcleos fueron aislados por centrifugación a 3,500 rpm, durante 10 min, a 4°C. Después de esto se valoró el estado de integridad los núcleos con azul de tripán.

Las proteínas nucleares se extrajeron en el buffer C (20mM Hepes pH 7.9, 0.4 M de NaCl, 25% de glicerol, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de EDTA, 1 mM de DTT y 0.5mM de PMSF), y fueron incubadas a 4°C, durante 30 min, con agitación muy lenta. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm, por 20 min, a 4°C y el sobrenadante fue mezclado 1:1 con el buffer D (20% de glicerol, 20 mM de Hepes, pH 7.9, 50 mM de KCl, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF).

La concentración de proteína se determinó por medio del ensayo de Bradford. Las alícuotas de los extractos nucleares se congelaron en hielo seco-etanol y se almacenaron a -80°C, hasta antes de ser utilizadas.

### **Ensayo de geles de retardo (Gel Shift Assay (EMSA))**

Se mandaron sintetizar oligonucleótidos complementarios, sentido y antisentido, que contienen la secuencia del promotor de la glucocinasa pancreática -196 a -154 al cual se denominó GKRARE, y otro que contiene la secuencia del receptor humano  $\beta$  para el ácido retinoico, al cual se denominó RARE. A continuación se mencionan las secuencias.

**GKRARE1**

5'GATCCAGTCACTGCAGTGACAGGGTGACAGAGTGGTCACCATGGTGAC

**GKRARE2**

5'GATCGTCACCATGGTGACCACTCTGTCACCCTGTCAGTGCAGTGACTG

**RARE 1**

5'GATCGGGTAGGGTTCACCGAAAGTTCAGTTCG

**RARE 2**

5'GATCCGAGTGAACCTTTCGGTGAACCCTACCC

Estos nucleótidos se hibridaron mezclando en una concentración igual de oligo sentido y oligo antisentido de cada uno, y calentando a 90° C, durante 5 min, dejando posteriormente que alcanzaran una temperatura ambiente. Esas dobles cadenas de GKRARE y RARE fueron marcadas radioactivamente con  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP con la polinucleótido kinasa T4. Posteriormente fueron incubados con 4  $\mu$ g del extracto de proteínas nucleares en un buffer de unión (0.01 mg/ml poly dI-dC, 10 mM Hepes, 40 mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM DDT, 0.5mM EDTA, 4% glicerol), en un volumen de reacción de 20  $\mu$ l.

Cada una de las muestras fue incubada por 20 min a temperatura ambiente y posteriormente se corrieron en un gel de acrilamida con TBE 5X a 150 volts durante aproximadamente 2 h. En el caso de utilizar competidor, se mezcló con el extracto en una proporción 50X y se preincubó durante 10 min, antes de agregar la sonda.

### **Secreción de insulina**

Se obtuvieron los islotes por el método descrito con anterioridad en este trabajo. Se colocaron 50 islotes por tratamiento en cajas multipozo en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino, con el tratamiento correspondiente durante 24 h.

Una vez completado el tiempo de incubación el medio fue retirado y los islotes fueron lavados con solución de secreción (NaCl 115 mM, KCl 5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 24 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.2 mM, MgCl<sub>2</sub>, Hepes 10 mM, BSA 0.17%). Una vez lavados, se incubaron durante 60 min a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en nueva solución de secreción a pH 7.4, con diferentes concentraciones de glucosa (5.5 mM y 16 mM). Transcurrido este tiempo se tomó una alícuota de la solución de cada condición y se congeló hasta ser analizada la insulina secretada por los islotes.

### **Análisis de la secreción de insulina**

La insulina secretada en la solución de secreción fue cuantificada por el método de RIA (radioinmunoanálisis), que está basada en la técnica del doble anticuerpo (ICN Biomedical, CA).

Esta técnica consiste en colocar la muestra problema en presencia de anticuerpo anti-insulina, y después se añadió insulina marcada radioactivamente

(<sup>125</sup>I). Esta mezcla se incubó durante una hora a 37°C. En este paso existe una competencia entre los dos tipos de insulina por el anticuerpo agregado.

El paso siguiente fue agregar el segundo anticuerpo contra el primero para precipitar el complejo formado y se incubó toda la noche a temperatura ambiente, luego se centrifuga la mezcla a 3,500 rpm durante 15 min, se elimina el sobrenadante y el precipitado se leyó en un contador de centelleo de rayos beta. De esta manera, se obtuvo que la cantidad de insulina problema es inversamente proporcional a la insulina marcada (datos que se obtienen en el contador de centelleo). Estos datos se intrapolaron en una curva de concentraciones de insulina marcada.

### **Estadística.**

Los datos presentados son porcentaje medio  $\pm$  error estandar. El nivel de significancia fue determinado por el método de t-de Student para las mediciones de 2 parámetros, para las mediciones múltiples se utilizó el método de ANOVA. El nivel de significancia escogido fue de  $p \leq 0.05$ .

## RESULTADOS

### PANCREAS

#### **Efecto del ácido retinoico sobre la actividad de la glucocinasa en islotes de rata adulta.**

Se analizó el efecto de ácido retinoico sobre la actividad de la glucocinasa en islotes aislados de páncreas de rata adulta. Como muestra la Tabla 3, existe un efecto dosis-respuesta en la actividad de esta enzima estimulada por ácido retinoico a las 24 h de tratamiento, siendo la mayor estimulación en la dosis de  $10^{-6}$  M; el efecto se observa desde la concentración más baja utilizada ( $10^{-8}$  M).

El análisis temporal de la estimulación por ácido retinoico sobre la actividad de la glucocinasa (Gráfica 1A) demostró que dosis de retinoide de  $10^{-6}$  M incrementa la actividad de la enzima en un  $103 \pm 6.4\%$  a las 24 h de tratamiento, el efecto estimulante es sostenido a las 48 h de incubación, donde se observa un aumento de  $84 \pm 4.1\%$ .

#### **Efecto del ácido retinoico sobre la actividad de la glucocinasa en islotes pancreáticos fetales.**

Se ha reportado que el ácido retinoico promueve la maduración del islote fetal y la secreción de insulina en respuesta a glucosa (Tuch y cols. 1990), en este trabajo se investigó si el efecto del ácido retinoico sobre la glucocinasa es modificado por el grado de diferenciación del tejido.

Como se muestra en la Tabla 3, los islotes pancreáticos de ratas de 21 días de gestación respondieron de manera positiva a diferentes dosis de ácido retinoico a las 24 h de tratamiento.

Se realizó el estudio temporal de esta estimulación en la actividad e la glucocinasa a las 24 y 48 h de tratamiento con una concentración de  $10^{-6}$  M de ácido retinoico. Como se muestra en la Gráfica 1B, existe un aumento en la actividad de la glucocinasa de  $196.6 \pm 13.7\%$  a las 24 h posteriores al tratamiento. Un efecto de estimulación menor se observa a las 48 h de tratamiento ( $44.2 \pm 3.7\%$ ).

### **Efecto del ácido retinoico sobre los niveles RNAm de la glucocinasa.**

Se determinó si el efecto del ácido retinoico está relacionado con un incremento en la expresión del gen de la glucocinasa. Dado que los niveles del RNAm de esta enzima son muy bajos, se adaptó la técnica de bDNA la cual es una técnica de amplificación muy sensible para la detección de niveles de RNAm.

Se encontró que existe un aumento relativo de RNAm de glucocinasa en islotes de rata adulta de  $51.8 \pm 13.3\%$  y  $62.8 \pm 16.1\%$  a las 12 y a las 24 h de tratamiento con el retinoide a dosis de  $10^{-6}$  M (Gráfica 2A). En lo que respecta a los islotes fetales el aumento en el RNAm de glucocinasa fue de  $55 \pm 14\%$  y  $107 \pm 30\%$  a las 12 y a las 24 h de tratamiento, respectivamente (Gráfica 2B).

### **Efecto del ácido retinoico sobre la actividad del promotor de la glucocinasa.**

Con el fin de determinar el mecanismo por el cual el ácido retinoico aumenta los niveles de RNAm se procedió a determinar si este efecto está mediado por la estimulación en la actividad del promotor de la glucocinasa. Para ello se transfectaron islotes fetales con una construcción que contiene 1000 kb del promotor de la glucocinasa, en un vector de expresión al cual va unido el gen reportero CAT (cloranfenicol acetil-transferasa).

Como se muestra en la Gráfica 3, se observó un aumento de  $57\% \pm 24\%$  a las 48 h de tratamiento con ácido retinoico  $10^{-6}$  M en la actividad del promotor de la glucocinasa medido a través de la actividad de CAT (Gráfica 3). No se observó efecto en el vector vacío pFOX-CAT1 (Control como 100 % y ácido retinóico  $95 \pm 9.3\%$ ).

### **Geles de retardo (EMSA: Electrophoretic mobility shift assay).**

Nuestro análisis de la secuencia del promotor de la glucocinasa pancreática demostró que dentro de la región -196 a -154 existen cinco secuencias similares al sitio consenso AGGTCA, conocido por mediar el efecto transcripcional del ácido retinóico (Fig. 9).

Sitio consenso.....A(G) GT(G)TCA  
 Receptor a ácido retinoico beta.....GGTTCACCGAAAGTTCA  
 Alcohol deshidrogenasa III.....GGGTCATTGAGTTCA  
 Gen H complemento.....AGGTCACTGACAGGGCA  
 Hormona de crecimiento en rata.....AGGTAAGATCAGGGACGTGACCG  
 Insulina humana.....AGGTCCCAGGTCATGCCCT

**Glucocinasa Pancreática -196 a -154**

**CAGTCACTGCAGTGACAGGGTGACAGAGTGGTCCATGGTGA**

**Figura 9. Análisis de la secuencia del promotor de la glucocinasa pancreática**

Para determinar si la región -196 a -154 del promotor de la glucocinasa es capaz de unirse al receptor nuclear de ácido retinoico, se diseñaron una serie de experimentos de geles de retardo para observar la formación de complejos con este receptor.

La fuente de receptores de ácido retinoico provino de extractos nucleares de células COS-1 transfectadas con vector pSG5 conteniendo las secuencias del receptor para ácido retinoico  $\alpha$ , o con el vector pSG5 vacío. Estos extractos fueron incubados en presencia de las sondas marcadas radioactivamente GKRARE (secuencia -196 a -154 del gen de la glucocinasa). Como control positivo se utilizó a la sonda RARE cuya secuencia es conocida por su capacidad de unirse con el receptor al ácido retinoico.

Como se observa en la figura 10, no existe formación de complejo en los carriles 1 y 2 que contienen los extractos nucleares de las células que fueron transfectadas con el vector vacío incubados en presencia de las sondas RARE y GKRARE, respectivamente. En los carriles 3 y 4 donde los extractos se incubaron en presencia de la secuencia RARE (carril 3) y donde los extractos se incubaron en presencia de la secuencia diseñada GKRARE (carril 4) se observa formación de complejo señalado con una flecha; los extractos nucleares de las células que fueron transfectadas con el vector que contiene la secuencia para el

receptor de ácido retinoico  $\alpha$ . La especificidad de este complejo fue demostrada por competencia (carril 5), incubando los extractos nucleares que contiene la secuencia para el receptor  $\alpha$  en presencia de un exceso de GKRARE no marcado y posteriormente en presencia de la secuencia RARE marcada. En los carriles 6 y 7 se demuestra que existe inestabilidad en la formación del complejo en presencia del anticuerpo para el receptor de ácido retinoico  $\alpha$ . Los extractos se incubaron en presencia del anticuerpo y posteriormente en presencia de las sondas marcadas (RARE y GKRARE, respectivamente).

### **Efecto del ácido retinoico sobre la secreción de insulina y los niveles de RNAm de insulina.**

Dado que la actividad de la glucocinasa es determinante en la secreción de insulina (Meglasson y Matschinsky, 1996), es de esperarse que un aumento en la actividad de la enzima se refleje en la secreción de insulina. Por lo anterior se analizó también el efecto del ácido retinoico sobre la secreción de insulina en los islotes pancreáticos.

Como puede observarse en la Gráfica 4, a las 24 h de tratamiento con el retinoide a una concentración de  $10^{-6}$  M, se incrementa la liberación de insulina tanto en islotes adultos como en islotes fetales. En los primeros (Gráfica 4A), el ácido retinoico aumenta la secreción en un  $139.1 \pm 39$  y  $111.8 \pm 38$  % a 5.5 y 16 mM de glucosa, respectivamente.

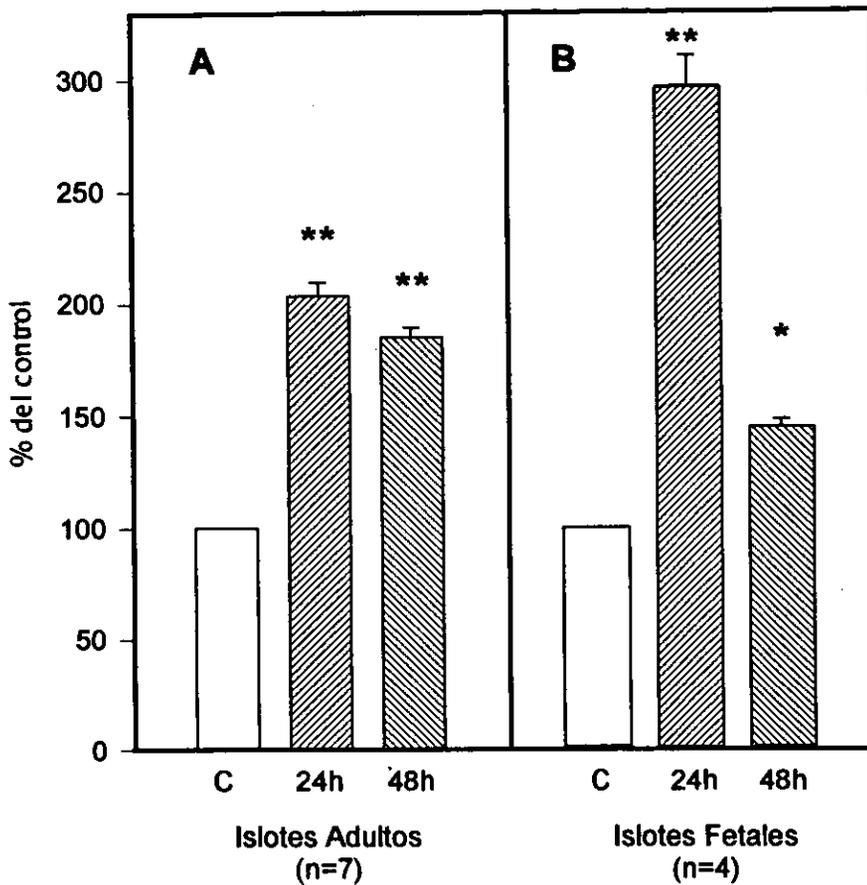
En los islotes fetales (Gráfica 4B), los cuales tiene una pobre secreción de insulina en respuesta a glucosa, el tratamiento con ácido retinoico se observa un modesto incremento en la secreción de  $33.1 \pm 7$  y  $29.2 \pm 7$  a 5.5 y 16 mM de glucosa respectivamente.

También se determinó el efecto del tratamiento con ácido retinoico sobre los niveles de RNAm de insulina por el método de bDNA, y se observó que a las 24 h de tratamiento el mensaje de insulina aumenta en un  $48.2 \pm 9.1$  % en el islote adulto (Gráfica 5A) y un  $79.7 \pm 20$  % en el islote fetal (Gráfica 5B).

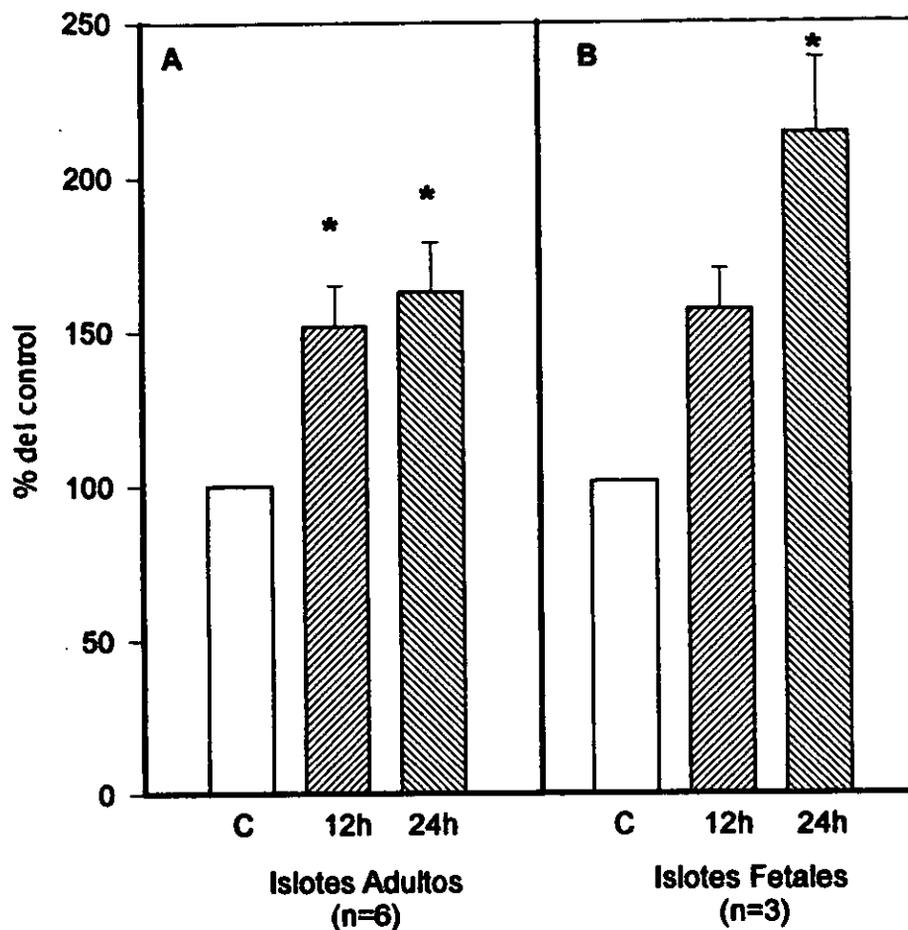
**TABLA 3. EFECTO DE DIFERENTES DOSIS DE ACIDO RETINOICO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOCINASA EN ISLOTES PANCREÁTICOS DE RATA ADULTA E ISLOTES FETALES.**

<u>Islotes de rata Adulta</u>			<u>Islotes Fetales</u>		
Dosis (M)	Porcentaje de Actividad (n=3)	Significancia (P)	Dosis (M)	Porcentaje de Actividad (n=3)	Significancia (P)
Control	100%		Control	100%	
10 <sup>-8</sup>	124.2±2%		10 <sup>-8</sup>	134.1±12.2%	
10 <sup>-7</sup>	149.7±3%	<0.05	10 <sup>-7</sup>	157.4±10.7%	<0.05
10 <sup>-6</sup>	203.2±6.4%	<0.05	10 <sup>-6</sup>	289.9±30.9%	<0.05

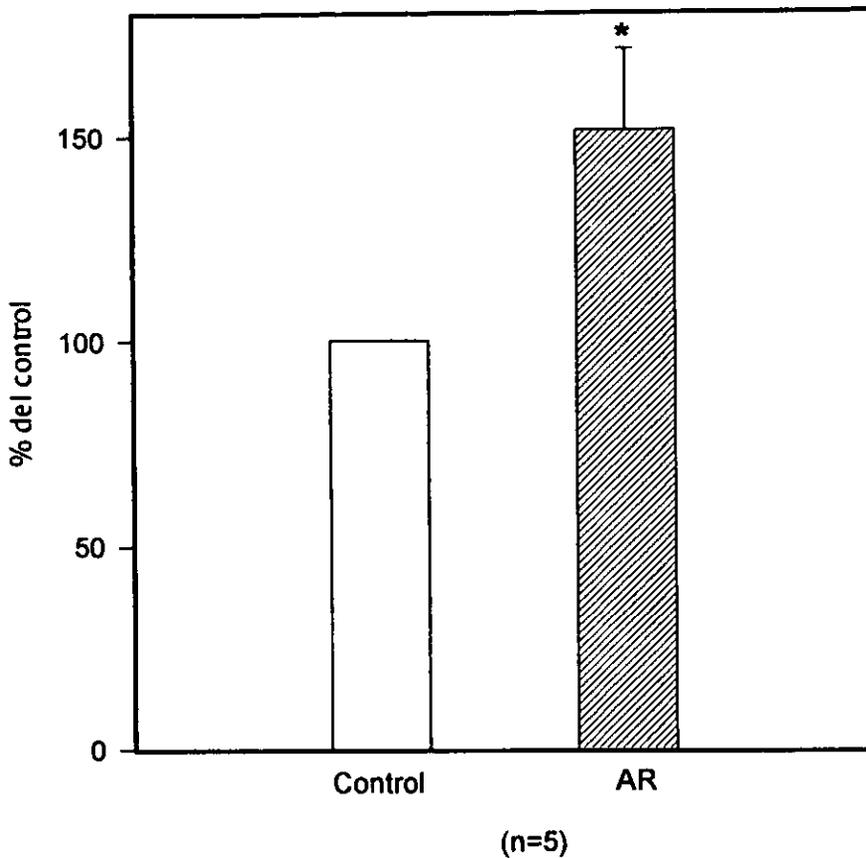
Los islotes fueron cultivados en presencia diferentes dosis de ácido retinoico o de vehículo (DMSO 0.01%) por 24 h. Una vez concluido el tiempo de tratamiento se determinó la actividad de la glucocinasa. Los datos son expresados como media ± error estandar.



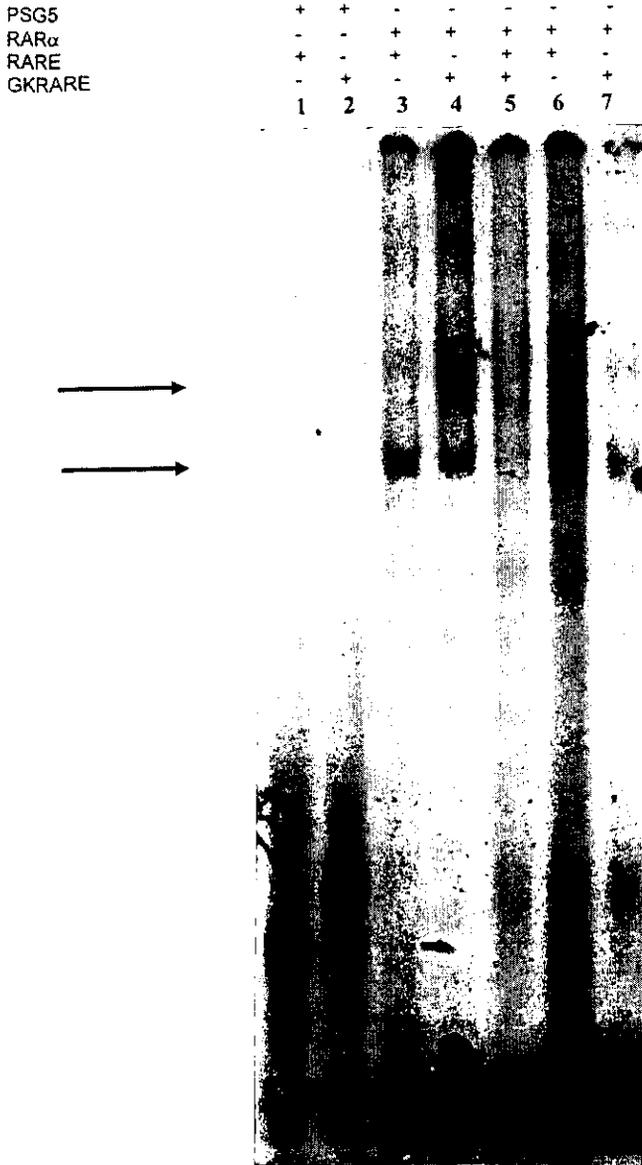
**Gráfica 1. Curso temporal del efecto del ácido retinoico sobre la actividad de la glucocinasa pancreática.** Los isletos pancreáticos fueron cultivados durante 24 y 48 h en presencia de una concentración de  $10^{-6}$  M de ácido retinoico o de vehículo (DMSO 0.01%). La actividad de la glucocinasa fue determinada. Los datos son expresados como porcentaje promedio  $\pm$  error estándar. \*\*\* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .



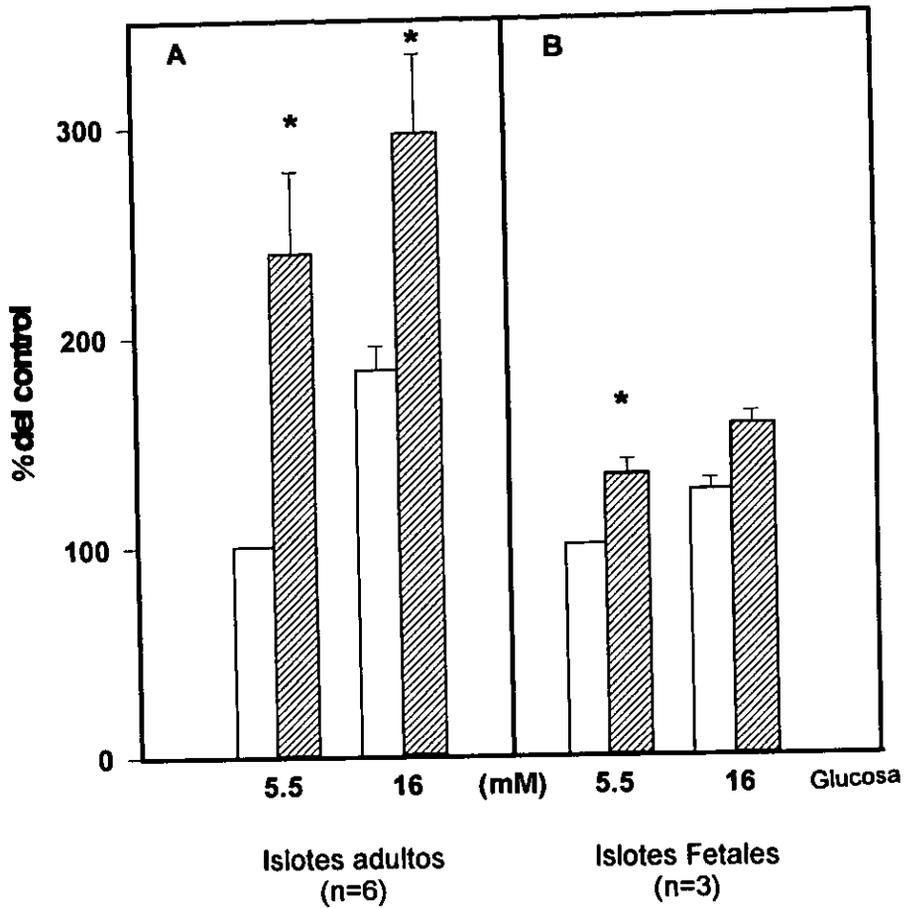
**Gráfica 2. Curso temporal del efecto del ácido retinoico sobre el nivel de RNAm de la glucocinasa pancreática.** Los isletos pancreáticos fueron cultivados durante diferentes tiempos en presencia de una concentración de  $10^{-6}$  M de ácido retinoico o de vehículo (DMSO 0.01%). Cada muestra fue estandarizada por actina. Los niveles de RNAm fueron determinados a las 12 y 24 h de tratamiento. Los datos son expresados como porcentaje promedio  $\pm$  error estándar \*  $p \leq 0.05$ .



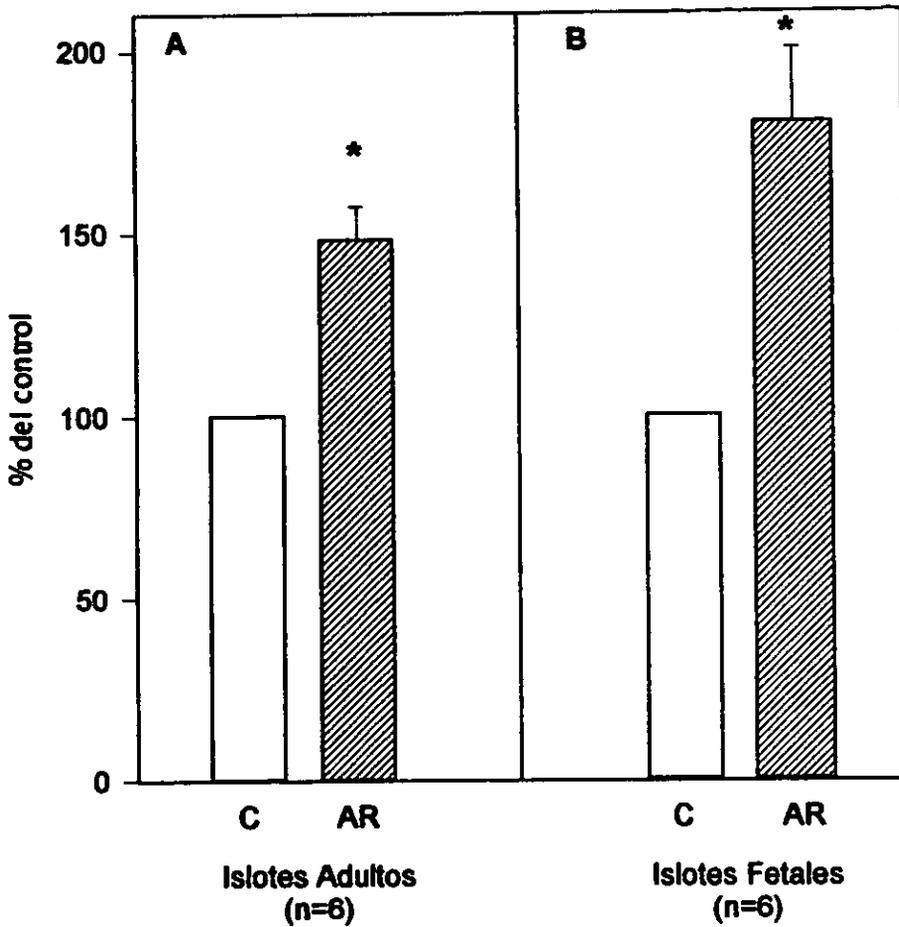
**Gráfica 3. Efecto del ácido retinoico sobre la actividad del promotor de la glucocinasa pancreática.** Los islotes pancreáticos fetales fueron transfectados por electroporación con el plásmido pFOXCAT1 que contiene el promotor  $-1000 \pm 14$  pb de la glucocinasa pancreática de rata. Las células fueron cultivadas en presencia de una concentración de  $10^{-6}$  M de ácido retinoico o vehículo (DMSO 0.01%) por 48 h. La actividad del promotor fue detectada por el ensayo de CAT (cloranfenicol acetil transferasa). Cada valor representa el porcentaje promedio  $\pm$  error estándar. \*  $p \leq 0.005$



**FIG. 9** Ensayo de gel de retardo realizado con la sonda diseñada GKRARE del promotor de la glucocinasa pancreática. Las flechas indican el sitio donde se ubica el complejo formado. Carril 1: incubación de los extractos nucleares transfectados con el vector vacío (pSG5) en presencia de la sonda RARE. Carril 2: incubación de los extractos nucleares transfectados con el vector vacío (pSG5) en presencia de la sonda GKRARE. Carril 3: incubación de los extractos nucleares transfectados con RAR $\alpha$  (receptor  $\alpha$  para ácido retinoico) en presencia de la sonda RARE. Carril 4: incubación de los extractos nucleares transfectados con RAR $\alpha$  en presencia de la sonda GKRARE. Carril 5: competencia, donde se muestra la incubación de los extractos en presencia de la sonda GKRARE no marcada y posteriormente la incubación en presencia de la sonda RARE marcada. Carriles 6 y 7: supershift, donde se muestra la incubación de los extractos nucleares en presencia de anticuerpo específico para el receptor  $\alpha$  de ácido retinoico y la sonda RARE y GKRARE respectivamente.



**Gráfica 4. Efecto del ácido retinoico sobre la secreción de insulina.** Los islotos fueron cultivados en presencia de una concentración de  $10^{-6}$  M de ácido retinoico (barras sombreadas) o de vehículo (DMSO 0.01%) (barras en blanco). Después de 24 h de tratamiento fueron incubados en buffer de secreción con diferentes concentraciones de glucosa. La cantidad de insulina secretada al medio fue analizada por radio inmuno análisis. Los datos son expresados como porcentaje promedio  $\pm$  error estándar. \*  $p \leq 0.05$



**Gráfica 5. Efecto del ácido retinoico sobre los niveles de RNAm de insulina.** Los islotes fueron cultivados en presencia de una concentración de  $10^{-6}$  M de ácido retinoico o de vehículo (DMSO 0.01%). Después de 24 h de tratamiento se procedió a la extracción de RNA. La determinación de los niveles de RNAm de la glucocinasa se llevo a cabo por la técnica de bDNA. Cada muestra fue estandarizada por actina. Los datos son expresados como porcentaje promedio  $\pm$  error estándar. \*  $p \leq 0.05$

## HIGADO

### **Efecto del ácido retinoico sobre la actividad de la glucocinasa en hepatocitos aislados de rata de 15 a 18 días de nacidas.**

Se analizó el efecto de diferentes dosis de ácido retinoico sobre hepatocitos de ratas de entre 15 y 18 días de nacimiento, edad en la que la expresión del gen de la glucocinasa puede ser detectada en nuestra colonia de ratas. Los resultados obtenidos se muestran en la Gráfica 6, en la cual se observa que a las 48 h de incubación con ácido retinoico, la actividad de la glucocinasa se ve incrementada de manera dosis dependiente y de manera significativa en todas las dosis utilizadas ( $10^{-8}$  a  $10^{-6}$  M).

La insulina, conocida como un estimulador de la actividad de la glucocinasa hepática, fue utilizada como control positivo en nuestros experimentos. La insulina produjo un aumento de  $81.9 \pm 19.5$  %,  $108.9 \pm 18.9$  % y  $60.8 \pm 2$  % en la actividad de la glucocinasa a las 3, 24 y 48 h respectivamente. Los incrementos son muy similares a los obtenidos con el tratamiento con el ácido retinoico.

Dado que se utilizó dexametasona para facilitar la adhesión de las células a las cajas de cultivo (Tanaka y cols. 1978), se investigó también si el efecto del ácido retinoico era dependiente de un efecto permisivo de la dexametasona. Como puede observarse en el la Gráfica 7, el tratamiento con el glucocorticoide no afectó, ni la actividad basal, ni la actividad inducida con ácido retinoico de la glucocinasa.

En hepatocitos de rata de 15 a 18 días de nacimiento se determinó también el curso temporal del efecto del retinoide sobre la glucocinasa (Gráfica 8A) y se observó una rápida inducción de la actividad de la glucocinasa después de 3 h de incubación con el retinoide a una concentración de  $10^{-6}$  M. La actividad de la glucocinasa aumento  $68 \pm 12.6$  % ( $n=8$ ). Este efecto estimulador también se observó después de 24 h de tratamiento ( $53.9 \pm 4.3$   $n=9$ ) y se mantuvo hasta las 48 h ( $44.4 \pm 3.2$  %,  $n=6$ , dato no mostrado en Gráfica).

Se investigó si el efecto de la insulina era potenciado con el ácido retinoico y como se muestra en la Gráfica 9A existe un aumento en la actividad de la glucocinasa en presencia de ambos, (insulina  $10^{-7}$  M + ácido retinoico  $10^{-6}$  M). Sin embargo, este efecto no es potenciado ni es aditivo.

### **Efecto del ácido retinoico sobre la actividad de la glucocinasa en hepatocitos aislados de hígado de rata adulta.**

Se analizó también el efecto de ácido retinoico sobre la actividad de la glucocinasa en hepatocitos adultos para descartar la posibilidad de que el efecto del retinoide sobre los hepatocitos inmaduros estuviera relacionado a un efecto diferenciante del retinoide.

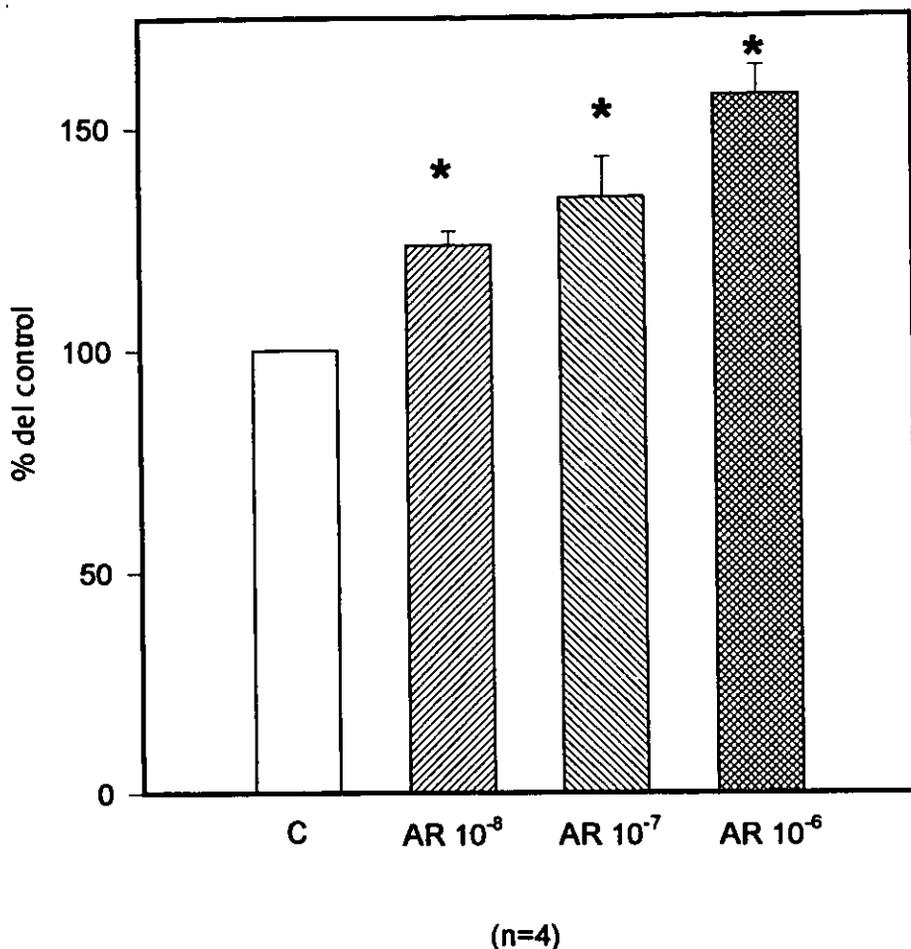
En la Gráfica 8B se muestra que existe un rápido aumento en la actividad de la glucocinasa en los hepatocitos tratados con ácido retinoico desde las 3 h de tratamiento ( $116.5 \pm 22 \%$ ,  $n=5$ ), efecto que se mantiene hasta las 24 h de tratamiento ( $83.3 \pm 22.5 \%$ ,  $n=5$ ). Sin embargo, después de 48 h de tratamiento, ya no es detectable este aumento en la actividad de la enzima (dato no mostrado).

En todos los experimentos realizados fue utilizado como control positivo la insulina. La insulina produce un aumento sobre la actividad de la glucocinasa de  $136.7 \pm 18.2 \%$  a las 3 h y  $132.1 \pm 24.3 \%$  a las 24 h.

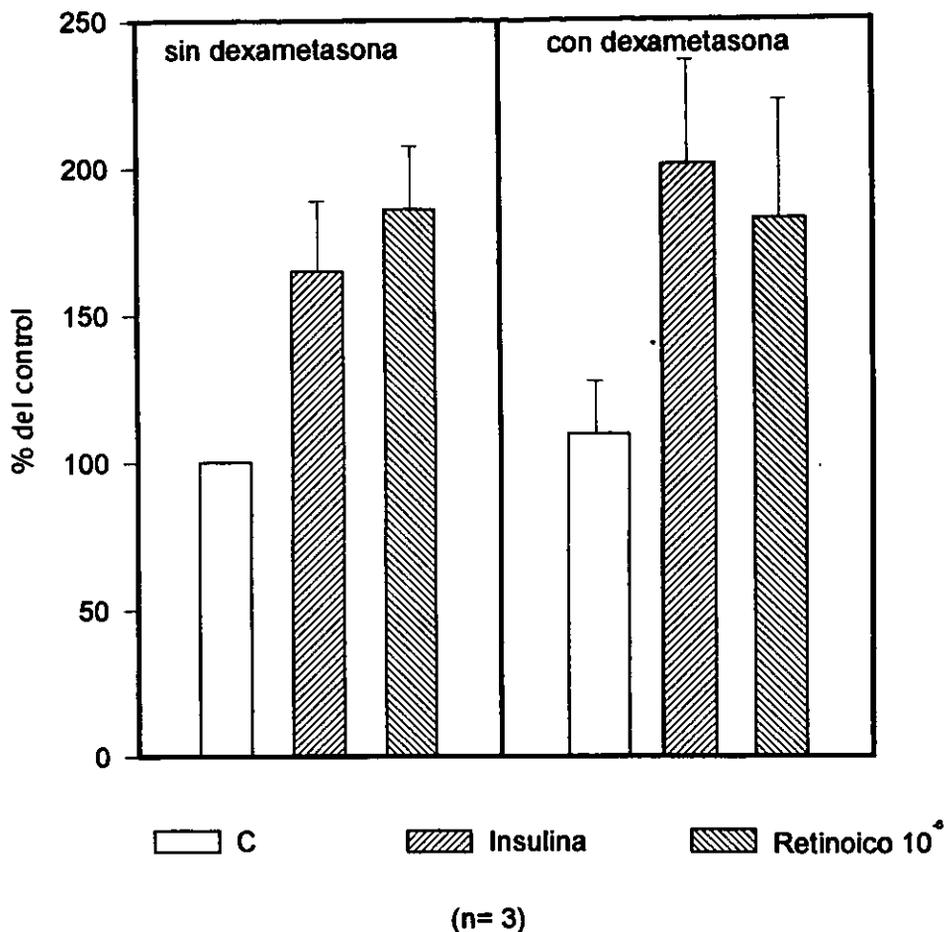
No se observa un efecto aditivo del ácido retinoico sobre el aumento de la actividad de la glucocinasa en presencia de insulina en hepatocitos adultos (Gráfica 9B)

### **Efecto del ácido retinoico sobre los niveles RNAm de la glucocinasa.**

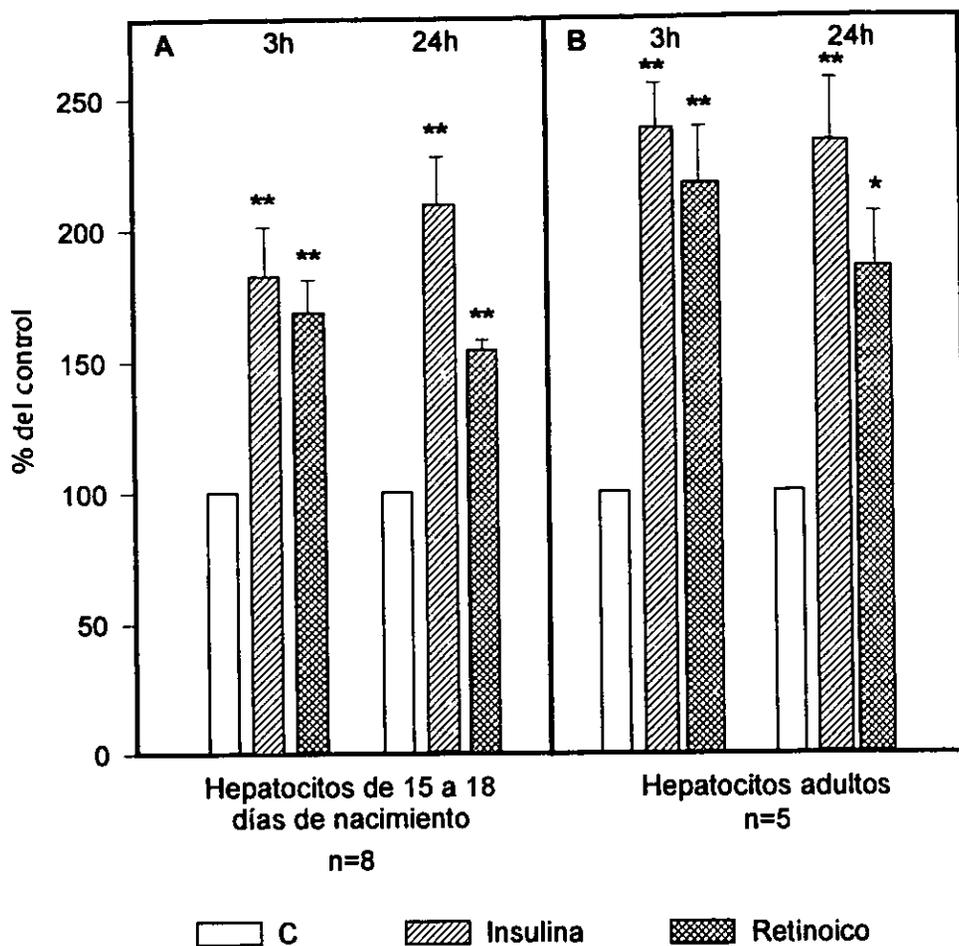
Al investigar si el efecto del ácido retinoico está relacionado con un aumento en los niveles de RNAm de la glucocinasa, se encontró que existe un aumento relativo de  $78 \pm 13.8\%$  y  $66.7 \pm 14.6\%$  a las 3 y 24 h, respectivamente, después del tratamiento con el retinoide (Gráfica 10 A) en hepatocitos de rata de 15 a 18 días de nacidas y también se observó un aumento de  $62.8 \pm 20.7\%$  y  $85.7 \pm 3\%$  a las 3 y 24 h, respectivamente, después del tratamiento con el retinoide (Gráfica 10 B) en hepatocitos de rata adulta.



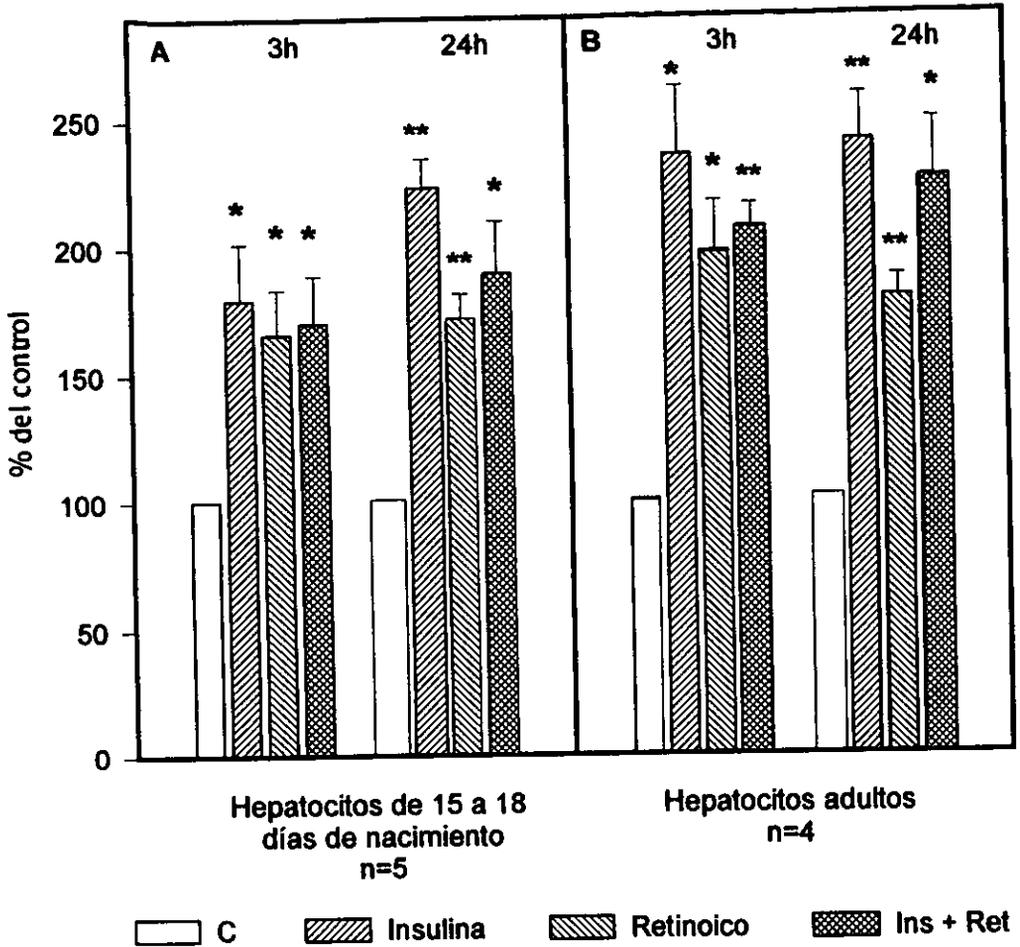
**Gráfica 6. Efecto de diferentes dosis de ácido retinoico sobre la actividad de la glucocinasa en hepatocitos de ratas de 15 a 18 días de nacimiento.** Los hepatocitos fueron cultivados durante 24 h. Una vez concluido este tiempo, se añadió ácido retinoico a diferentes dosis o vehículo (DMSO 0.01%). El efecto sobre de la actividad de la isoenzima se analizó a las 48 h de tratamiento. Los datos son expresados como porcentaje promedio  $\pm$  error estándar. \*  $p \leq 0.05$



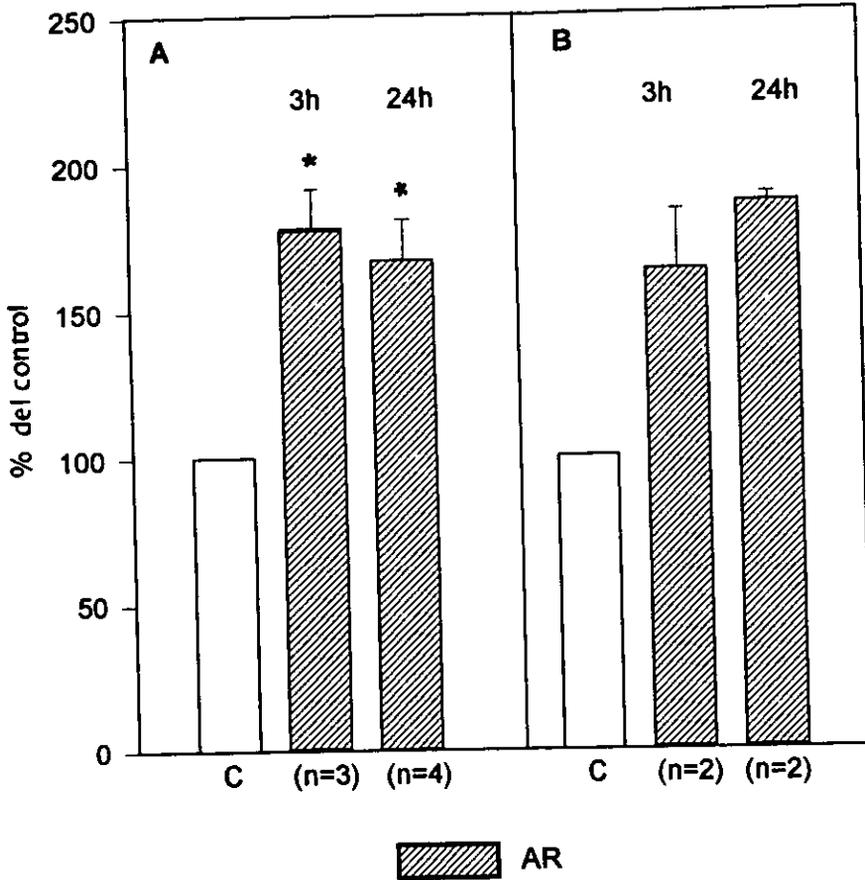
**Gráfica 7. Efecto del ácido retinoico sobre la actividad de la glucocinasa en hepatocitos de ratas de 15 a 18 días de nacimiento en presencia o ausencia de dexametasona. Los hepatocitos fueron cultivados durante 24 h. Una vez concluido este tiempo se trataron con ácido retinoico 10<sup>-6</sup> M, vehículo (DMSO 0.01%) o insulina como control positivo. El efecto sobre de la actividad de la isoenzima se analizó a las 48 h de tratamiento. Los datos son expresados como porcentaje promedio ± error estándar. \* p≤0.05.**



**Gráfica 8. Curso temporal del efecto del ácido retinoico sobre la actividad de la glucocinasa hepática.** Los hepatocitos de rata de 15 a 18 días de nacidas fueron cultivados en presencia de DMSO, ácido retinoico o insulina. La actividad de la isoenzima fue analizada a las 3 y 24 h de tratamiento. Los datos son expresados como porcentaje promedio  $\pm$  error estándar. \*\*  $p \leq 0.005$ . \*  $p \leq 0.05$



**Gráfica 9. Análisis del efecto del ácido retinoico sobre la inducción por insulina de la glucocinasa hepática.** Los hepatocitos de rata de 15 a 18 días de nacidas fueron cultivados en presencia de los tratamientos indicados en la gráfica. La actividad de la isoenzima fue analizada a las 3 y 24 h de tratamiento. Los datos son expresados como porcentaje promedio  $\pm$  error estándar. \*\*  $p < 0.005$ . \*  $p < 0.05$



**Gráfica 10. Efecto del ácido retinoico sobre los niveles de RNAm de la glucocinasa en hepatocitos.** Los hepatocitos fueron cultivados a 3 y 24 h en presencia de ácido retinoico  $10^{-6}$  M o vehículo (DMSO 0.01%). El RNAm fue analizado por la técnica de bDNA. . A) Hepatocitos de ratas de 15 a 18 días de nacidas. B) Hepatocitos de rata adulta. Los datos son expresados como porcentaje promedio  $\pm$  error estándar. \*  $p \leq 0.05$

## Resumen de los resultados

- Estos estudios demuestran que el ácido retinoico, metabolito activo de la vitamina A, es capaz de estimular la actividad enzimática de la glucocinasa tanto en el hígado como en el páncreas tanto en distintos estadios de diferenciación.
- La magnitud del efecto del ácido retinoico sobre la actividad y expresión de la isoenzima pancreática varía, dependiendo del estadio de diferenciación del tejido, siendo mayor el efecto en el tejido "inmaduro" que en el que en el tejido adulto. La magnitud del efecto del ácido retinoico sobre la actividad de la isoenzima hepática es independiente de la diferenciación del tejido observándose una estimulación similar en ambos tejidos.
- El efecto del ácido retinoico sobre la glucocinasa hepática y pancreática se produce a concentraciones fisiológicas en el rango de la  $K_d$  de los receptores del ácido retinoico.
- El ácido retinoico ejerce un papel regulador en la expresión genética de la isoenzima en el páncreas a través de su promotor.
- Existen secuencias en el promotor de la isoenzima pancreática que contienen secuencias consenso potenciales de interacción hormona-receptor.
- La secreción de insulina es afectada de manera positiva por el tratamiento con ácido retinoico, este efecto es mayor en los islotes adultos que en los islotes fetales.
- El ácido retinoico también incrementa los niveles de RNAm de la insulina, tanto en islotes inmaduros como en islotes maduros, siendo mayor en los últimos.
- El conocido efecto estimulador de la insulina sobre la actividad de la isoenzima hepática no es modificado por la presencia del ácido retinoico.

## Discusión

Los resultados de esta tesis demuestran que el ácido retinoico es capaz de estimular la actividad de la glucocinasa, tanto en el hígado como en los islotes pancreáticos a través de un aumento en la expresión del gen.

En este estudio también se demostró que el efecto del ácido retinoico sobre la glucocinasa pancreática se debe a un aumento de la actividad del promotor, y se identificó un elemento múltiple de respuesta (RARE) que es capaz de unirse al receptor de ácido retinoico. Por el contrario, en el promotor hepático no se encontró ninguna secuencia RARE que sugiera mediar el efecto del retinoide. Dado que el aumento en los niveles de RNAm está determinado por la relación entre su velocidad de síntesis y su velocidad de degradación, el aumento de RNAm de la glucocinasa mediado por ácido retinoico, podría deberse a una disminución en su degradación. Sin embargo, este posible mecanismo, ha sido descartado con los estudios de Decaux y cols. 1997, quienes reportaron que en hepatocitos de rata de 10 días de nacimiento, el efecto del ácido retinoico no está ligado a la disminución en la degradación del RNAm. Ya que la gran mayoría de los efectos del ácido retinoico sobre la expresión de los genes está mediada a través de un aumento en la actividad promotora, pudiera ser que el efecto del retinoide sobre la glucocinasa hepática esté mediado a través de un aumento en la síntesis de otros factores transcripcionales, que a su vez, activen al promotor de la isoenzima hepática.

Una de las principales diferencias entre la expresión del gen de la glucocinasa pancreática y la hepática es su aparición en diferentes estadios de desarrollo. En el islote la glucocinasa se expresa desde la vida fetal (Tu y cols. 1996), y en el hígado su expresión es detectable a las 2 semanas de nacimiento. Esta aparición en el hígado coincide con un cambio en la alimentación rica en grasas de la leche materna, al alimento sólido que contiene gran cantidad de carbohidratos. La expresión del gen de la glucocinasa hepática con el cambio de alimentación está ligada principalmente al incremento en el plasma de hormonas como la insulina y a la disminución de glucagón (Walker y Holland 1965). En este trabajo se estudió el efecto del ácido retinoico sobre la glucocinasa en diferentes estadios de desarrollo y se encontró que el tratamiento con el

retinoide incrementa la actividad y expresión, tanto de la glucocinasa pancreática como de la isoenzima hepática, en todos los estadios de diferenciación analizados. Decaux y cols. (1997) encontraron que el ácido retinoico acelera la expresión del gen de la glucocinasa en hepatocitos de ratas de 10 días de nacimiento, los cuales no expresan aún la glucocinasa. Los resultados aquí presentados amplían ese concepto y además demuestran que el ácido retinoico es capaz de afectar a la glucocinasa en el estado adulto, lo que sugiere un papel del retinoide, no solo diferenciante, sino también fisiológico. La magnitud del efecto del ácido retinoico sobre la actividad y expresión de la isoenzima pancreática varía dependiendo del estadio de diferenciación del tejido, siendo mayor el efecto en el tejido inmaduro que en el tejido adulto. Por el contrario, la magnitud del efecto sobre la actividad de la isoenzima hepática es independiente de la diferenciación del tejido, observándose una estimulación similar tanto en tejido inmaduro como en tejido adulto. Esta variación podría deberse a que los islotes fetales experimentan una diferenciación posterior durante la vida neonatal (Tuch y cols. 1990), entre ellas la de adquirir la capacidad de secretar insulina en respuesta a la glucosa, una de las funciones primordiales de los islotes. En tanto, es posible que la aparición de la glucocinasa en los hepatocitos de rata de 15 a 18 días de nacidas represente la enzima que se expresará en el hígado durante la vida adulta.

En nuestros estudios se encontró que el ácido retinoico afecta rápidamente la actividad enzimática y el RNAm de la glucocinasa hepática, observándose incrementos desde las 3 h de incubación con el retinoide. Esto difiere del efecto del retinoide sobre la isoenzima pancreática, el cual no fue aparente sino hasta las 6 h de tratamiento. Esta diferencia podría estar ligada a las distintas funciones de los dos órganos: el hígado juega un papel primordial en la regulación de la glucemia, utilizando la glucólisis y la glucogenogénesis en períodos postprandiales, y la gluconeogénesis en períodos de ayuno. La incompatibilidad del funcionamiento de dos vías contrarias: glucólisis y gluconeogénesis, provoca que el glucagon reprima rápidamente la expresión del gen de la glucocinasa (lynedjian y cols.1989). Cuando el alimento es restituido, la glucocinasa es entonces inducida rápidamente en respuesta a un aumento de la insulina sérica. La importancia del funcionamiento intermitente de las dos vías

en la función hepática sugiere que la inducción de la expresión del gen de la glucocinasa hepática requiere llevarse a cabo de manera rápida. En contraposición, la intermitencia entre la glucólisis y la gluconeogénesis no es esencial para la función del islote pancreático. Para las células beta del páncreas la glucólisis es la vía de importancia crítica, ya que de ésta depende la secreción de insulina. Por esta razón una actividad basal de la glucocinasa pancreática debe de ser indispensable y las modificaciones en su actividad requieran de mayor tiempo para efectuarse.

Decaux y cols. (1997) proponen que el ácido retinoico pudiera tener un efecto potenciador en la inducción de la glucocinasa hepática por la insulina. Nuestros estudios descartan su hipótesis y demuestran que el efecto de la insulina sobre la actividad de la glucocinasa hepática no es modificado por la presencia del ácido retinoico.

En la célula beta, la glucocinasa juega un papel importante como marcapaso en el mecanismo de secreción de insulina en respuesta a los niveles de glucosa sanguínea. Por lo tanto un aumento en la actividad de la glucocinasa deberá reflejarse en la secreción de la hormona. En este estudio se encontró que, efectivamente, el tratamiento de los islotes con el retinoide aumenta la secreción de insulina, siendo mayor en los islotes adultos que en los fetales, donde el flujo glucolítico regulado por la glucocinasa inicia la cascada de sucesos de la señalización requerida para la secreción de insulina. En contraste, en los islotes fetales, el ácido retinoico produce solo un ligero aumento en la secreción de la hormona, a pesar de los notables aumentos que se observaron en la actividad de la glucocinasa y en el RNAm de la insulina. Esto apoya las observaciones previas de Tu y cols. (1996), quienes encontraron que la vía glucolítica y la secreción de insulina están desacopladas en los islotes fetales, sugiriendo que otros factores importantes requeridos en la secreción de insulina no se encuentran en el tejido fetal.

Estudios previos muestran que el ácido retinoico aumenta los niveles de RNAm de insulina en el carril celular de-diferenciada RIN-m5F (Fernández-Mejía y Davison 1992), sin embargo, existe la posibilidad de que el aumento esté

relacionado con la capacidad diferenciante del ácido retinoico o alguna propiedad inherente de la línea celular. Con este estudio se demostró que el ácido retinoico puede provocar el aumento de la expresión del gen de la insulina tanto en tejido inmaduro como en tejido totalmente diferenciado. Se conoce que el promotor de la insulina humana es activado por el ácido retinoico (Clark y cols. 1995) por medio de un tandem de 3 sitios que contienen elementos de respuesta regulados por hormonas y por ácido retinoico (RARE/TRE), sin embargo, en el gen de la insulina de la rata no se han encontrado secuencias similares. Existe evidencia de que la glucosa aumenta los niveles de RNAm de la insulina por señales que vienen de la vía glucolítica (German, 1993), y es posible entonces, que el aumento en las señales de la glucólisis se deban al aumento de la actividad de la glucocinasa. Sin embargo, aún se requiere de futuros estudios para determinar los mecanismos por medio de los cuales existe un aumento de la expresión del gen de la insulina regulada por el ácido retinoico en la rata.

Con este estudio demostramos que el ácido retinoico es capaz de regular a la glucocinasa y por ende afectar tanto la glucogenogénesis como la glucólisis por afectar el primer paso de ambas rutas. Shin y McGrane (1997) demostraron que el precursor del ácido retinoico, la vitamina A, está involucrada en la regulación de algunas enzimas hepáticas como la fructosa 1,6 bifsosfatasa y la 6 fosfofructo 2- cinasa/2,6 bifsosfatasa y la fosfoenolpiruvato carboxicina, enzima limitante de la gluconeogénesis. Esto sugiere que el ácido retinoico participa más ampliamente en la regulación del metabolismo de los carbohidratos de lo que se pensaba inicialmente.

La deficiencia de vitamina A (retinol) es una de las afecciones más frecuentes en el mundo (Underwood y Arthur, 1996). En México se ha reportado que la ingesta de retinol se encuentra deficiente hasta en un 72% (Rosado y cols. 1995). Diversos estudios han encontrado que existe una relación entre la desnutrición fetal e infantil y el desarrollo de diabetes mellitus no insulino dependiente en la vida adulta (McDonagh y cols. 1997; Hales y Baker 1992). Esos estudios revelan que la desnutrición durante la vida fetal o neonatal

produce cambios permanentes en la función y estructura de los islotes pancreáticos, tales como: una disminución del contenido de insulina, una secreción de insulina alterada en respuesta a glucosa y una disminución en el tamaño y vascularización de los islotes (Hoet y cols.1992; Martin y cols.1997; Hoet y Hanson 1999).

Nuestros estudios demuestran la importancia de los retinoides en la expresión de genes determinantes en la regulación de la glucemia y sugieren que una suplementación insuficiente de retinol puede contribuir al desarrollo de algunos defectos en la función de la célula beta del páncreas y al desarrollo de algún tipo de diabetes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ◆ Ashcroft SJ. 1980. **Glucoreceptor mechanisms and the control of insulin release and biosynthesis.** *Diabetologia* 18: 5-15.
- ◆ Bali D. Svetlanov A. Lee HW. Fusco-DeMane D. Leiser M. Li B. Barzilai N. Surana M. Hou H. Fleischer N. DeOinho R. Rossetti L. Efrat S. 1995. **Animal model for glucokinase gene.** *J Biol Chem* 270:21464.
- ◆ Bedoya FJ. Matschinsky FM. Shimizu T. O'Neil JJ. y Appel MC. 1986. **Differential regulation of glucokinase activity in pancreas islets and liver of the rat.** *J Biochem Chem* 261: 23 10760-10764.
- ◆ Bell GI. Froguel P. Hishi S. Pilkis SJ. Stoffel M. Takeda J. Vionnet N. Yasuda K. 1993. **Mutations of the human glucokinase gene and diabetes mellitus.** *Trends Endocrinol Metab* 4:86-91
- ◆ Berry MN. Friend DS. 1969. **High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells.** *J Cell Biol* 43: 506-519.
- ◆ Borboni P. Magnaterra R. Rabini A. Staffolani R. Porzio O. Sesti G. Fusco A. Mazzanti T. Lauro R. Marlier LNJJL. 1996. **Effect of biotin on glucokinase activity mRNA expression and insulin release in cultured beta-cells.** *Acta Diabetol* 33:154.
- ◆ Bradford, MM. 1976. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.** *Anal Biochem* 72:248-54.
- ◆ Burch T. Trus MD. Berner DK. Leontire A. Zawalich KC. Matschinsky FM. 1982. **Adaptation of glycolytic enzymes. Glucose use and insulin release in rat pancreatic islets during fasting and refeeding.** *Diabetes* 30: 923.
- ◆ Canolly BA. Trayer IP. 1979. **Reaction of rat glucokinase with substrate-related and other alkylating agents.** *Eur J Biochem* 99(2):299-308.
- ◆ Cardenas ML. Rabajille E. Niemeyer H. 1984. **Suppression of kinetic cooperativity of hexokinase D (glucokinase) by competitive inhibitors. A slow transition model.** *Eur J Biochem* 145:163-171.

- ◆ Chauhan J. Dakshinamurt K. 1991. **Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats.** *J Biol Chem* 266: 10035.
- ◆ Chytil F. Ong DE. 1987. **Intracellular vitamin A-binding proteins.** *Ann Rev Nutr* 7: 321.
- ◆ Clark AR. Wilson ME. London NJ. James RF Docherty K. 1995. **Identification and characterization of a functional retinoic acid / thyroid hormone response element upstream the human insulin enhancer.** *Biochem J* 309: 867
- ◆ Cornish-Bowden A. Storer Ac. **Mechanistic origin of the sigmoidal rate behavior of rat liver hexokinase D (glucokinase).** 1986. *Biochem J* 240:293.
- ◆ Dakshinamurti K. Tarrago-Litvak L. Hong HC. 1970. **Biotin and glucose metabolism.** *Can J Biol* 48: 493-500
- ◆ De Luca LM. 1991. **Retinoids and their receptors in differentiation embryogenesis and neoplasia.** *FASEB J* 5:2924.
- ◆ Decaux JF. Juanes M. Bossard P. Girard J. 1997. **Effects of triiodothyronine and retinoic acid on glucokinase gene expression in neonatal rat hepatocytes.** *Mol and Cel Endocrinol* 130: 61-67.
- ◆ Dolle P. Ruberte E. Kaster P. Petrovich M. Stoner CM. Gudas L. Chambon P. 1989. **Differential expression of the genes encoding the retinoic acid receptors  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\gamma$  CRABP in the developing limbs of the mouse.** *Nature* 342: 702
- ◆ Dolle P. Ruberte E. Leroy P. Morris-Kay G. Chambon P. 1990. **Retinoic acid receptors and cellular retinoic binding proteins. 1.A systemic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis.** *Development* 110: 1133-1151.
- ◆ Epstein PN. Boshero AC. Atwater I. Cai W. y Overbeek PA: 1992. **Expression of yeast hexokinase in pancreatic  $\beta$ -cells of transgenic mice reduces blood glucose enhances insulin secretion and decrease diabetes.** *Proc Natl Acad Sci.* 89:12038-12042.

- ◆ Eto K. Sakura H. Shimokawa K. Kadowaki H. Hagura R. Akanuma Y. Yazaki Y. Kadowaki T. 1993. **Sequence variations of glucokinase gene in Japanese subjects with NIDDM.** *Diabetes* 42:1133-1138.
- ◆ Fernández-Mejía C. Davison MB. 1992. **Regulation of glucokinase and proinsulin gene expression and insulin secretion in RIN-m5F cells by dexametasone retinoic acid and thyroid hormones.** *Endocrinology*. 120: 1660-1668
- ◆ Fiorella PD. Napoli JL. 1991. **Expression of cellular retinoic acid binding protein (CRABP) in *Escherichia coli*.** *J Biol Chem* 266:16572.
- ◆ Frogel PH. Velho G. Cohen D. Passa P. 1991. **Strategies for the collection sibling-pair data for genetic studies in type 2 (non insulin-dependent) diabetes mellitus.** *Diabetologia* 34: 685-691.
- ◆ Frogel PH. Zouali H. Vionnet N. Velho G. Vaxillaire M. Pharm D. Sun F. Lesage S. Stoffel M. Takeda Passa P. Bell GI. J. Cohen D. 1993. **Familial hyperglycemia due to mutations in the glucokinase.** *New England J Med* 328: 697-702.
- ◆ German MS. 1993. **Glucose sensing in pancreatic islet beta cells: the key role of glucokinase and the glycolytic intermediates.** *Proc Natl Acad Sci* 90: 1781-1785.
- ◆ German MS. Moss LM. Rutter WJ. 1990. **Regulation of insulin gene expression by glucose and calcium in transfected primary islets cultures.** *J Biol Chem*. 265:22063.
- ◆ German MS. Wang J. 1994. **The insulin gene contains multiple transcriptional elements that respond to glucose.** *Mol Cell Biol* 14:4067-4075.
- ◆ Gorman CM. Moffat LF. Howard BH. 1982. **Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells.** *Mol Cell Biol* 2:1044-1051.
- ◆ Grummer MA, Thet LA, Zachman RD. 1994. **Expression of retinoic acid receptor genes in fetal and newborn rat lung.** *Pediatr Pulmonol*. 17(4):234-8
- ◆

- ◆ Grupe A, Hultgre B, Ryan A, Ma I, Bauer M, Stewart T. 1995. **Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic b cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis.** *Cell* 83:69-79
- ◆ Hales CN, Barker DJ. 1992. **Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis.** *Diabetologia.* 35(7):595-601
- ◆ Haq R, Pfahl M, Chyntil F. 1991. **Retinoic acid affects the expression of nuclear retinoic acid receptors in tissues of retinol-deficient rats.** *Proc Natl Acad Sci.* 88:8272.
- ◆ Hiriart M, Ramirez-Melendes MC. 1991. **Functional subpopulation of individual pancreatic beta cells in culture.** *Endocrinology* 128:3193.
- ◆ Höepner W, Seitz HJ. 1989. **Effect of thyroid hormones on glucokinase gen trascription in rat liver.** *J Biol Chem* 264:20643-47
- ◆ Hoet JJ, Dahri S, Snoeck A, Reusens-Billen B, Remacle C. 1992. **Importance of diets and their effect on fetal development: function and structure of the endocrine pancreas following protein deficiency during intrauterine life.** *Bull Mem Acad R Med Belg.*147(3-5):174-81.
- ◆ Hoet JJ. and Hanson MA. 1999. **Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development.** *J Physiol* 514: 617-627
- ◆ Horikawa Y. et al. 1997. **Mutation in hepatocyte nuclear factor 1 beta gene TCF2 associated with MODY (letter)** *Naure Genet* 17: 384-385
- ◆ Iynedjian P.B, Pilot P.R, Nospikel T, Milbun J.L, Quaade C, Hughes S, Ucla C, Newgard C.B. 1989. **Differential expression and regulation of the glucokinase gene in liver and islets of Langerhans.** *Proc Natl Acad Sci* 86: 7838-7842.
- ◆ Iynedjian PB, Girard J. 1990. **Nomenclature for mammalian glucokinase.** *Biochem J* 275: 821.
- ◆ Iynedjian PB; Gjinovic A; Renold AE. 1988. **Stimulation by insulin of glucokinase gene transcription in liver of diabetic rats.** *J Biol Chem* 263 (2) 740-744.

- ◆ Jetton TL. Liang Y. Petterpher CC. Zimmerman EC. Cox FG. Horath K. Matschinsky FM. Magnuson MA. 1994. **Analysis of upstream glucokinase promoter activity in transgenic mice and identification in rare neuroendocrine cells in the brain and gut.** *J Biol Chem* 269:3641-3654.
- ◆ Koranyi LI. Bourey RE. Slentz CA. Holloszy JO. Permutt MA. 1991. **Coordinate reduction of rat pancreatic islet glucokinase and proinsulin mRNA by exercise training.** *Diabetes* 40 (3):401-404.
- ◆ Krinsky NL. 1993. **Actions of carotenoids in biological systems.** *Ann Rev Nutr* 13:561.
- ◆ Leid M. et al. 1992. **Purification, cloning, and RXR identity of HeLa cell factor with RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently.** *Cell* 68: 377.
- ◆ Lenzen S. Tiedge M. Panten U. 1986. **Glibenclamide induces glucokinase in rat pancreatic islets and liver.** *Biochem Pharmacol* 35:2841.
- ◆ Liang Y. Najafi H. Smith RM. Zimmerman EC. Magnuson M. Matschinsky FM. **Concordant glucose induction of glucokinase, glucose usage and glucose-stimulated insulin release in pancreatic islets maintained in organ culture.** *Diabetes* 41:792-806.
- ◆ Liang Y. Najafi H. y Matschinsky FM. 1990. **Glucose regulates glucokinase activity in cultured islets form rat pancreas.** *J Biochem Chem* 265 (28): 16863-16866.
- ◆ Lohnes D., Mark M. Mendelsohn C. Dolle P. Decimo D. LeMeur M. Dierich A. Gorry P Chambon P. 1995. **Developmental roles of the retinoic acid receptors.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 53:1-6: 475-86.
- ◆ Magnaterra R. Porzio O. Piemonte F. Bertoli A. Sesti G. Lauro D. Marlier LN. Federici G. Borboni P. 1997. **The effects of pregnancy steroids on adaptation of beta cells to pregnancy involve the pancreatic glucose sensor glucokinase.** *J Endocrinol* 155(2):247-53.
- ◆ Magnuson MA Andreone TL Printz RL Koch S Granner DK. 1989. **Rat glucokinase gene: structure and regulation by insulin.** *Proc Natl Acad Sci* 86: 4838.

- ◆ Magnuson MA. 1990. **Glucokinase gene structure. Functional implications of molecular genetic studies.** *Diabetes* 39: 523.
- ◆ Magnuson MA. y Shelton KD. 1989. **An alternate promoter in the glucokinase gene is active in the pancreatic  $\beta$ -cells.** *J Biochem Chem* 264: 27 15936-15942.
- ◆ Mangelsdorf DJ. Evans RM. 1995. **The RXR heterodimers and orphan receptors.** *Cell* 83:841.
- ◆ Mangelsdorf DJ. Fine A. Berk JL. Goldstein RH. 1992. **Retinoid receptors as transcription factors.** New York: CSHL Press 1137-67.
- ◆ Martin MA, Alvarez C, Goya L, Portha B, Pascual-Leone AM.1997. **Insulin secretion in adult rats that had experienced different underfeeding patterns during their development.** *Am J Physiol* 272:E634-40
- ◆ Matschinsky FM. 1996. **A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm.** *Diabetes* 45: 223-242.
- ◆ Matschinsky FM. Ellerman JE. 1968. **Metabolism of glucose in the islets of Langerhans.** *J Biol Chem* 243(10):2730-2736.
- ◆ McDonagh M. Liaquat A. Kahn A. Dlatt PR. Barnett YA. Barnett CR. **Antioxidant status, oxidative stress and ADN damage in the aetiology of Malnutrition Related Diabetes Mellitus.** *Biochem Soc Trans* 25:146.
- ◆ McMenamy, KR., Zachman, R. 1993. **Effect of gestational age and retinol (Vitamin A) deficiency on fetal rat lung nuclear retinoic acid receptors.** *Pediat Res* 33: 251-255
- ◆ Meglasson MD. Matschinsky FM. 1986. **Pancreatic islet glucose metabolism and the regulation of insulin secretion.** *Diabetes Metab Res* 2: 163-214.
- ◆ Meglasson MD. Matschinsky FM.1984. **New perspectives on pancreatic islet glucokinase.** *Am J Physiol.* 246: E1-E13
- ◆ Middleton R.J. 1990. **Hexokinases and glucokinases.** *Biochem Soc Trans* 18: 180.

- ◆ Minderop R; Hoepfner W; Seitz H. 1987 **Regulation of hepatic glucokinase gene expression: role of carbohydrates and glucocorticoid and thyroid hormones.** *Eur J Biochem* 164: 181-187.
- ◆ Miwa I. Murata T. Mitsuyama S. Okuda J. 1990. **Participation of glucokinase inactivation in inhibition of glucose-induced insulin secretion by 2-cyclohexen-1-one.** *Diabetes* 39 (10) :1170-6.
- ◆ Mueckler M. 1991. **Family of glucose-transporters genes. Implication for glucose homeostasis and Diabetes.** *Diabetes* 39:6-11.
- ◆ Odagiri H. Wang J. German MS. 1996. **Function of the human insulin promoter in primary cultured islets cells.** *J Biol Chem* 271:1909-1915.
- ◆ Ong DE. Page DL. 1987. **Cellular retinol-binding protein (type II) is abundant in humans small intestine.** *J Lipid Res* 28:739-749.
- ◆ Perez-Castro AV, Tran VT, Nguyen-Huu MC. 1993. **Defective lens fiber differentiation and pancreatic tumorigenesis caused by ectopic expression of the cellular retinoic acid-binding protein I.** *Development* 119(2):363-75
- ◆ Petrovich M. Brand NJ. Drust A. Chambon P. 1987. **A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors.** *Nature* 330:444.
- ◆ Printz Richard L. Magnuson Mark A. y Granner Daryl K. 1993. **Mammalian glucokinase.** *Annu Rev Nutr.* 13:463-469.
- ◆ Rosado JL. Bourger H. Saint-Matin B. 1995. **Deficiencia de Vitaminas y minerales en México. Una revisión crítica del estado de la información. II Deficiencia de vitaminas.** *Salud Publica de México.* 37(5):452-461
- ◆ Sakura H. Eto K. Kodowaki H. Sinokawa H. Ueno H. Koda N. Fukushima Y. Akanuma Y. Yazaki Y. Kadowaki T. 1992. **Structure of the human glucokinase gene and identification of a missense mutation in a Japanese patient with early onset non-insulin-dependent diabetes mellitus.** *J Clin Endocrinol Metab* 75:1571-1573.

- ◆ Sambrook j. Fritsch EF. Maniatis T. 1989. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Plamid Vectors.** 1.42. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- ◆ Sambrook j. Fritsch EF. Maniatis T. 1989. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Assay for Chloramphenicol Acetyltransferase.** 16.60. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- ◆ Shelton KD. Franklin AJ. Koor A. Beechem J. Magnuson MA. 1992. **Multiple elements in upstream glucokinase contribute to transcription in insulin cells.** *Mol Cell Biol* 12:4578-4589
- ◆ Shimizu T. Parker JC. Najafi H. Matschinsky FM. 1988. **Control of glucose metabolism in pancreatic  $\beta$ -cells by glucokinase hexokinase and phosphofructokinase.** *Diabetes* 37:1524.
- ◆ Shin D. McGrane MM. 1997. **Vitamin A regulates genes involved in hepatic gluconeogenesis in Mice: Phosphoenolpyruvate carboxikinase, Fructose-1,6.bisphosphatase and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase.** *Am Soc Nutr Sci* .1274-1278.
- ◆ Sibrowsky W. Muller MJ. Seitz HJ. 1981. **Effect of Different thyroid states on rat liver glucokinase synthesis and degradation in vivo.** *J Biol Chem* 256 (18) 9490-9494
- ◆ Sibrowsky W. Seitz HJ. 1980. **Hepatic glucokinase turnover in intact and adrenalectomized rats in vivo.** *Eur J Biochem* 113:121-129.
- ◆ Sibrowsky W. Seitz HJ. 1984. **Rapid action of insulin and cyclic AMP in the regulation of functional messenger RNA coding for glucokinase in rat liver.** *J Biol Chem* 259 (1) 343-346.
- ◆ Sibrowsky W. Staegmann U. Seitz HJ. 1982. **Accelerated turnover of hepatic glucokinase in starved and streptozotocin-diabetic rat.** *Eur J Biochem* 127: 571-574.
- ◆ Sinha M. Ghosh AK. 1994. **Influence of dietary vitamin A deficiency on rat digestive and absorptive functions during diabetes mellitus.** *Inidan J Med Res* 100:196-200.

- ◆ Spence JT. Koudelka AP. 1984. **Effects of biotin upon the intracellular level of cGMP and the activity of glucokinase in cultured rat hepatocytes.** *J Biol Chem* 259:6393.
- ◆ Spence JT. Pitot HC. 1979. **Hormonal regulation of glucokinase in primary cultures of adult rats hepatocytes.** *J Biol Chem* 254 (24) 12331-12336.
- ◆ Stoffel M. Frogel PH. Takeda J. Zouali H. Vionnet N. Velho G. Vaxillaire M. Sun F. Lesage S. Bell GI. Cohen D. 1993. **Familial hyperglycemia due to mutations in the glucokinase.** *New England J Med* 328: 697-702.
- ◆ Stoffers DA. et al. 1997. **Early-onset type II Diabetes Mellitus (MODY 4) linked to IPF1 (letter)** *Nature Genet* 17: 138-141.
- ◆ Tanaka K. Sato M. Tomita Y. Ichihara A. 1978. **Biochemical studies on liver functions in primary cultured hepatocytes of adult rats.** *J Biochem* 84:937-946.
- ◆ Tanizawa Y. Koranyi L. Welling CM. Permutt MA. 1991. **Human glucokinase gene: cloning and sequence determination of two alternatively spliced cADNs.** *Proc Natl Acad Sci* 88:7294.
- ◆ Thorens B. Sarkar H. Kaback H. Lodish H. 1988. **Cloning and functional expression in bacterial of a novel glucose transporter present in liver intestine kidney and beta pancreatic islet cell.** *Cell* 55: 281.
- ◆ Tiedge M. y Lenzen S. 1991. **Regulation of glucokinase and GLUT2 glucose transporter gene expression in pancreatic  $\beta$ -cells.** *Biochem J* 279: 889-901
- ◆ Torres y Torres N. 1995. **Avances en vitamina a y proteína que unen retinoides.** *Rev Invest Clin* 47:149-60.
- ◆ Tu J. Tuch BE. 1996. **Glucose regulates the maximal velocities of glucokinase and glucose utilization in the mature fetal rat pancreatic islet.** *Diabetes* 45:1068-1075.
- ◆ Tuch BE. Osgerby KJ. 1990. **Maturation of insulinogenic response to glucose in human fetal pancreas with retinoic acid.** *Hormone and Metabolic Res Supp.* 25:233-238.

- ◆ Underwood BA. and Arthur P. 1996. **The contribution of vitamin A to public health.** *FASEB J.* 10(9):1040-8
- ◆ Walker DG. Holland G. 1965. **The development of hepatic glucokinase in the neonatal rat.** *Biochem J.* 97:845.
- ◆ Walker DG. Parry MJ. 1966. **Glucokinase.** In: *Methods of Enzymology*. Vol 9 Colowick SP. Kaplan NO. Eds. Academic Press. New York and London 381-383.
- ◆ Wang J. Shen L. Najafi H. Kolberg J. Matschinsky FM. Urdea M. German M. 1997. **Regulation of insulin preRNA splicing by glucose.** *Proc Natl Acad Sci* 94:4360-4365
- ◆ Weinhaus AJ. Stout LE. Sorensen RL. 1996. **Glucokinase, hexokinase, glucose transporter 2, and glucose metabolism in islets during pregnancy and prolactin-treated islets in vitro: mechanisms for long term up-regulation of islets.** *Endocrinology* 137 (5): 1640-9.
- ◆ Weinhouse S. 1976. **Regulation of Glucokinase in liver.** *Curr Top Cell Reg* 11: 1-50.
- ◆ Yamagata K. et al. 1996b. **Mutations in the hepatocyte nuclear factor 1a gene in maturity onset diabetes of the young (MODY 3).** *Nature* 384: 455-458.
- ◆ Yamagata K. et al. 1996a. **Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY 1).** *Nature* 384: 458-468.
- ◆ Zerivitz K. Kusjarvi GA. 1989. **An improved nuclear extract preparation method.** *Gene Anal Tech* 6:101-109.
- ◆ Zimmet P. 1991. **The epidemiology of and primary prevention of NIDDM.** Rifkin H Colwell JA Taylor SI. *Diabetes*. Elsevier De. 721-729.

## Effect of Retinoic Acid on Glucokinase Activity and Gene Expression and on Insulin Secretion in Primary Cultures of Pancreatic Islets\*

GABRIELA CABRERA-VALLADARES, MICHAEL S. GERMAN,  
FRANZ M. MATSCHINSKY, JUEHU WANG, AND CRISTINA FERNANDEZ-MEJIA

From the Nutritional Genetics Unit (G.C.V., C.F.M.) Biomedical Research Institute, National University of Mexico, Mexico City, Mexico 04530; Hormone Research Institute (M.S.G., J.W.) University of California San Francisco, San Francisco, California 94143-0534; and Diabetes Research Center (F.M.M.), University of Pennsylvania Medical Center, Philadelphia, Pennsylvania 19104-6015

### ABSTRACT

Retinoic acid has manifold effects on pancreatic  $\beta$ -cells. Previously we reported that retinoic acid increases glucokinase activity and messenger RNA (mRNA) levels in the insulinoma cell line RIN-m5F; however, we could not rule out the possibility that the effect of retinoic acid on RIN-m5F glucokinase was inherent to the cell line or related to its differentiating capacity. In this report, we demonstrate that physiologic concentrations of retinoic acid stimulate glucokinase activity in both fetal islets and differentiated adult islets in culture. In the adult tissue, the response to the retinoid was less pronounced, achieving about half of the maximal effect produced on the fetal tissue. Using the branched DNA (bDNA) assay, a sensitive signal amplification technique, we detected relative increases in glucokinase mRNA levels of  $51.8 \pm 13.3\%$  and  $62.8 \pm 16.1\%$  at 12 and 24 h,

respectively, in adult islets treated with  $10^{-8}$  M retinoic acid. In fetal islets, increases of  $55 \pm 14.9\%$  and  $107 \pm 30.5\%$  at 12 and 24 h, respectively, were observed. In transfected fetal islets, retinoic acid increased the activity of the -1000 kb rat glucokinase promoter by 51.3%. Because glucokinase activity controls insulin secretion, we also investigated the effect of retinoic acid on insulin secretion. Treatment with  $10^{-8}$  M retinoic acid for 24 h increased insulin secretion in both fetal and adult islets; however, the increases on insulin secretion were more pronounced in the mature islets; in contrast, retinoic acid produced higher levels of insulin mRNA in the fetal islets. These data show that retinoic acid increases pancreatic glucokinase in cultured islets and that the mechanism may involve a stimulatory effect on the glucokinase promoter. (*Endocrinology* 140: 3091-3096, 1999)

GLUCOKINASE (EC 2.7.1.1) is a tissue-specific enzyme present in hepatocytes, in pancreatic  $\beta$  cells and in certain rare neuroendocrine cells of the brain and gut (1-3). Glucokinase plays a key role in glucose homeostasis, regulating insulin secretion in response to glucose in the  $\beta$  cells (4, 5) and uptake of glucose in the liver (6, 7). In humans, mutations in the glucokinase gene cause maturity-onset-diabetes of the youth (MODY 2) (8) or hyperinsulinemia (9).

Comparison of the pancreatic and hepatic glucokinase gene transcripts reveals tissue specific control of expression and the existence of two distinct promoters in a single glucokinase gene (10, 11). The existence of alternate promoters suggests that separate factors regulate glucokinase transcription in the two tissues. In the liver, glucokinase gene transcription is under multihormonal control (12-14). Less is known about the transcriptional regulation of pancreatic glucokinase by hormones. Posttranscriptional regulation have been invoked to explain glucose induction of glucokinase (15). In a previous report, we demonstrated that pancreatic

glucokinase transcription and activity is also regulated by different lipophilic hormone ligands of the nuclear hormone receptor superfamily, and that this hormonal regulation differs between the hepatic and the pancreatic genes (16).

One member of this family, all-*trans*-retinoic acid, a derivative of vitamin A and a ligand for a member of the nuclear hormone receptor superfamily, plays an important role in cellular development, cellular growth, and differentiation (17, 18). In cultured cells, the nature of the growth and differentiation response elicited by retinoic acid depends upon the cell line. Thus, retinoic acid induces terminal differentiation of many cell types, including mouse teratocarcinoma stem cells (19), neuroblastoma cells (20), and the promyelocytic cell line, HL-60 (21). In contrast, retinoic acid inhibits the differentiation of chondrocytes (22) and adipocytes (23). The effect of retinoic acid on gene expression is also related to the differentiation state of the cell: retinoic acid induces S14 gene transcription in cultured adipocytes but not preadipocytes (24, 25).

During development, the natural source of retinoids for embryonic tissues is maternal retinol. In view of its highly pleiotropic effects, it is likely that retinoic acid is synthesized from retinol in discrete areas of the embryo, close to its sites of action. It has been suggested (26) that the function of cytosolic retinol binding protein (CRBP) is to concentrate and store retinol in sites where retinoic acid is required in relatively high concentrations, so that retinol can be converted to retinoic acid in relation to specific morphogenetic processes.

Received August 31, 1998.

Address all correspondence and requests for reprints to: Cristina Fernandez-Mejia, Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biológicas Universidad Nacional Autónoma de México/Instituto Nacional de Pediatría, Avenida del Iman 1, 4th Floor, Mexico City, C.P. 04530, Mexico. E-mail: cristfern@servidor.unam.mx.

\* This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico IN-210894, University California Mexus, and NIH RO1-DK-48281 grants.

Conversely, cytosolic retinoic acid binding protein (CRABP) may be expressed by cells whose normal developmental function requires low levels of retinoic acid. In fetal pancreas, homogenous expression of CRBP but not CRABP can be detected (26), suggesting that high concentrations of retinoic acid are important during pancreatic development.

Retinoic acid also affects the function of pancreatic  $\beta$ -cells: 1) It restores insulin secretion in vitamin A deficient rats (27). 2) It induces both first and second phase insulin secretory responses to glucose in explants of human fetal pancreas, which are normally poorly responsive to glucose (28). 3) It increases insulin production in RINm5F cells (16) and in human islets (29). Finally, retinoic acid increases pancreatic glucokinase activity and messenger RNA (mRNA) levels in the insulinoma cell line RIN-m5F (16); but this effect could be related to the differentiating capacity of retinoic acid because this cell line is relatively undifferentiated in comparison to rat adult islets cells (30-31) and several manipulation can cause further maturation of these cells (32-35). Therefore, in this work we analyzed the effect of retinoic acid on glucokinase activity and expression in primary cultures of rat islets in two different stages of maturity to determine if the effect of the retinoid is related to its differentiating actions.

### Materials and Methods

#### Adult islet culture

Pancreatic islets were isolated by the collagenase method reported by Hiriart and Ramirez (36) from 200-250 g Wistar male rats (Harlan, Mexico City, Mexico) injected with 0.25 ml of a 6.3% solution of picrobarbital (Pfizer, Inc., Mexico City, Mexico). Islets were suspended in RPMI 1640 medium containing 10% FBS and 400 U/ml penicillin, and 200 mg streptomycin (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) [supplemented Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium] and distributed equally into 60-mm tissue culture dishes (Costar, Cambridge, MA). Cultures were incubated at 37 degree C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>; and after 2-4 h of plating, cells were treated either with retinoic acid or vehicle (dimethylsulfoxide (DMSO); 0.01%) for the times indicated in the text.

#### Fetal islet culture

Twenty-one-day gestation fetal Wistar rat islets were isolated as described previously (37). Briefly, pancreatic glands obtained from four to six rats were finely minced and digested with collagenase Type D and 2  $\mu$ l DNase I (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). The washed digest was suspended in supplemented RPMI 1640 medium and distributed equally into two 60-mm tissue culture dishes (Costar). Cultures were incubated at 37 C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> after 5 h of plating to deplete fibroblasts, islets were seeded into 60-mm tissue culture dishes (Costar, Cambridge, MA) and treated either with retinoic acid or vehicle (DMSO; 0.01%) for the times indicated in the text.

#### Glucokinase assay

Seven hundred to 800 islets were harvested and centrifuged at 1,200 rpm. Tissue pellets were lysed in 500  $\mu$ l reporter lysis buffer (Promega Corp., Madison, WI), vortexed, and cell membranes disrupted by three freeze-thaw cycles. Five hundred microliters of GK buffer consisting of 50 mM Tris (pH 7.6), 4 mM EDTA, 150 mM KCl, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, and 2.5 mM dithiothreitol were added. The lysates were then centrifuged at 4 C for 1 h at 35,000  $\times$  g, in a Beckman Coulter, Inc. ultracentrifuge model Optima. Supernatants were recovered, and enzymatic activity was assayed as described previously by Walker and Parry (38), using NAD (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) as coenzyme. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* (Sigma Chemical Co.), was used as coupling enzyme. Correction for low hexokinase activity was applied by subtracting the activity measured at 0.5 mM glucose from

the activity measured at 100 mM glucose. Protein concentrations were determined by Bradford assay (39).

#### mRNA analysis

Glucokinase, insulin, and actin mRNA were quantified using bDNA technology in a 96-microwell format as previously described for quantification of insulin preRNA (40). All components, including buffers and DNA reagents were obtained from Chiron Corp. (Emeryville, CA). RNA was extracted by either Trizol (Life Technologies, Inc.) or by cell lysis with 400  $\mu$ l of extraction buffer (78 mM HEPES, pH 8.0/12.5 mM EDTA, pH 8.0/6.27 mM LiCl/1.6 lithium lauryl sulfate/proteinase K (1 mg/ml)/single-stranded DNA (19  $\mu$ g/ml)/7.8% formamide/0.05% sodium azide/0.05% Proclin 300. RNA samples were mixed with 200  $\mu$ l extraction buffer, along with proteinase K and glucokinase capture and label probes, loaded in the microwell plate, sealed with an adhesive-backed mylar plate sealer (Microtiter Plate Sealer, Flow Laboratory), and incubated overnight at 63 C in a plate heater to capture the targeted nucleic acids to the oligonucleotide-modified microwell surface. After cooling at room temperature for 10 min, cells were washed twice with wash A (Chiron Corp.). Fifty microliters of bDNA amplifier solution containing the bDNA amplifier probe at 1 pmol/ml in amplifier diluent (Chiron Corp.) were added and hybridized at 53 C for 30 min. After cooling and washing as described above, 50  $\mu$ l of a mixture containing alkaline phosphatase-conjugated label probes (2 pmol/ml) in label diluent (Chiron Corp.) were added and hybridized at 53 C, for 15 min. The plate was cooled and washed twice in buffer A as above and then washed three times with wash solution B (Chiron Corp.). Finally, 50  $\mu$ l of chemiluminescent substrate (Lumiphos 530), an enzyme-triggerable dioxetane substrate for alkaline phosphatase, was added, and the plate was incubated at 37 C for 25 min. Light emission was measured in a luminometer at 37 C. Each sample was assayed in triplicate. Each sample was standardized to actin mRNA.

#### Plasmid constructs

The construction of pFOXCAT1 has been described previously (41). The rat  $\beta$  cell glucokinase -1000 promoter extends from -1000 to +14 bp and was a gift from M. Magnuson (Vanderbilt University, Nashville, TN) (42).

#### Fetal islet transfection

Experiments were performed as previously described by German et al. (37); briefly, 21-day gestation fetal Wistar rat islets were isolated and digested for 5 min with collagenase Type P and 2  $\mu$ l DNase I (Boehringer Mannheim). After 3 h of plating to deplete fibroblasts, islets were recovered and dispersed with trypsin 0.05%, 0.53 mM EDTA (Life Technologies, Inc.). Dispersed islets were incubated at 37 degree C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, after 3 h of plating to deplete from fibroblasts, cells were harvested by rinsing the plates, pelleted and washed twice in room temperature PBS, resuspended in 0.8 ml PBS with 25  $\mu$ g of double cesium-purified plasmid DNA and electroporated with a discharge of 175 V, 2,000  $\mu$ F in a BTX electroporation system model 600 (San Diego, CA). The transfected cells were grown in supplemented RPMI with retinoic acid (10<sup>-6</sup> M) or vehicle (DMSO; 0.01%) for approximately 48 h before harvesting and protein extraction. CAT-TLC was performed using 25  $\mu$ g of protein and to generate enough CAT product, the sample was incubated for 3 h. Acetylated chloramphenicol signals were analyzed using a PhosphorImager 425 (Molecular Dynamics, Inc., Costa Mesa, CA).

#### Insulin secretion

Adult or fetal islets were isolated and cultured as described above. After 24 h of treatment with retinoic acid (10<sup>-6</sup> M) or vehicle, DMSO (0.01%), cells were washed twice with secretion buffer containing 20 mM HEPES, 115 mM NaCl, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4 mM KCl, 2.6 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 1.2 mM MgSO<sub>4</sub> (pH 7.4). Islets were then incubated for 1 h in secretion buffer containing D-glucose as indicated in the text and figure legends. Insulin concentration was analyzed by RIA (ICN Biochemicals, Inc., CA).

### Statistics

Data are presented as mean  $\pm$  SE. Individual comparisons were evaluated by Student's paired two tailed *t* test. Multiple comparisons were evaluated using one-way ANOVA. The significance level chosen was  $P < 0.05$ .

### Results

#### Retinoic acid effect on adult islet glucokinase activity

To investigate if retinoic acid is able to affect this enzyme in the adult differentiated tissue, we analyzed the effect of retinoic acid on glucokinase activity in islets isolated from adult rats. As shown in Fig. 1A, retinoic acid doses of  $10^{-6}$  M increased glucokinase activity by  $103 \pm 6.4\%$  at 24 h. This effect is slightly decreased at 48 h when an increase of  $85 \pm 4.1\%$  was observed. The responsiveness of adult islet pancreatic glucokinase to different doses of retinoic acid is shown in Table 1; a stimulatory effect was observed at doses as low as  $10^{-8}$  M, the minimal concentration tested.

#### Retinoic acid effect on fetal islet glucokinase activity

Retinoic acid has been shown to promote fetal islet maturation and insulin secretion in response to glucose (28). We investigated if the effect of retinoic acid on glucokinase is modified by the level of differentiation of the tissue. Studies on 21-day rat fetal islets showed (Fig. 1B) that after 24 h treatment with retinoic acid doses of  $10^{-6}$  M, glucokinase activity increased to  $196.6 \pm 13.7\%$  ( $P < 0.005$ ). A weaker stimulatory effect was also observed at 48 h ( $44.2 \pm 3.7\%$

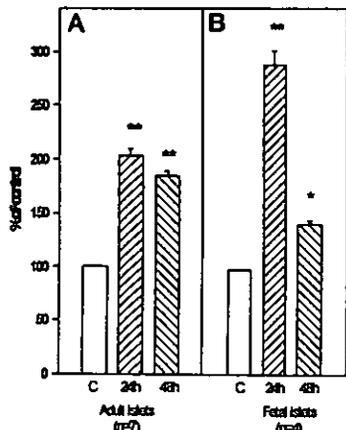


FIG. 1. Effect of retinoic acid on glucokinase activity in fetal and adult islets. Islets were isolated by collagenase digestion as described in *Materials and Methods*. Islets were cultured for the indicated periods of time in the presence of vehicle (DMSO; 0.01%) or  $10^{-6}$  M retinoic acid. A, Adult islets; B, fetal islets. Data are expressed as mean percentages  $\pm$  SE of glucokinase activity (adult =  $97.5 \pm 12$ ; fetal =  $102.5 \pm 22$  pmol/h-islet);  $n = 7$  or 4 experiments as indicated in the figure. Multiple comparisons were evaluated using one-way ANOVA. \*,  $P \leq 0.05$ ; \*\*,  $P \leq 0.0005$ .

( $P < 0.005$ ). As shown in Table 1, the retinoid affects glucokinase activity in the fetal tissue at all the doses tested.

#### Effect of retinoic acid on glucokinase mRNA levels

We determined if the effect of retinoic acid was related to an increase in glucokinase gene expression. Because glucokinase mRNA levels are low, we adapted the branched DNA (bDNA) assay, a sensitive signal amplification technique, to measure glucokinase mRNA levels. Relative increases of  $51.8 \pm 13.3$  and  $62.8 \pm 16.1\%$  at 12 and 24 h, respectively, were observed in adult islets treated with retinoic acid doses of  $10^{-6}$  M (Fig. 2A). The effect was detectable after 6 h incubation ( $18.2 \pm 10.7\%$ ). In fetal islets increases of  $55 \pm 14.9\%$  and  $107 \pm 30.5\%$  at 12 and 24 h, respectively, were observed (Fig. 2B).

#### Effect of retinoic acid on glucokinase promoter activity

A construct containing  $\sim 1000$  kb of pancreatic glucokinase promoter driving the chloramphenicol acetyl transferase (CAT) reporter gene was transfected in primary cultures of fetal islets. An increase of  $51.3 \pm 19.1\%$  of glucokinase promoter activity as measured by CAT enzyme activity ( $n = 5$ ), (Fig. 3), was observed after 48 h of treatment with retinoic acid doses of  $10^{-6}$  M. No effect was observed on the empty pFOX-CAT1 vector (Control = 100%, retinoic acid =  $95 \pm 9.3\%$ ).

#### Insulin secretion and mRNA levels

Because glucokinase activity is a determinant of insulin secretion (4, 5), we analyzed the effect of retinoic acid on insulin release at two different concentrations of glucose. As can be seen in Fig. 4, 24 h of treatment with ( $10^{-6}$  M) of the retinoid increased insulin release in either adult islets or in fetal islets. In the fully mature islets (panel A), retinoic acid increased insulin secretion by  $139.1 \pm 39$  and  $60.1 \pm 17\%$  at 5.5 and 16 mM glucose, respectively ( $P < 0.05$ ). In the fetal islets, which are normally poorly responsive to glucose, retinoic acid modestly increased insulin release by  $33.1 \pm 7$  and  $23.7 \pm 7\%$  at 5.5 and 16 mM of glucose, respectively ( $P < 0.05$ ) (panel B). We also determined the effect of retinoic acid on insulin mRNA by the bDNA method. Treatment with  $10^{-6}$  M of retinoic acid for 24 h increased insulin message by  $48.2 \pm 9.1\%$  ( $P < 0.05$ )  $n = 5$  in the adult islets and by  $79.7 \pm 20\%$  in the fetal islets ( $P < 0.05$ )  $n = 5$ .

### Discussion

In the present study, we demonstrate that retinoic acid can stimulate glucokinase gene expression and glucokinase enzyme activity in mature, fully differentiated pancreatic islets as well as in immature fetal islets, although these responses are somewhat greater in fetal islets. Although retinoic acid may be involved in maturation of the  $\beta$ -cell glucose sensing system during fetal development, as has been proposed previously (28), adult islets clearly retain the capacity to increase glucokinase levels and activity in response to retinoic acid.

Retinoic acid effects on differentiation, cellular growth, and gene expression are mediated through the activation of its nuclear receptors (7, 18). The presence of retinoic acid

TABLE 1. Effect of different dose of retinoic acid on glucokinase activity in fetal and adult islets

Fetal islets			Adult islets		
Dosis (M)	Percent of control (n = 3)	Significance (P)	Dosis (M)	Percent of control (n = 3)	Significance (P)
Control	100%		Control	100%	
10 <sup>-8</sup>	134.1 ± 12.2%		10 <sup>-8</sup>	124.2 ± 2%	
10 <sup>-7</sup>	157.4 ± 10.7%	<0.05	10 <sup>-7</sup>	149.7 ± 3%	<0.05
10 <sup>-6</sup>	289.9 ± 30.9%	<0.05	10 <sup>-6</sup>	203.2 ± 6.4%	<0.05

Islets were isolated by collagenase digestion as described in *Materials and Methods*. Islets were cultured for 24 h in the presence of vehicle (DMSO) or different dose retinoic acid as indicated in the table.

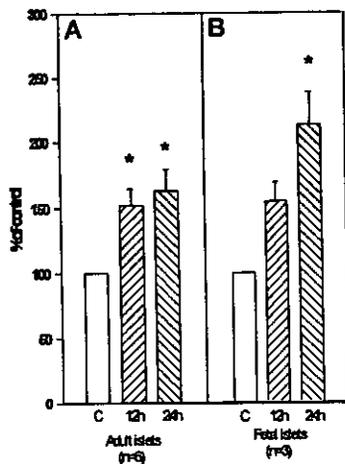


FIG. 2. Effect of retinoic acid on glucokinase mRNA levels. Glucokinase and actin mRNA were quantified using bDNA technology. Islets were cultured for the indicated periods of time in the presence of vehicle (DMSO, 0.01%) or 10<sup>-8</sup> M retinoic acid. A, Adult islets; B, fetal islets. Each sample was standardized to actin. Data are expressed as relative to that measured in cells incubated with vehicle. Each value represents the mean ± SE of six or three experiments as indicated in the figure. Multiple comparisons were evaluated using one-way ANOVA. \*, P < 0.05.

nuclear receptors RXR, RAR- $\alpha$ , and RAR- $\gamma$  as well as high levels of CRBP and CRABP has been reported in fetal and adult islets as well as in pancreatic cell lines (26, 29, 43, 44). Doses of retinoic acid that correspond to the doses required for activation of its nuclear receptor (10<sup>-9</sup> to 10<sup>-6</sup> M) (45) increased glucokinase activity in either fetal or adult islets, suggesting a physiological effect of the retinoid on pancreatic glucokinase.

Retinoic acid regulation of  $\beta$ -cell genes is not unprecedented. Clark *et al.* (29) have demonstrated that the human insulin promoter activity is also activated by retinoic acid. In this work we demonstrated the ability of retinoic acid to activate the -1000 kb  $\beta$ -cell glucokinase promoter, suggesting that retinoids increase glucokinase activity by activating transcription of the gene. To our knowledge, the studies presented here represent the first report on the physiological regulation of the glucokinase promoter. Current studies in

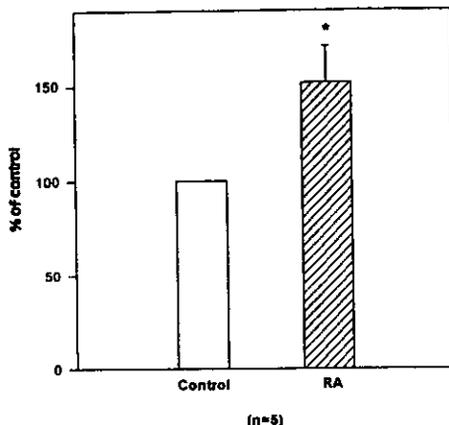


FIG. 3. Effect of retinoic acid on glucokinase promoter activity. Fetal islets were transfected with pFOXCAT1 containing -1000 to +14 bp of rat  $\beta$  cell glucokinase promoter. The cells were then incubated in medium with vehicle (DMSO, 0.01%) or 10<sup>-8</sup> M retinoic acid for approximately 48 h. CAT activity was then assayed in 25  $\mu$ g protein of the cell extracts and expressed relative to that measured in cells incubated with vehicle. Each value represents the mean ± SE of five experiments. Significance was assessed by Student's unpaired two-tailed *t* test. \*, P ≤ 0.05

our laboratory are investigating the mechanisms by which retinoic acid activate the pancreatic glucokinase promoter.

In a previous study (16), we have shown that retinoic acid increases insulin mRNA levels in the undifferentiated cell line RIN-m5F; however, we could not rule out the possibility that the effect of the retinoid was related to its differentiating capacity or a response limited to the particular cell line. In the present study, we demonstrate that, similar to its effect on glucokinase, retinoic acid can stimulate insulin gene expression in mature, fully differentiated pancreatic islets as well as in immature fetal islets. Retinoic acid has been shown to increase human insulin mRNA through a tandem repeat of three half sites of the retinoic acid/thyroid hormone regulatory elements (RARE/TRE) closely matching the RARE/TRE consensus AGGTCA at -1037 to -1006 bp in the human insulin promoter. No similar sequences are present in the rat genes. It has been reported that glucose increases insulin mRNA levels by signals coming from the glycolytic pathway (46). Because glucokinase activity governs glycolysis, it is possible that increases of metabolic signals from glycolysis

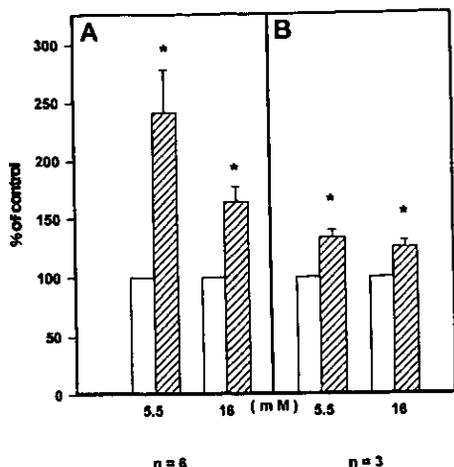


FIG. 4. Effect of retinoic acid on insulin secretion. Islets were cultured in the presence of vehicle (DMSO; 0.01%) or  $10^{-8}$  M retinoic acid. A, Adult islets; B, fetal islets. Open bars, Control; shaded bars, retinoic acid. After 24 h incubation, islets were washed and then incubated in 2 ml secretion buffer containing 5.5 or 16 mM glucose. After 1 h incubation, medium was collected. The insulin concentration was analyzed by RIA. Data are expressed in terms of mean percentages  $\pm$  SE of insulin secretion above the corresponding untreated controls. Absolute values: Control adult 5.5 mM glucose =  $25.5 \pm 3$ , fetal control 5.5 mM glucose =  $1.2 \pm 0.2$   $\mu$ U/h/islet; (insulin secretion ratios 16/5.5 mM. Adult islets =  $1.83 \pm 0.11\%$ , fetal islets =  $1.26 \pm 0.06$ ). n = 6 or 3 experiments as indicated in the figure. Multiple comparisons were evaluated using one-way ANOVA. \*,  $P < 0.05$ .

due to the increased activity of glucokinase accounted for the increases observed on insulin mRNA levels. Other plausible explanations are that retinoic acid increases insulin transcriptional factor(s), which in turn increase insulin expression, or that the retinoid increases insulin mRNA stability. However, further studies will be required to determine the mechanisms by which retinoic acid regulate insulin gene expression in the rat.

The studies presented here also demonstrate that retinoic acid treatment can increase insulin secretion in either the adult and the fetal islets; however, a stronger effect was observed in the fully mature adult islets where the glycolytic flux regulated by glucokinase initiate the cascade of events in the signal transduction required for insulin secretion (4, 5). In contrast, in the fetal islets, retinoic acid produced only a modest increase on insulin secretion, in spite of the larger increases produced by the retinoid on glucokinase activity and insulin mRNA levels. Taken together, these data support previous observations suggesting that glucokinase activity and insulin secretion is uncoupled in the fetal islets (47). A functional role of retinoic acid on insulin secretion was suggested in vitamin A-deficient rats (27), the studies presented herein, demonstrate that retinoic acid can affect, as well, insulin secretion in islets from normal rats.

Defects in the normal regulation of islet function by reti-

noids could contribute to some forms of diabetes in humans. In malnutrition-related diabetes mellitus, vitamin A is reduced in all malnourished diabetic patients when compared with malnourished controls (48). Furthermore, it has been proposed (49) that poor nutrition in fetal and early infant life is detrimental to the development and function of the pancreatic  $\beta$  cells and predisposes to the later development of type 2 diabetes. The role of vitamin A deficiency as a risk factor in diabetes underlines the significance of understanding the role of retinoids in pancreatic development and function.

#### Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Marcia Hiriart and Carmen Soto Sanchez for their advice on the isolation of adult islets. We are also indebted to Dr. M. Magnuson (Vanderbilt University) for the glucokinase promoter plasmid. We also thank Mr. Felipe Najera, Moises Paniagua, and the members of the Purchasing Department of Instituto de Investigaciones Biomédicas.

#### References

- Weinhouse S 1976 Regulation of glucokinase in liver. *Curr Top Cell Regul* 11:1-50
- Bedoya FJ, Matushinsky FM, Shimizu T, O'Neill JJ, Appel MC 1986 Differential regulation of glucokinase activity in pancreatic islet and liver in the rat. *J Biol Chem* 261:10760-10764
- Jetton TL, Liang Y, Pettepher C C, Zimmerman EC, Cox FG, Horvath K, Matushinsky FM, Magnuson MA 1994 Analysis of upstream glucokinase promoter activity in transgenic mice and identification of glucokinase in rare neuroendocrine cells in brain and gut. *J Biol Chem* 269:3641-3654
- Meglason MD, Matushinsky FM 1996 Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. *Diabetes Metab Rev* 2:163-214
- Matushinsky FM 1996 A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45:225-242
- Granner DJ, Pilkis S 1990 The genes of hepatic glucose metabolism. *J Biol Chem* 265:10173-10176
- Ferre T, Riv E, Bosch F, Valera A 1996 Evidence from transgenic mice that glucokinase is rate limiting for glucose utilization in the liver. *FASEB J* 10:1213-1218
- Velho G, Frogel P, Clement K, Pueyo ME, Rakotoambinina B, Zouali H, Passa F, Cohen D, Robert JJ 1992 Primary pancreatic  $\beta$ -cell defect caused by mutations in glucokinase gene in kindreds of maturity onset diabetes of the young. *Lancet* 340:444-448
- Glaser B, Kesavan P, Heyman M, Davis E, Cueta A, Buchs A, Stanley CA, Thornton PS, Permutt MA, Matushinsky FM, Herold KC 1998 Familial hyperglycemia caused by an activating glucokinase mutation. *N Engl J Med* 338:226-230
- Magnuson MA, Shalton KD 1989 An alternate promoter in the glucokinase gene is active in the pancreatic beta cell. *J Biol Chem* 264:15936-15942
- Magnuson MA 1990 Glucokinase gene structure. Functional implications of molecular genetic studies. *Diabetes* 39:523-527
- Sibrowski W, Seltz H 1980 Hepatic glucokinase turnover in intact and adrenalectomized rats *in vivo*. *Eur J Biochem* 113:121-129
- Iynedjian JB, Jøttrand D, Nouispike T, Asfari M, Pilot PR 1989 Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by glucagon-cAMP system. *J Biol Chem* 264:21824-21829
- Mindrop RH, Hoepfner W, Seltz HJ 1987 Regulation of hepatic glucokinase gene expression. Role of carbohydrates, glucocorticoid and thyroid hormones. *Eur J Biochem* 164:181-187
- Liang Y, Najafi H, Smith RM, Zimmerman EC, Magnuson MA, Tai M, Matushinsky FM 1992 Concordant glucose induction of glucokinase, glucose usage, and glucose-stimulated insulin release in pancreatic islets maintained in organ culture. *Diabetes* 41:792-806
- Fernández-Mejía C, Davison MB 1992 Regulation of glucokinase and pro-insulin gene expression and insulin secretion in RIN-m5F cells by dexamethasone, retinoic acid and thyroid hormones. *Endocrinology* 120:1660-1668
- Thaller C, Eichele G 1987 Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. *Nature* 327:625-628
- Kastner P, Mark M, Chambon P 1995 Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* 83:859-869
- Strickland S, Mahdavi V 1978 The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell* 15:393-403
- Hausler M, Sidell N, Kelly M 1983 Specific high affinity binding and biological action of retinoic acid in human neuroblastoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:5525-5529

21. Breitman TR, Selonick SE, Collins SJ 1980 Induction of differentiation of human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2936-2940
22. Berry PD, Brown PD, Padilla SR 1988 Microfilament modification by dihydrocytochalasin B causes retinoic acid modulate chondrocytes to express the differentiated collagen phenotype without changes in shape. *J Cell Biol* 106:161-165
23. Fairrari J, Quignard-Boulange A, Dugail I, Lesnier F 1988 Differential effects of retinoic acid upon early and late events in adipocyte conversion of 3T3 preadipocytes. *Exp Cell Res* 177:27-36
24. Lepar GJ, Jump DB 1992 Retinoic acid and dexamethasone interact to regulate S14 transcription in 3T3-F44A adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 84:65-71
25. MacDougald OA, Jump DB 1992 Localization of an adipocyte-specific retinoic acid response domain controlling S14 gene transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 188:470-476
26. Delle P, Ruberte E, Leroy P, Morris-Kay G, Chambon P 1990 Retinoic acid receptors and cellular retinoic binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development* 110:1133-1151
27. Chertow BS, Blazer WS, Barszetsky NG, Sivits WI, Cordle MB, Thompson D, Meda F 1987 Effects of vitamin A deficiency and repletion on rat insulin secretion *in vivo* and *in vitro* from isolated islets. *J Clin Invest* 79:163-169
28. Tsch BE, Ogerby KJ 1990 Maturation of insulinogenic response to glucose in human fetal pancreas with retinoic acid. *Horm Metab Res [Suppl]* 25:233-238
29. Clark AR, Wilson ME, London NJ, James RF, Docherty K 1995 Identification and characterization of a functional retinoic acid/thyroid hormone response element upstream the human insulin enhancer. *Biochem J* 309:863-870
30. Chick WL, Warren S, Chute RN, Like AA, Lauria V, Kitchen KC 1977 A transplantable insulinoma in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:628-633
31. Praz GA, Halban PA, Wollheim CB, Strauss AJ, Renold AE 1983 Regulation of immuno-reactive-insulin release from a rat cell line RINm5F. *Biochem J* 210:345-352
32. Gardner SL, Dotla F, Nayak RC, George KL, Eisenbarth GS, Halban FA 1989 Modulation by sodium butyrate of the differentiated status of a clonal pancreatic beta cell line (RIN). *Diabetes Res* 12:93-99
33. Powers AC, Philippe J, Herrnan H, Habner JF 1988 Sodium butyrate increased glucagon and insulin gene expression by recruiting immunocytochemically negative cells to produce hormone. *Diabetes* 37:1405-1410
34. Fernandez-Mejia C, Davidson MB 1993 Effect of sodium butyrate on glucose transport and glucose-phosphorylating enzymes in RIN-m5F cells. *Pancreas* 8:589-596
35. Muechel B, Khsuty G, Reid LM 1986 Regulation of insulin mRNA abundance and adenylation: dependence on hormones and matrix substrata. *Mol Cell Biol* 6:337-341
36. Hiriart M, Ramirez-Medeles MC 1991 Functional subpopulations of individual pancreatic  $\beta$  cells in culture. *Endocrinology* 128:3193-3198
37. German MS, Moos LM, Rutter WJ 1990 Regulation of insulin gene expression by glucose and calcium in transfected primary islet cultures. *J Biol Chem* 265:22063-22066
38. Walker DG, Parry MJ 1966 Glucokinase. In: Colowick SP, Kaplan NO (eds) *Methods Enzymol*. Academic Press, New York, London, vol 9:381-383
39. Bradford MM 1976 A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
40. Wang J, Shen L, Najafi H, Kolberg J, Matschinsky FM, Urdea M, German M 1997 Regulation of insulin pre-mRNA splicing by glucose. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4360-4365
41. German MS, Wang J 1994 The insulin gene contains multiple transcriptional elements that respond to glucose. *Mol Cell Biol* 14:4067-4075
42. Shelton KD, Franklin AJ, Khoer A, Beechem J, Magnuson MA 1992 Multiple elements in upstream glucokinase contribute to transcription in insulin cells. *Mol Cell Biol* 12:4578-4589
43. Kato M, Blazer WS, Mertz JR, Das K, Kato, Kuniya, Goodman DWS 1985 Influence of retinoid nutritional status on cellular retinoid and cellular retinoic acid binding protein concentrations in various rat tissues. *J Biol Chem* 260:4832-4838
44. Chertow BS, Blazer WS, Rajen DA, Primerano DA, Meda F, Cirulli V, Kresnowski Z, Smith B, Cardile MB 1993 Retinoic acid receptor, cytosolic retinoid-binding and retinoic acid-binding protein mRNA transcripts and proteins in rat insulin-secreting cells. *Diabetes* 42:1109-1114
45. Brand N, Fetkovich M, Knust A, Chambon P, Thé HU, Tiollais P, Dejean A 1988 Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature* 332:850-852
46. German MS 1993 Glucose sensing in pancreatic islet beta cells: the key role of glucokinase and the glycolytic intermediates. *Proc Natl Acad Sci* 90:1781-1785
47. Tu J, Tsch BE 1996 Glucose regulates the maximal velocities of glucokinase and glucose utilization in the mature fetal rat pancreatic islet. *Diabetes* 45:1068-1075
48. McDonagh M, Llaquat A, Kahn A, Flatt PR, Barnett YA, Barnett CR, 1997 Antioxidant status, oxidative stress, and DNA damage in the aetiology of malnutrition related diabetes mellitus. *Biochem Soc Trans* 25:1465 (Abstract)
49. Hales CN, Barker DJ 1992 Type 2 diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35:595-601