

124



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA INSULINA EN RESPUESTA A LOS GLUCOCORTICOIDES EN DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO

T E S I S  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I Ó L O G A  
P R E S E N T A :  
PATRICIA LAURA LÓPEZ CONDE

DIRECTOR  
DRA. CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA



MEXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2002  
FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

A la Directora de tesis:

*Dra. Cristina Fernández Mejía.* Por su apoyo incondicional, entusiasmo y dedicación para que este trabajo se realizara. Y por contribuir con todos sus consejos a mi formación profesional y personal.

*Al Dr. Ignacio Camacho Arroyo.*

Por que siempre estuvo ahí, muy pendiente de la elaboración de este trabajo y por dejarme hacer uso de sus instalaciones en la Facultad de Química para llevar a cabo mi aprendizaje. Además le agradezco sus valiosos comentarios y consejos en las correcciones de esta tesis

*Al M en C. Alberto Rojas Ochoa.*

Por su valiosísimo apoyo técnico, teórico y práctico que me brindó para la realización de todo el trabajo experimental de esta tesis. Por enseñarme las técnicas tan artesanales que parecen ser a veces, el aislamiento de islotes de Langerhans y el RT-PCR, y aún más, por el invaluable conocimiento que me compartió pacientemente todos los días, para llevar a cabo un trabajo experimental de calidad.

*Al Dr. Christian Guerra Araiza.*

Por la gran ayuda que me brindó siempre para la realización de esta tesis y por enseñarme la técnica del Northern Blot que aunque al final no se utilizó para el trabajo experimental de la tesis es un aprendizaje del que siempre estaré muy agradecida.

*Al Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes*

Por sus consejos y aportaciones teóricas que siempre de manera incondicional me ofreció para una mejor resolución a los problemas que se me fueron suscitando en la estandarización de las técnicas.

*Al Dr. Guillermo Romero Navarro*

Por su entusiasmo que siempre es muy oportuno, pero aún más, cuando parece que las cosas no quieren marchar. Gracias por tu sentido del humor y por esa manera tan didáctica de proveer a los aprendices tu conocimiento.

*A Biólogo Jorge Ortiz Mendieta*

Por el excelente material fotográfico de la metodología que me realizó para la exposición oral de este trabajo y aún más por soportar muy amablemente ese día todos los contratiempos y la tardanza inherente que en si lleva esta metodología. Gracias por todo y más por tu amistad incondicional.

## DEDICATORIAS

Existe solamente una cosa de este mundo de la que nunca he dudado y esa ha sido el amor tan incondicional que me ha profesado mi querida madre. Eso es lo único que nada ni nadie podrá jamás arrebatarme porque ese amor es parte de mi esencia, de mi Yo. Es la fuerza vital que a animado mis pasos, la que los a impulsado y los a arrancado de su imposible, desde de ahí - desde su amor- he podido observar con mis verdaderos ojos, al tiempo, a la muerte a la vida misma, a mis abismos personales como cuerpos lúdicos que he de habitar pero que nunca podrán alcanzarme, consumirme. *A ti mi amada madre*, que todo lo bueno o bello que pueda ser, es solo por ti. A ella que a sido siempre mi gran compañera, cómplice de mis más grandes, pequeñas y locas empresas. Promotora incansable de mi felicidad. Gracias por todo tu amor y esa fe que depositas en mi, sin jamás en ello pedirme nada. Te amo y no sabes como me has hecho falta, como te he extrañado a ti mi única y verdadera amiga.

*A mi papá* que siempre, a pesar de todo nunca a dejado de ser un buen padre y siempre se ha preocupado sinceramente por nuestra superación. Sé, que se dieron un sin fin de situaciones que parecía que nos estaban separando, pero creo que ambos hemos crecido a través de este tiempo y que estamos construyendo juntos un nuevo puente para acercarnos y eso me hace muy feliz porque te quiero mucho y espero que eso nunca se te olvide y que independientemente de cualquier cosa que suceda, nunca se te olvide que te amo y que cuentas conmigo.

A mis amadísimos hermanos *Oliver e Hilda*, porque mas que mis hermanos son mis más entrañables amigos. Siempre hemos estado juntos en las buenas y en las malas, soportando siempre muy animados la insoportable soledad, pero que en realidad, nunca hemos estado solos porque siempre nos hemos tenido. A ustedes que son la música que animan y dan vida a todos mis recuerdos que habitan en tantísimos espacios, aquellos que imaginamos y los que creamos. Los amo. Y gracias por todo su apoyo incondicional en todo lo que hago.

*A Hilda* mi pequeña hermana que me ayuda en ¡todo!, en mantener en "orden" la casa y a cuidar a nuestras pequeñas mascotas; porque has estado en esto de la tesis junto conmigo al pie del cañón ¡gracias!. Échale ganas siempre cuentas conmigo

*A Oliver* mi hermanote por cuidarnos y mantenernos para todos la casa en orden, te quiero gracias por cuidarnos ahora que mama esta lejos.

*A mi amado Manuel*. Porque siempre has existido, porque no es verdad que el amor es una utopía, si siempre has vivido en mi. A ti mi amor, por cumplir tu promesa de volverme a encontrar en esta vida. Porque volviste a mí, justo cuando yo más que nunca necesitaba una luz que me permitiera verme claramente, lejos de lo que yo consideraba la verdad que ya vez, resultado ser tan solo una pequeña sombra que me estaba devorando. Sé que ha sido toda una encrucijada, pero nunca hemos dejado de estar juntos. Gracias por no claudicar, por ser fuerte, por tenerme paciencia, por depositar en mi tu fe y amarme. Que yo te amo tanto y como siempre: eternamente. Además mil gracias porque sin ti creo que hubiera claudicado en esta empresa y ya vez a pesar de mi pesimismo ya esta. Te quiero.

A mis tan queridos amigos de la facultad de Ciencias(Oliva, Silvia, Guadalupe, Benito, Jorge, Paty, Merte, Ileana ) que mas que amigos son como mis hermanos, porque gracias a ustedes estar en la Universidad fue una maravillosa experiencia, siempre un constante aprendizaje. Y quizá por un sin fin de circunstancia ya casi no nos vemos pero sé que nuestra amistad y cariño ya se salva del caprichoso transito de esta vida. Los quiero mucho.

A *Oliva*: Creo que nunca podré conjuntar en un poema todo lo que significas para mi, quizá porque toda tu, eres un poema. Tú el primer poema vivo que pude leer entre las líneas de esta vida. Poema exquisito que descubrió en mi, un espacio sencillo pero muy rico en colorido y metáforas y que no sé porque mantenía dormido quizá tan solo necesitaba de tus ojos hermososísimos y de tu corazón cálido para abrir este espacio y atreverme a sentir. Te quiero, tu muy bien sabes todo lo que te quiero y la falta que me has hecho por estos últimos años. De todo lo que me enseñaste la lección que más me ha dolido es esa de aprender a ser libre, no sabes como me a costado recorrer este horizonte sin tu vuelo a mi lado, pero me reconforta saber que vivo en ti como tu lo haces siempre en mi.

A *Silvia*: No sabes lo feliz y agradecida que siempre me he sentido por saber que me consideras tu amiga. No sabes todo el apoyo que me has dado y más cuando más lo he necesitado. Siempre he admirado la fuerza y la esencia de la mujer y entre las mujeres que admiro (incluyendo a mi madre, a mi hermana y a Oliva) tu eres una de las mujeres que admiro inmensamente. Sé que sabes, que ahí siempre estoy junto a ti, un poco despistada y media loca, pero soy una loca que te quiere mucho.

A *Benito*: Por su amor y su apoyo incondicional, que considero nunca he estado a su altura. Gracias por todo y quizá te suenen huecas siempre estas palabras, pero realmente nunca fue mi intención lastimarte en ningún aspecto, pero creo que si lo hice, y que me equivoque más de una vez contigo. Te pido una disculpa, sabes, creo que en el fondo ya me has disculpado y que sobre todas las cosas ha sido fuerte nuestra amistad. Quizá por eso, sea la razón por la que aún podemos ser esos amigos que fuimos y recorrían como locos C.U. Te quiero.

A *Jorge*: Que podría decir de ti, mi querido amigo, pues que conocerte ha sido un para mi, una gran experiencia artística. Admiro tanto al artista que llevas dentro, pero aun más a ese ser sensible que a pesar de las "malas" influencias de dos locas (Oliva y yo) que vivían una etapa "oscura" nunca perdiste la fe y la credibilidad por la amistad y que hasta ahora yo, más que nunca lo comprendo. Gracias por esa fuerza que siempre nos transmitiste a todos y por la tarea tan difícil (que en ultimas fechas allá cuando finalizábamos la escuela) te diste por mantenernos juntos, sabes, yo creo que si lo lograste. Por otra parte muchísimas gracias por transmitirme tus conocimientos sobre los dinosaurios porque hasta que te conocí pude darme cuenta de lo maravillosos, impresionantes e interesantes que fueron y siguen siendo estos bellos animales. Gracias, y no se te olvide que te quiero mucho.

*A Leonel:* Porque siempre a sido una persona muy rara pero a la vez muy interesante. Me caes muy bien Leo, siempre me sorprendes, haces cosas rarissimas para despistar al enemigo y mira que me sorprendiste, pues nunca pense que me mencionarias en tu extensa dedicatoria (que esta ya va como la tuya) de tu tesis (que aun no la he leído de primera mano) me lo comentaron, me dio gusto porque sé que a pesar de todo somos amigos. Quizá ya va a ser muy dificil que nos volvamos a encontrar, no lo sé, si ya sé que contigo no he de fiarme y espero que sea así, que me sorprendas, que nos sorprendas a todos y un día como en aquellos viejos tiempos nos organicemos y vayamos todos juntos a la cineteca a ver una buena pelicula. ¿Qué te parece? Yo invito.

*A Mario Vallejo:* Porque sería tonto negar que no has estado en cada una de las cosas que he hecho. Así como también sería una gran mentira decir que no existen los prodigios, las musas, los seres que inspiran de la nada la belleza de nuestro espíritu, todos los trazos y líneas que por tu esencia latieron en mi alma, que no exististe. Gracias por ser.

*A Antonio:* Porque ya no soy la chica que conociste, tan débil, tan cobarde y hoy te puedo escribir así de claro que te quise y no sabes cuanto. Perdón si antes no te lo pude decir, cuando pude, cuando era preciso, pero tengo la esperanza de que quizá lo supiste ver entre mis miedos, entre mis dudas... porque yo si vi tu amor. Pero por algo nuestra historia no tenía que ser, pero aún así, obtuve tanto: "tu maquina del tiempo", "los polvos mágicos" - de los cuales echo mano cuando estoy nerviosa- y la música de tu risa que resquebraja de manera tan precisa el muro de mi soledad. Me diste tanto... y entre ello la certeza de que si me era posible amar. Gracias.

Y Claro esta tesis tambien esta dedicada con muchismo cariño para mis amigochos del laboratorio (Judith, Ethel, Manuel, Beto, Alonso, Memo, Elvira y Sara ) que gracias a ellos fue muy divertido (porque como nos reimos) y agradable la realización de esta tesis. Gracias por su apoyo, por soportarme porque sé bien que a veces me paso de latosa, pero ya saben que los quiero y que siempre estarán en mi corazón. Gracias a ustedes fue muy sencillo todo.

A mi queridísima amiga Ethel, para que vea que la recuerdo mucho, sobre todo sus "regañóns", pero creo que valió la pena, ya no soy tan desordenada. Además muchas felicidades por el próximo bebe. Ojalá y no estés muy triste sin mi en el laboratorio, cuida por mi a las ratitas. Te quiero muchooooo!

A la familia de Manuel, por abirme tan cariñosamente las puertas de su hogar. A la Señora *Caro* y a *Bety* por que son mujeres admirables y son un modelo a seguir, gracias por compartirme sus experiencias. Al señor *Siji* por compartir conmigo muy amablemente su vida siempre en una interesante charla, la cual esta llena de un invaluable conocimiento; gracias, por mostrar a mis ojos ciegos los otros caminos que corren paralelos al nuestro, por quitarles el mito y reivindicarlos con su maravillosa realidad. Ahhhhh y por compartir conmigo sus lecturas.

A la Señora Caro y al señor Siji por que no tengo con nada más, el cómo agradecerles el haber tenido un hijo tan maravilloso y al cual amare siempre. Gracias.

A mis hermanos de otras especies que han compartido conmigo la belleza de nuestro planeta y que han llenado con su compañía espacios básicos de mi alma. Porque saben estar ahí sin pedirle nada a nuestra esencia humana, porque nos dan tanto de una manera tan libre que aun nosotros los humanos no podemos comprender, porque nunca será cosa de razón sino de energías y sentimientos Gracias a ellos a los que estuvieron conmigo en este plano y ya no están y gracias mil gracias a los que aún están: A mi queridísimo Jet, a mi gordita Chispa, al glotón de Robie, a Nicky mi miedoso, a Chivigon el chillonsito y al pequeño de la casa: el bebé Charlot, y claro también a Beka que te extrañamos. Gracias por su amor y por esperarnos siempre tan felices a que regresemos. Ahhhh y no crean que me he olvidado de ustedes pequeñas traviesas Albi, Sasha y Pijita, tambien les dedico esta tesis con mucho amor, gracias mil gracias por cuidar a mi tan amado Manuel con tanto cariño cuando yo no estoy.

A las ratitas Wistar y Sprague D. que sin querer contribuyeron con su vida para la realización de este trabajo. Donde quiera que estén gracias.

Y no podían faltar unas letras sencillas para mi tan admirado cantautor Luis Eduardo Aute, al cual le agradezco su creación musical, poética y sus maravillosos trazos. Gracias por regalarme en tu arte un sin fin de paisajes con los cuales he podido sentir el cuerpo de todo universo.

A todas las personas que a pesar de mis múltiples flaquezas siempre han creído en mi. Gracias.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: *Estudio de la expresión del gen de la insulina en respuesta a los glucocorticoides en diferentes condiciones de cultivo.*

realizado por *Patricia Laura López Conde.*

con número de cuenta *9118617-1* , quién cubrió los créditos de la carrera de: *Biología*

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

**Atentamente**

Director de Tesis  
Propietario

*[Firma]*  
*Dra. Cristina Fernández Mejía*

Propietario

*Dr. Ignacio Camacho Arroyo*

Propietario

*Dr. Christian Humberto Guerra Araiza*

Suplente

*M. en C. Alberto Rojas Ochoa*

Suplente

*Biol. Alejandro Huerta Saquero*

*[Firma]*  
*[Firma]*  
*[Firma]*

**FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.**

**Consejo Departamental de Biología**

*[Firma]*  
**M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez**



**DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGÍA**

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
I Insulina .....	1
1.1. Estructura del gen.....	2
1.1.1. Promotor.....	4
1.1.2. Genes de la insulina de la rata.....	4
1.1.3. Gen de la insulina del humano.....	6
1.1.4. Intrones.....	8
1.2. Regulación de la expresión del gen.....	8
1.3. Síntesis de la insulina.....	12
1.3.1. Regulación de la síntesis de la insulina.....	13
1.3.1.1. Regulación del inicio de la traducción del ARN m.....	13
1.3.1.2. Regulación de la translocación de la cadena preproinsulina naciente mediada por la partícula de reconocimiento de la señal (SRP).....	14
1.3.1.3. Regulación de enlongación de la cadena naciente de Preproinsulina.....	14
1.4. Secreción de la insulina.....	14
1.4.1. Potenciadores de la secreción.....	15
1.4.2. Inhibidores de la secreción.....	16

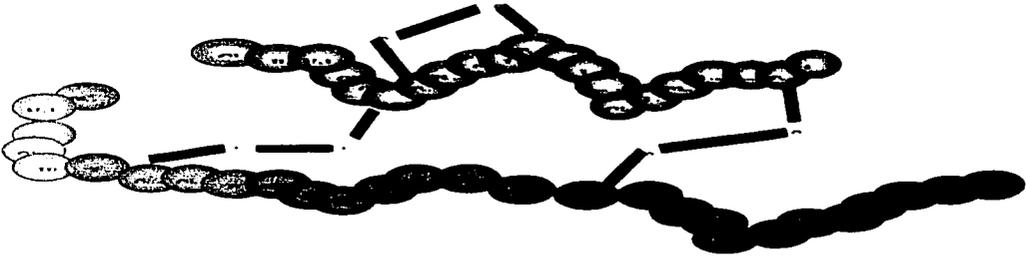
II	Glucocorticoides.....	17
II.1.	Fisiología de la glándula suprarrenal.....	17
II.2.	Efecto de los glucocorticoides sobre el metabolismo de los carbohidratos.....	18
II.3.	Efecto de los glucocorticoides sobre proteínas.....	19
II.4.	Efecto de los glucocorticoides sobre el metabolismo de grasas.....	19
II.5.	Mecanismos de acción de los glucocorticoides.....	20
II.6.	Dexametasona.....	22
III	Regulación del gen de la insulina por glucocorticoides.....	23
III.1.	Elementos de respuesta a los glucocorticoides en el gen de la insulina.....	24
	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
	HIPÓTESIS.....	26
	OBJETIVO.....	26
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
I.	Aislamiento de islotes de Langerhans.....	27
II.	Extracción de ARNm.....	28
III.	Cuantificación del ARN.....	29

IV. Descripción de Oligonucleótidos.....	29
IV.1. Oligonucleótidos para la amplificación del gen de Insulina.....	29
IV.2. Oligonucleótidos para la amplificación del gen de Actina.....	29
IV.3. Oligonucleótidos para la amplificación del gen de Glucocinasa.....	30
V. Técnica de transcripción reversa-reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR).....	30
V.1. Transcripción reversa (RT).....	30
V.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	30
V.2.1. Amplificación del mensajero de la Insulina.....	30
V.2.2. Amplificación del mensajero de la Actina.....	31
V.2.3. Amplificación del mensajero de la Glucocinasa.....	31
RESULTADOS.....	33
DISCUSIÓN.....	38
CONCLUSIONES.....	42
REFERENCIAS.....	43

## INTRODUCCIÓN

### I INSULINA

La insulina es una hormona esencial en la regulación del metabolismo y del crecimiento, la falta de ésta es incompatible con la vida de los vertebrados. Esta hormona peptídica es sintetizada en las células beta pancreáticas (Devaskar y cols. 1994, Giddings y cols. 1985). La insulina es una proteína pequeña con un peso molecular aproximadamente 6000 kDa; es una proteína dimérica, la cadena A (21 aa) y la cadena B (30 aa) se encuentran unidas por puentes disulfuro intermoleculares (figura 1). La proteína es sintetizada como un precursor de cadena simple, denominado pre-pro-insulina. En su procesamiento para transformarse en la molécula activa pierde dos diferentes segmentos para convertirse finalmente en la hormona madura (ver detalles en sección 1.3). La insulina madura es almacenada en gránulos secretores cuya liberación responde al estímulo de glucosa y otros nutrimentos, así como a señales hormonales, neuronales y autócrinas (Henquin, 1994).



**Figura 1.** Secuencia de aminoácidos de la insulina.

Los efectos de la insulina sobre sus tejidos blanco son anabólicos (Pickup y Goseth, 1997). Esta actúa a través de un receptor tipo tirosina cinasa que por medio de una serie de fosforilaciones intracelulares produce su acción (Pickup y Goseth, 1997).

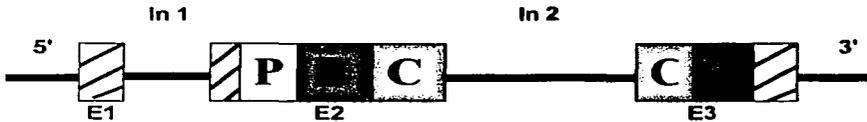
## I 1. ESTRUCTURA DEL GEN.

La estructura de la insulina y los genes que la codifican se han conservado a través de la evolución, reflejando su importancia en la regulación del metabolismo (Pickup y Goseth, 1997). Está conformada de tres exones y dos intrones (Bell y cols. 1980). En el exón 1 está localizada la región 5' no traducible del gen. El exón 2 contiene secuencias que codifican para el péptido señal, la cadena B de la insulina y una parte del péptido C, mientras que el exón 3 codifica para el resto del péptido C, la cadena A de la insulina y secuencias 3' no traducibles (ver figura 2). La longitud y la secuencia de los intrones es altamente variable entre especies, sin embargo la longitud relativa (el intrón 1 es generalmente más corto que el intrón 2) y la posición (el intrón 1 se localiza en la región 5' no traducible y el intrón 2 interrumpe el gen entre el primer y segundo nucleótidos del codón del aminoácido 17 del péptido C) son altamente conservadas. El gen de la insulina está presente como una sola copia en muchos vertebrados incluyendo al hombre, sin embargo en la rata y el ratón, existen dos genes de la insulina, no alélicos, el tipo I y el tipo II, que son sintetizados casi en la misma proporción 52%, 48% respectivamente (Lomedico y cols., 1979; Wentworth y cols., 1986). El intrón 2 está ausente en el gen I de la rata y el ratón. Los genes I y II de la insulina de rata, se encuentran separados uno del otro por 100, 000 Kb en el cromosoma 1 (Soares y cols. 1985), mientras que en humanos el gen que la codifica, esta localizado en el brazo corto del cromosoma 11 y tiene una longitud de 1355 pares de bases (Pickup y Goseth, 1997).

La mayor parte de los estudios sobre la estructura del gen de la insulina se han llevado a cabo en los genes I y II de insulina de rata, y en menor medida en el gen del humano.

El gen I surge del gen ancestral (tipo II) por un evento de transcripción mediado por una duplicación del ARN. El transcrito de ARN involucrado se inició desde un sitio secuencia arriba del promotor normal fisiológico del gen tipo II de la insulina, así, el gen I es homologa al II en cerca de 500 pares de bases secuencia arriba del inicio de la transcripción (Soares y cols. 1985).

### Gen de la insulina humano



**Figura 2.** Estructura del gen de la insulina (tomado de Clark y Docherty, 1992). Disposición de los exones E1-E3 y los intrones (In). Las regiones de la preproinsulina, son : P, B, C y A, son el péptido señal, cadena B de la insulina, péptido C, y cadena A de la insulina respectivamente.

### I 1.1. PROMOTOR.

Como otros muchos promotores, el promotor del gen de la insulina posee una secuencia conservada, la caja TATA (caja o elemento E1), localizada 20 a 30 nucleótidos cadena arriba del inicio de la transcripción. A esta secuencia se le une el factor FIID que marca el sitio de iniciación. (Karlsson y cols. 1987).

Múltiples estudios sobre la expresión de estos genes (revisados por German 1996) han demostrado que existen en el promotor del gen elementos críticos para su expresión tejido específica. A pesar de la gran homología entre las especies, existen diferencias entre estos elementos.

### I 1.2. Genes de insulina de la rata:

La región promotora de los genes de insulina de rata y ratón está constituida aproximadamente por 400 pares de bases y se localiza en la región 5' río arriba al sitio de inicio de la transcripción. Estas secuencias dirigen el inicio correcto de la transcripción de la ARN polimerasa (Walker y cols. 1983), limitan su expresión tejido específica (Cordle y cols.1991), y regulan la transcripción en respuestas fisiológicas.

*Elementos E:* Una de las secuencias claves de la expresión de la insulina consiste en 8 pares de bases con secuencias 5'-GCCATCTG-3'. Estas secuencias corresponden a una clase de reguladores denominados elementos o cajas E, los cuales tienen una secuencia consenso CANNTG y se sabe que están involucrados en la regulación tejido específica tanto en el páncreas como en otros tejidos como músculo y tejido linfático. El gen I de rata posee dos elementos E en tanto que el gen de la rata II solo posee uno. La célula beta contiene varias proteínas nucleares pertenecientes a los factores transcripcionales hélice-asa-hélice (HLH), que se unen a los elementos E. Estas proteínas poseen un dominio

capaz de formar dos hélices anfipáticas separadas por una estructura en forma de asa y se localizan al lado de dominios básicos. El dominio hélice-asa-hélice está involucrado en la dimerización entre las proteínas HLH, mientras que los dominios básicos participan en la unión al DNA del sitio regulador. La secuencia de las cajas o elementos E se une al factor 1 aumentador de la insulina (IEF-1) que está presente en las células  $\beta$  y  $\alpha$  del páncreas, en las células de la pituitaria, pero esta ausente en células no endocrinas. En este caso IEF1 representa un importante factor de transcripción de las células  $\beta$  (Ohlsson y cols. 1988).

*Elementos A:* Otros elementos esenciales en la transcripción del gen de la insulina son los elementos A, un grupo de secuencias de adenina-timina (TAAT). El promotor del gen I de la insulina de rata posee cuatro de estos elementos, en tanto que el gen II solo posee tres, careciendo del más distal de ellos. Los elementos A son de gran importancia para la expresión de genes de la célula beta y el islote. El factor transcripcional STF1 (también conocido como IDX-1, IPF-1 o pdx-1) es una proteína de homodominio perteneciente a la familia de factores transcripcionales hélice-alfa-hélice que se unen a los elementos A. Este factor transcripcional es crítico en el desarrollo del islote pancreático, su carencia o mutaciones en éste durante la gestación dan como resultado la falta de desarrollo del islote (Jonsson y cols. 1994). Se han caracterizado otros factores de transcripción que se unen a estos elementos A y que tienen en común "homeodominios". Estas proteínas incluyen: Isl; cdx-3; lmx-1; HNF1 $\alpha$ ; IEF2 y UIF-1 estando este último presente únicamente en las células  $\beta$ ; y el factor C1 que puede ser importante en la respuesta del gen de la insulina a la estimulación con glucosa (Clark and Docherty, 1992).

La caja E2 y la caja A1 funcionan sinérgicamente. Ninguna de las dos puede funcionar sola, se requiere de ambas para aumentar la actividad transcripcional,

constituyéndose en lo que se ha llamado un mini aumentador E2/A1. (Karlsson y cols. 1989).

Otras secuencias que pueden jugar un papel importante en la regulación de la transcripción del gen tipo I de la insulina, incluyen a la caja G1 (-57 a -40), la cual se une a las ampliamente distribuidas proteínas con dedos de zinc (Pur-1) y un núcleo aumentador situado entre -285 a -332, que se conoce como el "footprint" E1. Así mismo el gen I de la insulina de rata (y en posición equivalente al gen II y al gen humano) existe un elemento de respuesta a AMPc (CRE) en la posición -184 a -177. (Philippe and Missotten, 1990).

Una proteína específica de las células  $\beta$ , se une en la región del promotor y una proteína ubicua relacionada con el factor de transcripción COUP (por sus siglas en inglés; chicken ovalbumin upstream protein) se une en la posición -54 a -45. El papel de estas proteínas y la naturaleza de las diferencias entre los promotores de los genes de insulina de rata permanecen sin esclarecerse (Crowe y cols. 1989)

### I.1.3. Gen de insulina del humano:

A pesar de su homología con los genes I y II de rata, en particular con el primero existen varias diferencias. La característica más importante radica en un elemento polimórfico repetitivo, ILPR. Esta secuencia puede encontrarse de una a varias copias y sirve como marcador genético. ILPR se encuentra compuesto por una repetición de 14 pares de bases de secuencia ACAGGGGTGTGGGG en posiciones posteriores a -880 pb. Esta región posee actividad transcripcional posiblemente producida a través de cambios conformacionales que facilitan la lectura del gen, a mayor número de repeticiones de ILPR, mayor actividad transcripcional (Kennedy y German 1996).

Otra diferencia importante entre los genes de rata y el humano es un elemento inicialmente descrito de regulación negativa, que se encuentra alrededor de la

posición -270 río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Este elemento fue descubierto por Boam y colaboradores en 1990, quienes encontraron que la deleción de los nucleótidos -279 a -258, causaba un gran incremento (25 veces) en la transcripción del gen de insulina y lo designaron como región regulatoria negativa o NRE.

Este sitio de regulación negativa puede estar involucrado tanto en la regulación de la expresión del gen de la insulina como en la respuesta a señales externas como hormonas (Welsh M, 1989; Doherty and Clark, 1994). Goodman y colaboradores en 1996, encontraron que la región NRE es también capaz de unirse a el receptor de glucocorticoides (GR). Sin embargo, resulta interesante señalar que cuando la región NRE es transfectada en cultivos primarios de islotes, y no en líneas celulares, el elemento NRE posee una regulación positiva (Sander y cols. 1998) y los glucocorticoides producen un aumento en su actividad (Fernández-Mejía 1996). Este descubrimiento, aunado a otras observaciones (ver más adelante), indica que la acción de la región NRE depende de los factores transcripcionales presentes en la célula.

Otros sitios reguladores probables en el promotor del gen humano de la insulina, han sido detectados por estudios de unión de proteínas y son las siguientes: La secuencia -167 a -221, contiene dos sitios de respuesta a AMPc (CRE I y CREII) (Inagaky *et al.* 1992). En todas las líneas celulares probadas existen proteínas nucleares que se unen a esta región.

## I 1.4. INTRONES

Los intrones además de ser responsables del procesamiento del ARNm inmaduro, han demostrado ser capaces de modular la expresión de genes (Breitbart y cols. 1987). En el gen de insulina existen secuencias localizadas en el primer intron que regulan la expresión tejida específica del gen de insulina (Damert y cols. 1996) y en el caso del gen humano, responden al efecto del AMPc (Inagaki y cols. 1992). Como se señaló anteriormente, la diferencia más importante entre el gen I y II de la rata y el ratón radica en la falta del intrón 2 en el gen I.

## I 2. REGULACION DE LA EXPRESION DEL GEN.

El control a largo plazo de la producción de insulina está mediado por los cambios en la transcripción del gen; de esta manera la célula  $\beta$  puede restablecer el almacenamiento de insulina, permitiéndole responder a cambios en los niveles de glucosa en sangre a lo largo del día y al mismo tiempo tiene la capacidad de adaptarse a cambios dietarios a largo plazo o a periodos de ayuno. Los mecanismos involucrados en la modulación de ARNm de la insulina han sido estudiados principalmente en sistemas de cultivo.

Uno de los factores más importantes que regulan la expresión de la insulina es la glucosa (Brunsted y cols. 1982, Giddings y cols. 1988, Nielsen y cols. 1985, Hammonds y cols. 1987). La respuesta a este nutriente involucra incremento tanto en la velocidad de transcripción, procesamiento de pre-ARNm y estabilidad del RNAm (Welsh, 1985, Welsh 1988, Wang y cols. 1997). En uno de los primeros estudios, la incubación de islotes de ratón por varios días en altas concentraciones de glucosa resultó en un incremento dramático en los niveles de ARNm. En islotes de humanos y de rata, los efectos en el incremento del ARNm de insulina fueron observados después de 4 horas de incubación con altas

concentraciones de glucosa (Philippe y cols. 1994). Experimentos con quimeras conteniendo la región del promotor del gen de la insulina, ligada al gen reportero de la cloramfenicol-acetil-transferasa (CAT), han demostrado que la actividad del promotor es dependiente de la dosis de glucosa (German y cols. 1992) y que diversas secuencias del promotor del gen de la insulina son activados por este carbohidrato (German y Wang 1994). Esta multiplicidad de respuestas ha sido también observada para otros reguladores fisiológicos como el AMP cíclico y los glucocorticoides (ver más adelante).

Para que la glucosa ejerza su acción reguladora, requiere ser metabolizada. Existe una relación entre la formación de la glucosa-6-fosfato a partir de la glucosa y el incremento de ARNm de la insulina. Un efecto similar se encuentra en los genes de la L-piruvato-cinasa, la acetil-CoA carboxilasa y la S14, esto sugiere el papel mediador de la fosforilización de la glucosa sobre la transcripción ejercida por la glucosa, sin embargo no se sabe la identidad de la molécula involucrada en este proceso. Diferentes secuencias nucleotídicas han demostrado responder al efecto de la glucosa. Los genes de la piruvato cinasa, la sintetasa de ácidos grasos, S14 y la insulina, responden a la acción transactivadora de la glucosa a través de la secuencia CAnnTG o cajas E, a las cuales se le unen factores transcripcionales de la familia de hélice-asa-hélice-cierre de leucina. Para el gen de la insulina, además de la caja E, existen múltiples segmentos del promotor que responden al efecto del carbohidrato, como son las C1 y el elemento A3 (Fernández-Mejía 1998) siendo este último un elemento crítico en la regulación tejido específica del gen de la insulina ( Karlsson y cols. 1987).

La glucosa no sólo es capaz de estimular la transcripción de los genes sino que ha demostrado disminuir la expresión de ellos, paradójicamente este mecanismo fue descubierto en un gen activamente inducido por la glucosa, el gen de la insulina. Esto explica el fenómeno conocido como "glucotoxicidad de la glucosa", proceso que exacerba la hiperglicemia en pacientes diabéticos mal controlados

(Robertson, 1989). En este proceso la hiperglicemia crónica, en vez de estimular la producción de insulina, altera la función de las células beta y produce una disminución de la hormona (Robertson, 1989). Estudios en las líneas pancreáticas HIT-T 15 e INS-1 demostraron que el cultivo sostenido de estas líneas en concentraciones altas de glucosa (11mM), producen una disminución en el ARNm de la insulina debido a una disminución en la actividad del promotor. Esta disminución es independiente de cambios en la proliferación celular o capacidad de la expresión génica de las líneas celulares. El decremento en la transcripción del gen de la insulina es debida a la disminución de la unión de los factores transcripcionales STF-1 y el de STF-1 se debe a una disminución de los niveles de ARNm del factor transcripcional y ocurre a pesar de que la actividad del promotor de este no se ve disminuida, lo que sugiere que el efecto inhibitor de la glucosa sobre STF-1 se efectúa a nivel post-transcripcional (Robertson, 1989).

Además de la glucosa, la L-Leucina y su producto metabólico 2-cetoisocaproato regulan los niveles de ARNm de la insulina, incrementándolo en islotes aislados de rata, lo que indica el papel del metabolismo mitocondrial en la generación de señales que controlan la transcripción del gen de insulina (Docherty and Clark, 1994).

La expresión del gen de la insulina humano y de los roedores se encuentra estimulada por el AMP cíclico (Brunsted et al. 1982, Giddings y cols. 1982 y 1985, Nielsen y cols. 1985, Hammonds y cols. 1987). En las posiciones (-177 a -184 pb) de gen de la rata han sido identificadas secuencias nucleotídicas de respuesta al AMP cíclico (CRE) (Philippe y Missoten 1990a). En el gen del humano cuatro elementos de respuesta al AMPcíclico han sido caracterizados, dos de ellos se localizan en el promotor (posición -221 a -195 y posición -189 a -167), uno de ellos en el primer exón (+16 a +31) y el último de ellos en el primer intrón (+57 a +73) (Inegaki y cols. 1992). La secuencia de CRE 2 del gen humano (TGACGACC) es similar a CRE presente en el gen I de la rata

(TGACGTCC). Esta secuencia se une al factor proteico nuclear con peso molecular de 43,000 similar o idéntico a la proteína que ha demostrado unirse a CRE en otros genes (Oetjen y cols. 1994).

Las hormonas sexuales (Magnaterra y cols. 1997, Weinhouse y cols. 1996), la hormona tiroidea (Fernández-Mejía and Davidson 1992, Fernández-Mejía y cols. 1993), y el ácido retinóico son otros de los factores que modifican la expresión de la insulina; estas hormonas se encuentran involucradas en el proceso regulador del desarrollo y es posible que puedan intervenir en el proceso de diferenciación celular del islote (Fernández-Mejía and Davidson 1992, Clark y cols. 1995, Cabrera-Valladares y cols. 1999). Los neurotransmisores (Jones and Persaud, 1998) así como los glucocorticoides (ver Sección III), también son factores que afectan la expresión del gen de la insulina.

La expresión del gen de la insulina es regulada también a través de la vida media del ARNm. La glucosa afecta la vida media del ARNm de la insulina, lo cual midiendo la tasa de decaimiento del ARNm de insulina marcado con  $^3\text{H}$ -uridina en islotes incubados en presencia y ausencia del inhibidor transcripcional, actinomicina D. El ARNm de la insulina se encontró relativamente estable, con una vida media de 30 h. Esta vida media fue casi tres veces más larga en islotes con 17 mM de glucosa comparados con 3.3 mM de glucosa (Docherty and Clark 1994). También los glucocorticoides tienen efectos sobre la vida media del ARNm de la insulina. La dexametasona desestabiliza el ARNm regulando negativamente la expresión del gen de insulina en células HIT T-15 (Philippe and Missoten, 1990).

### 13. SINTESIS DE LA INSULINA

La insulina es sintetizada por las células  $\beta$  del páncreas, como una pre-hormona que es procesada después de su traducción, para dar una molécula biológicamente activa (Feling and Bergman, 1995).

La maduración del transcripto primario produce un ARNm de 600 nucleótidos cuya traducción da lugar a la pre-pro-insulina que es un polipéptido de 11.5 kD que se dirige al retículo endoplásmico rugoso (RE), donde enzimas proteolíticas segmentan la pre-pro-insulina en pro-insulina removiendo el denominado péptido señal (Pickup y Goseth, 1997). El péptido señal actúa como una contraseña que dirige el transporte de la proteína naciente desde los ribosomas al RE. Este proceso involucra la interacción con una partícula de reconocimiento citosólica (SRP), la cual causa una asociación del complejo con el receptor SRP presente en el RE (Baillyes y cols. 1992).

La pro-insulina es un péptido de 9 kDa que contiene las cadenas A y B de la insulina (de 21 y 30 residuos de aminoácidos respectivamente) unidas por el péptido C (30-35 aminoácidos). La conformación estructural de la pro-insulina y de la insulina son muy similares, y la función principal del péptido C es la de alinear los puentes disulfuro que unen las cadenas A y B; de este modo la molécula es plegada (Pickup y Goseth, 1997).

La pro-insulina es transportada por microvesículas al aparato de Golgi en donde es empaquetada en vesículas limitadas por membranas que contienen una bomba de protones dependiente de ATP (Pickup y Goseth, 1997).

La conversión de pro-insulina en insulina es iniciada en el aparato de Golgi y continúa dentro de gránulos secretores maduros por la acción de las

endopeptidasas (pro-hormona convertasa 2 y 3) y la carboxipeptidasa H. Estas enzimas aseguran una rápida segmentación en sitios específicos, previniendo una fragmentación posterior de la insulina; actúan juntas para remover la cadena del péptido C, liberando dos dipéptidos segmentados formando finalmente la insulina (Pickup y Goseth, 1997).

La insulina y el péptido C son almacenados juntos en los sacos granulares y son finalmente liberados en concentraciones equimolares; bajo condiciones normales, 95% del producto hormonal es secretado como insulina y menos del 5% como pro-insulina no convertida (Pickup y Goseth, 1997).

### I 3.1. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE LA INSULINA.

La regulación de la síntesis de esta hormona se efectúa a nivel de inicio de la traducción del ARNm de la pre-pr-oinsulina, la regulación de la translocación de la cadena de pre-pro-insulina naciente mediada por la partícula de reconocimiento de la señal (SRP) y/o la elongación de la cadena naciente de pre-pro-insulina.

I 3.1.1. *Regulación del inicio de la traducción del ARNm* Un análisis de la distribución celular del RNAm de la pre-pro-insulina en islotes pancreáticos de la rata, sugiere que la glucosa incrementa la tasa de inicio de la traducción. La exposición de islotes a glucosa, a concentraciones mayores de 3.3 Mm, resultó en un incremento en la transferencia del ARNm de insulina desde el citoplasma a las fracciones subcelulares que contienen ribosomas y polisomas (Baillyes y cols. 1992).

I 3.1.2. *Regulación de la translocación de la cadena de pre-pro-insulina naciente mediada por la partícula de reconocimiento de la señal (SRP).* Investigaciones sobre traducción *in vitro* en homogenados de islotes indican que la estimulación de la producción de la pre-pro-insulina por glucosa, puede ser el resultado de un incremento en la asociación del complejo de iniciación por el receptor SRP. La adición de receptor a SRP purificado de páncreas de perro a homogenados de islotes, incrementa la incorporación de la tirosina-<sup>125</sup> a la pre-pro-insulina. Esta respuesta fue aún mayor cuando los islotes se incubaron en glucosa 16.5 mM; lo que indica que en islotes estimulados con glucosa la SRP puede ser alterada estructuralmente, aumentando la interacción con su receptor (Baillyes y cols. 1992).

I 3.1.3. *Regulación de elongación de la cadena naciente de pre-pro-insulina.* La tasa de elongación tradicional de la pre-pro-insulina puede ser regulada específicamente por glucosa. Esto se ha demostrado en experimentos sobre la biosíntesis de pre-pro-insulina bajo condiciones en las que la enlongación es la etapa limitante, por ejemplo en presencia de bajas concentraciones de cicloheximida. La síntesis de pro-insulina fue estimulada por glucosa a concentraciones superiores a 5.6 mM, la síntesis de otras proteínas no fue afectada por glucosa. La estimulación tiene lugar sin ningún cambio en la distribución intracelular del ARNm de la pre-pro-insulina y esto sugiere un incremento en la tasa de elongación de la cadena polipeptídica (Baillyes y cols. 1992).

#### I 4. SECRECIÓN DE LA INSULINA

La secreción de insulina ocurre de manera basal y estimulada. La basal tiene una duración de 9 a 14 minutos en el humano y su periodicidad es inherente a la célula beta posiblemente modulada por mecanismos neurales. Estímulos

hormonales intra islote y otros secretagogos pueden afectar la secreción estimulada de insulina ( Ashcroft, 1992).

La secreción de insulina en respuesta a la glucosa se efectúa a las concentraciones post-prandiales de glucosa. La primera etapa en la serie de mecanismos bioquímicos involucrados en la secreción está dada por la entrada de glucosa a la célula beta. Ésta se efectúa a través del transportador GLUT2, cuya alta Km por la glucosa (15-20 mM) le permite la entrada al azúcar en un amplio rango de concentraciones plasmáticas. Una vez dentro de la célula la glucosa requiere ser catabolizada. El primer paso del catabolismo de la glucosa a concentraciones secretagogas está dado por la enzima glucocinasa, la cual fosforila a la glucosa para la formación de glucosa-6-fosfato.

La glucosa-6-fosfato continua su catabolismo a través de la vía glucolítica y posteriormente su oxidación en la mitocondria. Esta oxidación produce un aumento de la relación ATP/ADP, que a su vez produce el cierre de canales de potasio sensibles a ATP, ocasionándose con esto una despolarización de la membrana plasmática (Ashcroft, 1992), hasta alcanzar una fase de meseta en donde se superponen potenciales de acción debidos a la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de canales dependientes de voltaje (Misler y cols. 1992; Newgard and McGarry, 1995). El incremento de calcio en el citosol activa a la calmodulina, la cual activa a dos proteínas cinasas las que producen la fosforilación de miosina y tubulina, quienes a su vez favorecen el movimiento y fusión con la membrana plasmática de los gránulos de insulina, liberándose así la hormona al exterior de la célula  $\beta$  (Ashcroft, 1992).

#### 14.1. Potenciadores de la secreción

Los potenciadores de la secreción de insulina inducida por glucosa, incluyen al glucagon, acetilcolina (Ach), vasopresina, péptido intestinal vaso activo, péptido

gástrico inhibidor (GIP), colicistocinina (CCK) y bombesina entre otros. Algunos como la Ach y la CCK, activan la ruta de los fosfoinosítidos de membrana a través de la activación de la fosfolipasa C (PLC), que produce un incremento de segundos mensajeros como inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El incremento en el IP3 lleva a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares y el DAG provoca la activación de la proteína cinasa C (PKC), lo que conduce a la sensibilización al calcio de la maquinaria secretora de la célula beta.

Otros potenciadores como el glucagon y el GIP activan a la enzima adenilato ciclasa (AC), lo que da como resultado un incremento en el AMPc que a su vez activa a la proteína cinasa A (PKA) que participa en la fosforilización de proteínas del citoesqueleto que desempeñan un papel fundamental en la secreción de insulina (Jones and Persaud, 1998).

#### 1 4.2. Inhibidores de la secreción

Los inhibidores de la secreción de insulina actúan en diferentes etapas del proceso secretor, entre ellos se encuentra la inhibición de la actividad eléctrica y el flujo de iones y la disminución de segundos mensajeros intramoleculares como  $\text{Ca}^{2+}$  y AMPc. La adrenalina, galanina y somatostatina, por ejemplo, inducen la actividad eléctrica de las células beta, hiperpolarizan la membrana plasmática debido a la activación de canales de  $\text{K}^{+}$  regulados por proteína G. Estos tres agentes, actúan así mismo, disminuyendo la actividad de la AC y la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  libre (Jones and Persaud, 1998).

la glucosa -6-fosfatasa y la fructosa -2-6-disfosfatasa (Pilkis y Granner, 1992). También tienen un efecto favorable al incrementar la respuesta hepática a hormonas gluconeogénicas (glucagón, catecolaminas) y aumentan la liberación de sustratos de tejidos periféricos, principalmente de músculo (Greenspan and Baxter, 1995). El efecto neto de los glucocorticoides consta de un incremento de la glucemia. Debido a esas acciones sobre el metabolismo de la glucosa, la terapia con glucocorticoides puede empeorar el control en pacientes con diabetes y precipita el inicio de hiperglucemia en sujetos con predisposición genética (Hardman,1996).

### II. 3. -Efecto de los glucocorticoides sobre las proteínas

Uno de los principales efectos de los glucocorticoides es la disminución de las reservas de proteínas en prácticamente todas las células excepto en las hepáticas. Esta reducción se debe tanto a la disminución de la síntesis de proteínas como al aumento del catabolismo de las presentes en la célula. Por otro lado deprime la síntesis de ARN en muchos tejidos (excepto el hígado) incluyendo, en particular el músculo y el tejido linfoide (Guyton, 1994).

### II. 4. -Efecto de los glucocorticoides sobre el metabolismo de grasas

Los glucocorticoides también favorecen la hidrólisis de triglicéridos (Schmidt, 1993), aumentando así la movilización de ácidos grasos del tejido adiposo y por ello, incrementan la concentración de ácidos grasos libres en plasma. Así mismo los glucocorticoides aumentan moderadamente la oxidación de los ácidos grasos en la célula, quizá como resultado secundario de la menor disponibilidad de productos glucolíticos para el metabolismo (Guyton, 1994).

## II. GLUCOCORTICOIDES

Los corticoesteroides son hormonas esteroideas derivadas del colesterol. Se conforman por los mineralocorticoides que regulan la función renal, y los glucocorticoides, que tienen acciones generalizadas tales como, antiinflamatorios, movilización de aminoácidos y glucosa (Rann,1989).

### II. 1. Fisiología de la glándula suprarrenal.

La glándula suprarrenal, está situada en la parte superior del riñón, está compuesta por dos tejidos funcional y embriológicamente no relacionados, una corteza exterior y una médula interior (Eckert,1990).

Las células de la corteza suprarrenal son estimuladas por la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) para sintetizar y secretar glucocorticoides, mineralocorticoides y andrógenos débiles (Hardman, 1996). El nivel basal de la secreción de los glucocorticoides se mantiene mediante su acción de retroalimentación sobre las neuronas hipotalámicas secretoras de la hormona liberadora corticotropina (CRH) y sobre la adenohipófisis. El nivel basal de glucocorticoides está sometido a un ritmo diario, resultado de la variación cíclica de CRH que parece estar controlada por un reloj biológico endógeno. Los niveles basales, en el hombre, son máximos en las primeras horas de la mañana antes de despertar (Ecker,1990).

Por otro lado, la corteza suprarrenal es estimulada para liberar glucocorticoides en respuesta a distintos tipos de estrés (incluido el ayuno). El estrés actúa a través del sistema nervioso provocando una elevación en la ACTH de ahí la estimulación de la corteza suprarrenal (Ecker,1990).

Los glucocorticoides son agentes que aceleran la degradación proteica e inhiben la captación de aminoácidos y la síntesis de proteínas en tejidos extra hepáticos. Estos actúan sobre el hígado incrementando la síntesis de enzimas que favorecen la gluconeogénesis. La glucosa producida de "novo" es liberada a la circulación, causando un incremento en los niveles de glucosa en sangre. Los glucocorticoides también reducen la captación de glucosa en el músculo y el tejido adiposo a través de una resistencia a la acción de la insulina. Otro efecto de estos, es la movilización de ácidos grasos desde depósitos de grasa en el tejido adiposo; esto tiene efecto en el incremento de sustrato aprovechable para la gluconeogénesis en el hígado (Eckert, 1990). Todas estas acciones tienden a producir hiperglucemia (es decir, incremento de los niveles de glucosa sanguínea). Los glucocorticoides poseen diferentes efectos sistémicos entre los que se encuentran efectos antiinflamatorios. Por otro lado, estos también incrementan la excreción urinaria de calcio y sodio, aumentan el gasto cardiaco e incrementan el tono vascular periférico (Greenspan, 1995).

## II. 2. -Efecto de los glucocorticoides sobre el metabolismo de los carbohidratos

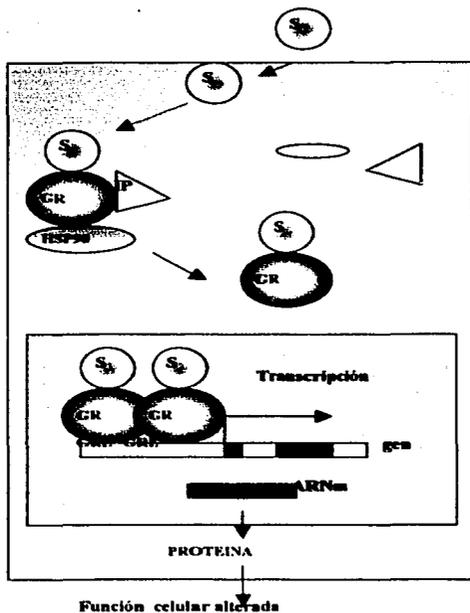
Los glucocorticoides ejercen efectos importantes sobre el metabolismo de carbohidratos y proteínas ( ver sección II.3). Sus efectos sobre el metabolismo intermediario pueden considerarse como protectores de los tejidos dependientes de glucosa (p.ej., cerebro y corazón) contra la inanición. Esto se logra al estimular al hígado para formar glucosa a partir de aminoácidos, glicerol y glucógeno hepático. En músculo y tejido adiposo, los glucocorticoides disminuyen la utilización de glucosa a través de aumentar la desintegración de proteínas y activar la lipólisis, con lo que se proporcionan aminoácidos y glicerol para la gluconeogénesis (Hardman,1996). En el hígado, los glucocorticoides inducen la transcripción de enzimas involucradas en el metabolismo de los aminoácidos y de enzimas gluconeogénicas, entre ellas la fosfoenolpiruvatocarboxinasa (PEPCK),

## II. 5. -Mecanismos de acción de los glucocorticoides.

Para producir sus efectos biológicos, los glucocorticoides penetran a la célula blanco por difusión pasiva (figura 3), dentro de ella, interaccionan con su receptor (GR), el cual es reconocido como miembro de la super familia de proteínas fijadoras al ADN que responden a ligandos y que tienen una estructura de dedos de zinc que les permite interactuar con el DNA. Este receptor se localiza en citoplasma asociado a proteínas chaperonas, la más conocida es la proteína de choque térmico Hsp90. Al unirse el receptor a los glucocorticoides el primero se disocia de Hsp90, lo que permite la migración del complejo hormona-receptor, hacia el núcleo, uniéndose a secuencias de DNA denominadas elementos de respuesta de glucocorticoides (GRE), de esta manera se produce una remodelación de la cromatina, activándose o inactivándose así la transcripción (Beato y Klug 2000).

Los glucocorticoides son también capaces de modular la transcripción a través de la interacción proteína-proteína con otros factores transcripcionales. Este tipo de mecanismo es usado principalmente en la regulación negativa de los glucocorticoides, a través de la inhibición de la interacción de factores transcripcionales de acción positiva con sus elementos de respuesta. La más conocida de estas interacciones, es la que se lleva a cabo con factores transcripcionales tipo cierres de leucina, como AP-1 y Jun, y con el factor transcripcional NF- $\kappa$ B, un factor transcripcional importante en la respuesta inmune (Beato y Klug 2000).

Existen evidencias de que los glucocorticoides pueden también actuar a nivel no genómico, posiblemente a través de receptores unidos a membrana y de naturaleza diferente al receptor clásico de dedos de zinc (Hardman, 1996).



**Figura 3.- Mecanismo intramolecular de acción del receptor de glucocorticoides.**

Se muestra la vía molecular por la cual los glucocorticoides (S) entran a las células e interactúan con el receptor de glucocorticoide (GR) para cambiar la conformación del receptor de glucocorticoide e inducir la translocación nuclear del receptor para activar la transcripción de genes precondicionados. HSP90, proteína a de choque de 90 K Da; GRE, elementos de respuesta a glucocorticoides en el ADN.

## II. 6.-Dexametasona

La dexametasona (figura 5) es un glucocorticoide estable que tiene propiedades de corticoesteroide y es utilizado como anti-flamatorio, suprime la migración leucocitaria, reduce la actividad de los fibroblastos, revierte los efectos capilares de la histamina e inhibe la formación de anticuerpos, otra propiedad es la de antirreumático, también tiene efectos inmunosupresores en una gran variedad de trastornos (Rodríguez, 1995). El tratamiento con altas dosis de dexametasona es utilizado para tratar la oftalmopatía de la enfermedad de Graves. La dosis recomendada para su utilización esta en el rango de 0.5mg/Kg.

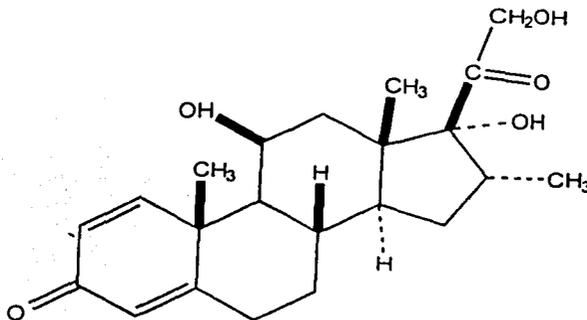


Figura 4.- Estructura de la dexametasona

### III. REGULACIÓN DEL GEN DE INSULINA POR GLUCOCORTICOIDES.

Como se señaló en la Sección II los glucocorticoides modifican el metabolismo de los carbohidratos. La administración *in vivo* de glucocorticoides aumenta la expresión del gen de la insulina. Este efecto es el resultado de una resistencia a la insulina producida por estos compuestos en los tejidos periféricos (músculo y adipocitos). Esta resistencia periférica estimula a la célula beta a sintetizar y secretar más insulina para contrarestar la resistencia.

En estudios *in vitro* existen discrepancias sobre el efecto de los glucocorticoides sobre la expresión del gen de la insulina. Las diferencias se encuentran tanto en líneas celulares como en cultivos primarios. Estudios en líneas celulares encuentran que la dexametasona produce un aumento en los niveles de ARNm de la insulina en la línea de insulinoma de rata RINm 5F (Fernández-Mejía y Davidson, 1992); en contraste en las líneas de Hamster NRI-G9 y HIT-T15 y en la línea de rata RIN 056A la dexametasona produce una disminución en los niveles de ARNm de insulina (Philippe and Missoten 1990, Wang y cols. 1991).

En el modelo experimental de cultivos primarios de islotes de Langerhans, también se han reportado diferencias en el efecto de los glucocorticoides sobre la expresión de la insulina. Por una parte Philippe y colaboradores en 1992, encontraron que los glucocorticoides aumentan los niveles de ARNm. Por otro lado estudios efectuados por Gremlich y colaboradores en 1997 encontraron que el tratamiento con dexametasona  $1\mu\text{M}$  en islotes, no produjo ninguna modificación sobre los niveles de ARNm de la insulina. Y finalmente en estudios realizados por Fernández-Mejía (no publicados), se encontró que el tratamiento con dexametasona disminuye el ARNm de la hormona. Las discrepancias de estos resultados podrían deberse a las diferentes condiciones de cultivos de los islotes. El análisis de los métodos usados, indica que existe diferencia en la presencia de

suero en los cultivos, ausente en los estudios de Phillippe, parcialmente presente en los estudios de Gremlich y presente durante todo el proceso en los estudios de Fernández-Mejía.

Otro nivel de complejidad en el efecto de los glucocorticoides sobre la expresión de la insulina se encuentra dado por las interacciones celulares en los islotes, ya que estudios efectuados por Phillippe *et al.* 1992 encontraron que cuando las interacciones nativas del islote se encuentran íntegras, el efecto de los glucocorticoides se ve traducido en un aumento en los niveles del ARN mensajero; en tanto que cuando las células del islote se encuentran disgregadas, la expresión del gen de la insulina es regulada negativamente por la dexametasona. Este efecto negativo sobre los islotes disgregados es anulado en presencia de AMP cíclico. Sin embargo, estudios en nuestro laboratorio demostraron que el efecto de la dexametasona es similar en islotes íntegros y disgregados, y que esta respuesta es independiente de la presencia de AMP cíclico (Fernández-Mejía, observaciones no publicadas).

Estudios sobre el mecanismo de acción de los glucocorticoides en la línea celular de células beta HIT revelaron que su efecto involucra una acelerada degradación del ARN mensajero de la insulina (Phillippe y Missoten 1990).

*III.1 Elementos de respuesta a los glucocorticoides en el gen de la insulina.* En nuestro laboratorio se ha estudiado el efecto de los glucocorticoides sobre el promotor del gen de la insulina humano. En líneas celulares nuestros estudios encontraron una secuencia en las posiciones -271 a -264 del promotor del gen de la insulina capaz de unirse al GR de glucocorticoides (Goodman et al 1996). El análisis de esta región identificó la secuencia **ATGTCTCCAGGAGAG** que posee una analogía del 73% con el elemento de respuesta negativo reportado para los glucocorticoides (GREn). En experimentos posteriores a esta publicación encontramos que otras secuencias del promotor de la insulina poseen también la

capacidad de responder al efecto de la dexametasona, sin que existan elementos consenso para glucocorticoides en estas secuencias (Fernández-Mejía et al. 1999). Estos estudios en conjunción con los de Sharma y cols. (1997), quienes encontraron que la dexametasona disminuye la expresión del factor transcripcional STF-1 sugieren que los glucocorticoides decremantan la expresión de factores transcripcionales específicos de las célula beta y como consecuencia se produce la disminución de la expresión del gen de la insulina.

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Existen discrepancias en los resultados obtenidos en los estudios analizando sobre el efecto de la dexametasona sobre la expresión del ARNm de la insulina. Las diferencias se encuentran tanto entre líneas celulares y cultivos primarios, como entre un mismo modelo experimental. En cultivos de islotes de rata se ha encontrado que los glucocorticoides aumentan (Phillippe y cols. 1992), no tienen efecto (Gremlich y cols. 1997) o disminuyen (Fernández-Mejía, observaciones no publicadas) los niveles de ARN mensajero de la insulina. Las discrepancias de estos estudios podrían deberse a las diferentes condiciones de cultivo. El análisis de la metodología usada en estos estudios indica que existen diferencias en el uso de suero en los cultivos, el cual se encuentra ausente en los estudios de Phillippe, parcialmente presente en los estudios de Gremlich y presente durante todo el proceso en los estudios de Fernández-Mejía. Por otro lado Sharma y cols. (1997), encontraron que la dexametasona afecta la expresión de la insulina a través de la modificación de factores transcripcionales específicos de la célula beta. Dado que el suero en el medio de cultivo posee factores de crecimiento que pueden afectar a los factores transcripcionales, nosotros proponemos analizar si el efecto de los glucocorticoides sobre el ARNm maduro de la insulina es dependiente de suero.

## **HIPOTESIS.**

**El efecto de la dexametasona sobre los niveles del ARNm de la insulina depende de la presencia o ausencia de suero en el medio de cultivo.**

## **OBJETIVO.**

**Determinar el efecto del glucocorticoide dexametasona a una concentración 1 $\mu$ M sobre los niveles de ARNm de la insulina en presencia o ausencia de suero en el medio de cultivo.**

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### I) Aislamiento de islotes de Langerhans.

Ratas macho de la cepa Wistar de 200-250 gramos de peso, alimentadas *ad libitum*, fueron anestesiadas con pentobarbital sódico. La cirugía para obtener el páncreas se efectuó a través de una inyección de solución de Hank's, frío 4°C (suplementado con BSA 4% disuelta en sales de Spinner) en el conducto pancreático. Una vez separado el páncreas de los tejidos circundantes, el tejido fue colocado en un vaso de precipitados conteniendo 3 mg de colagenasa tipo P (Boehring Mannheim, Alemania) por cada páncreas, inmediatamente se llevó a cabo una fragmentación con tijeras por 3 minutos hasta lograr fragmentos de un milímetro de diámetro aproximadamente. Posteriormente se colocaron en un matraz de plástico en los cuales se llevó a cabo la digestión con la colagenasa durante 10 minutos a 37°C en baño con agitación (Precision Scientific Modelo 25). Una vez terminada la digestión los islotes fueron lavados dos veces con solución Hank's, y la separación de éstos del tejido acinar se llevó a cabo por medio de una centrifugación bajo un gradiente de Ficoll (SIGMA) al 27, 23, 20 y 11%. Después de una centrifugación a 2,000 rpm sin freno en una centrifuga Beckmann modelo GS15R durante 10 minutos, se recuperaron los islotes presentes entre la capa 20 y 11% de Ficoll. Después éstos se lavaron dos veces con Hank's frío para quitar el exceso de Ficoll. Finalmente se recolectaron manualmente bajo microscopio de disección.

Los islotes, separados en grupos de aproximadamente 150, fueron sembrados en cajas de cultivo multipozos de 24 pozos y fueron incubados para su recuperación por 17 hrs en una incubadora a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en un medio de cultivo RPMI (GIBCO BRL) suplementado con Suero Bovino Fetal (SBF) al 10%, 11mM de glucosa y antibiótico-antimicótico (IN.VITRO).

Después del tiempo transcurrido, los islotes fueron recolectados manualmente en tubos Eppendorf para ser lavados con medio de cultivo (RPMI SBF 10% +11 mM glucosa + antibiótico-antimicótico) y ser centrifugados a 3000 rpm en una centrifuga Sorvall modelo RMC 14 por 3 minutos . Se les retiró el sobrenadante y se sembraron en las siguientes condiciones experimentales: a) *Medio conteniendo suero*: 150 islotes por condición, en medio de cultivo RPMI suplementado con SBF al 10%, 11 mM de glucosa y antibiótico-antimicótico, en presencia o ausencia de  $1\mu\text{M}$  de dexametasona. b) *Medio sin suero*: 150 islotes por condición en medio de cultivo RPMI suplementado con albumina bovina (BSA) al 0.5%, 11Mm de glucosa y antibiótico-antimicótico, en presencia o ausencia de  $1\mu\text{M}$  de dexametasona. Después de incubarse por 24 hrs a 37C y 5% CO<sub>2</sub>, se colectaron los islotes en tubos Eppendorf para ser centrifugados a 3000 rpm en una centrifuga Sorvall modelo RMC 14 durante 3 minutos. Se les quitó el sobrenadante y se les agregaron 800  $\mu\text{l}$  de trizol.

## II) Extracción de ARN

El ARN fue extraído del paquete celular por la adición de 800  $\mu\text{l}$  de Trizol. Después de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente se les agregaron 160  $\mu\text{l}$  cloroformo, con el fin de separar las fases donde se encuentran las proteínas y los ácidos nucleicos. La mezcla fue agitada en un vortex, dejándose incubar por 5 minutos para posteriormente ser centrifugada en un equipo Sorvall modelo RMC 14 a 10,000 r.p.m. por 15 minutos a 4 °C. El ARN contenido en la fase acuosa de la mezcla fue precipitado con 400  $\mu\text{l}$  de isopropanol incubándose a -20 °C toda la noche. El precipitado posteriormente fue centrifugado a 12,000 r.p.m. por 10 minutos a 4 °C y desechado el sobrenadante por decantación. Se lavó y resuspendió el ARN en etanol al 70%. Se procedió a la recuperación del precipitado por medio de una centrifugación a 12,000 r.p.m. por 5 minutos a 4 °C, desechándose nuevamente el sobrenadante.

El botón de ARN así obtenido secado por evaporación a temperatura ambiente y resuspendido en agua bidestilada estéril (25-30  $\mu$ l) incubándose a 55-60 °C durante 10 minutos para facilitar su completa solubilización. El ARN se mantuvo a -70 °C hasta ser analizado.

### III) Cuantificación del ARN

La cuantificación del ARN se llevó a cabo por medio espectrofotometría, para lo cual se diluyó en agua (dilución 1:250) tratada previamente con dietilpirocarbonato (DEPC). La densidad óptica de la solución fue leída a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro (Milton Roy GENESYS 5 ). Se descartaron las muestras cuya relación 260/280 fuera menor a 1.8.

### IV) Descripción de los oligonucleótidos.

#### a) *Oligonucleótidos para la amplificación del gen de insulina.*

Los oligonucleótidos del gen de la insulina fueron diseñados con base en las secuencias reportadas en el Gene Bank.

-Oligonucleótido sentido

(5'-3') ATT GTT CCA ACA TGG CCC TGT

La secuencia de este oligo corresponde a los nucleótidos 46 a 66 del gen de la insulina 1.

-Oligonucleótido antisentido

( 5'-3') TTG CAG TAG TTC TCC AGT TGG

La secuencia de este oligo corresponde a los nucleótidos 368 a 386 del gen de la insulina 1.

#### b) *Oligonucleótidos para la amplificación del gen de Actina.*

Los oligonucleótidos del gen de la actina fueron diseñados con base en las secuencias reportadas en el Gene Bank.

-Oligonucleótido sentido:

(5'-3') GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG

-Oligonucleótido antisentido:

(5'-3') GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG

c) *Oligonucleótidos para la amplificación del gen de Glucocinasa.*

Los oligonucleótidos del gen de la glucocinasa fueron diseñados con base en las secuencias reportadas en el Gene Bank.

-Oligonucleótido sentido:

(5'-3') GCT TCA CCT TCT CCT TCC C

-Oligonucleótido antisentido:

(5'-3') CCC ATA TAC TTC CCA CCG A

V) Técnica de transcripción reversa-reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR).

a) Transcripción reversa (RT).

Para obtener el cDNA del ARNm obtenido de los islotes, en un eppendorf nuevo y estéril (que se mantuvo en hielo durante todo el proceso) se realizó la mezcla de los siguientes reactivos de acuerdo a las indicaciones técnicas del producto : Buffer [1.25X], DDT [5 mM] desoxinucleótidos [0.5 mM], oligonucleotidos de desoxitimidina [5 ng], transcriptasa reversa [10 U/ $\mu$ l ] (GIBCO BRL) .3  $\mu$ g de ARN total y se llevó a 20  $\mu$ l de volumen total con agua tratada con dietilpirucarbonato. Se agitó perfectamente en vortex y se incubo la mezcla a 37 °C por una hora en un termociclador modelo PTC 100 de la marca Perkin-Elmer.

c) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

*Amplificación del mensajero de insulina:* Para la amplificación del ARNm de la insulina en un eppendorf nuevo y estéril (que se mantuvo en hielo durante todo el proceso), se realizó la mezcla de los siguientes reactivos de acuerdo a las indicaciones técnicas del producto: Buffer [ 1X], MgCl<sub>2</sub> [ 1.5 mM], dNTPs [ 0.2

mM], oligonucleotidos de insulina: (sentido)[ 0.51  $\mu$ M] / (antisentido)[ 0.51  $\mu$ M], DMSO [ 3%] , 28.1  $\mu$ l de agua inyectable, Taq polimerasa[ 0.05 U/ $\mu$ l] (Biotecnológicas Universitarias) y 5  $\mu$ l cDNA, obteniendo un volumen final de 50  $\mu$ l. Los tubos se agitaron perfectamente en vortex y se colocaron en el termociclador Applied Biosystems/ Gene Amp. PCR System 2400. Para realizar la amplificación se usaron las siguientes condiciones: Una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos. Las condiciones de amplificación fueron, 1 minuto de desnaturalización a 94 °C , un apareamiento a °57 C por 2 minutos y 1 minuto de síntesis a 72 °C. Estas condiciones se mantuvieron por 20 ciclos. Al término de estos se mantuvo la reacción de amplificación a 72 °C por 7 minutos.

*Amplificación del mensajero de actina:* Para la amplificación del ARNm de la actina en un eppendorf nuevo y estéril (que se mantuvo en hielo durante todo el proceso), se realizó la mezcla de los siguientes reactivos de acuerdo a las indicaciones técnicas del producto: Buffer [ 1X], MgCl<sub>2</sub> [ 1.5 mM], dNTPs [ 0.2 mM], oligonucleótidos de actina: (sentido)[ 0.51  $\mu$ M] / (antisentido) [ 0.51  $\mu$ M], DMSO [ 3%] , 28.1  $\mu$ l de Agua inyectable, Taq polimerasa[ 0.05 U/ $\mu$ l] (Biotecnológicas Universitarias) y 5  $\mu$ l cDNA, obteniendo un volumen final de 50  $\mu$ l. Se agitó perfectamente en vortex y se colocaron en el termociclador Applied Biosystems/ Gene Amp. PCR System 2400. Para realizar la amplificación se usaron las siguientes condiciones: Una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos. Las condiciones de amplificación fueron, 30 segundos de desnaturalización a 94 °C , un apareamiento a 55 °C por 30 segundos y 30 segundos de síntesis a 72 C. Estas condiciones se mantuvieron por 35 ciclos. Al término de estos, se mantuvo la reacción de amplificación a 72 °C por 5 minutos.

*Amplificación del mensajero de glucocinasa:* Para la amplificación del ARNm de la glucocinasa en un eppendorf nuevo y estéril (que se mantuvo en hielo durante todo el proceso), se realizó la mezcla de los siguientes reactivos de acuerdo a las indicaciones técnicas del producto: Buffer [ 1X], MgCl<sub>2</sub> [ 1.5 mM], dNTPs [

0.2 mM], oligonucleótidos de glucocinasa: (sentido) [ 0.51  $\mu$ M] / (antisentido) [ 0.51  $\mu$ M], DMSO [ 3% ] , 28.1  $\mu$ l de Agua inyectable, Taq polimerasa[0.05 U/ $\mu$ l] (Biotecnológicas Universitarias) y 5 $\mu$ l cDNA, obteniendo un volumen final de 50 $\mu$ l. Se agito perfectamente en vortex y se colocaron en el termociclador Applied Biosystems/ Gene Amp. PCR System 2400. Para realizar la amplificación se usaron las siguientes condiciones: Una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos. Las condiciones de amplificación fueron, 1 minuto de desnaturalización a 94 °C , un apareamiento a 62 °C por 1 minuto y un minuto de síntesis a 72 °C. Estas condiciones se mantuvieron por 25 ciclos. Al término de éstos, se mantuvo la reacción de amplificación a 72 °C por 7 minutos.

Después de las reacciones de RT-PCR (Insulina/Actina/Glucocinasa), sé preparó un gel de agarosa al 1% con TBE 1X , teñido con Bromuro de Etidio. Se cargó el gel con 20  $\mu$ l de muestra, las cuales fueron previamente mezcladas con 2  $\mu$ l de Loading buffer [6X ].

La electroforesis se llevó a cabo a 75 volts, aproximadamente por 30 min.

Al finalizar la corrida del gel, éste fue llevado a un transiluminador de luz ultravioleta ( UVP Ultra-Violet Products ), para realizar el registro fotográfico.

El análisis densitometrico se llevó a cabo con el programa Scion Image.

Los resultados obtenidos se analizaron con la prueba de Student de doble cola.

## RESULTADOS

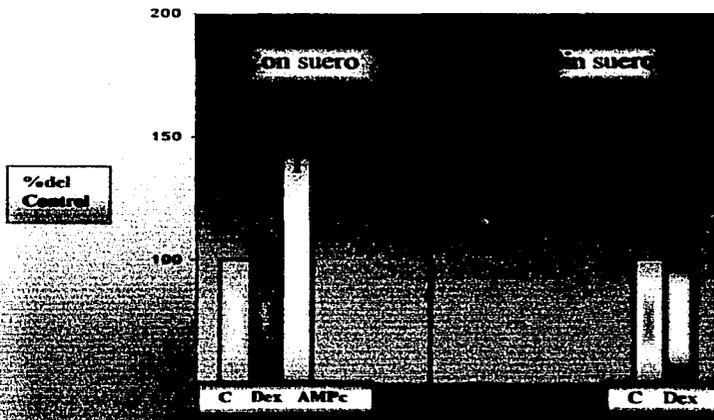
El primer paso de esta investigación consistió en la estandarización de la técnica de RT-PCR para cuantificar el ARNm de la insulina y de la actina éste ultimo usado como control interno. Para la amplificación del ARNm de insulina se estableció una temperatura de desnaturalización de 94 °C, 57 °C para el apareamiento con la secuencia blanco (annealing) y 72 °C para la síntesis, el número de ciclos escogido fue de 20, número en el que se observa la fase exponencial de la amplificación. Las mismas temperaturas de desnaturalización y síntesis fueron usadas para la amplificación del ARNm de la actina, en tanto que a temperatura de apareamiento fue de 55 °C y el número de ciclos se fijó en 35.

Con el fin de determinar si las discrepancias existentes en la literatura sobre el efecto de los glucocorticoides en la regulación de la expresión del gen de la insulina, se deben a un efecto diferencial dependiente de suero presente en el medio de cultivo, estudiamos el efecto del tratamiento con dexametasona (1 $\mu$ M) sobre los niveles de ARNm de la insulina en islotes cultivados en presencia o ausencia de suero (medio con albúmina). Como puede observarse en la Gráfica 1, columnas dos y cinco, el tratamiento con dexametasona no modificó los niveles de ARNm de insulina ni en los islotes cultivados en presencia de suero, ni en los islotes cultivados sin suero. Para determinar la capacidad de respuesta de los islotes, éstos fueron tratados con AMP cíclico o Forskolina, un agente que aumenta el AMP cíclico, segundo mensajero que como se señaló previamente en la sección de antecedentes, aumenta la expresión del gen de la insulina; como puede observarse en la Gráfica 1, el tratamiento con AMPc incrementó un 42.4  $\pm$  6.5 % los niveles de ARNm de la insulina.

Con el fin de descartar la posibilidad de que la dexametasona usada se encontrara inactiva, se evaluaron diferentes lotes del producto, encontrándose en los experimentos resultados similares (100.9 % para el lote 1 de dexametasona; 108.33% para el lote 2 de dexametasona). Se utilizó también como estrategia analizar si las preparaciones eran capaces de modificar la expresión de algún otro gen: Como puede observarse en la Gráfica 2, el tratamiento con el glucocorticoide aumentó en un  $264 \pm 52.21\%$  la expresión de la glucocinasa. Estos resultados descartaron la posibilidad de que la falta de respuesta a la dexametasona se debiese a la inactividad de la dexametasona en las soluciones usadas. La falta de respuesta al efecto de la dexametasona concide con los resultados reportados por Gremlich y cols. 1997, quienes no encontraron efecto alguno de la dexametasona sobre la expresión del gen de la insulina.

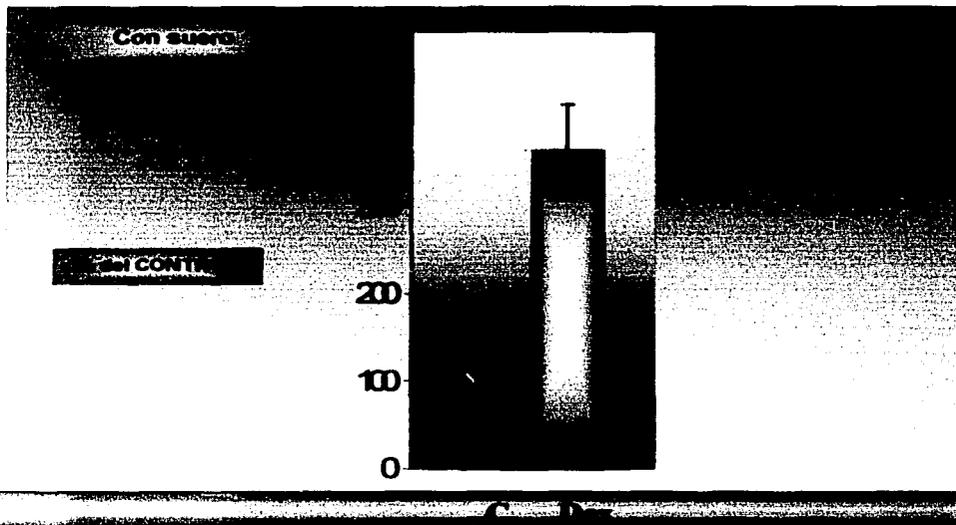
El análisis de la literatura reveló que los estudios existentes en la literatura habían sido efectuados en ratas Sprague-Dawley. Con el fin de descartar la posibilidad de la existencia de una respuesta debido a la cepa, estudiamos el efecto de la dexametasona ( $1\mu\text{M}$ ) sobre los niveles de ARNm de la insulina en islotes aislados de ratas Sprague-Dawley, cultivados en presencia o ausencia de suero (medio con albumina). Como se observa en la Gráfica 3, la respuesta al glucocorticoide sobre los niveles de ARNm de la insulina en las ratas Sprague-Dawley fueron similares a los encontrados en los islotes provenientes de las ratas de la cepa Wistar.

**EFFECTO DE LA DEXAMETASONA SOBRE LO NIVELES DEL ARNm DE INSULINA EN PRESENCIA O AUSENCIA DE SUERO**  
**En islotes de ratas Wistar (n=6)**



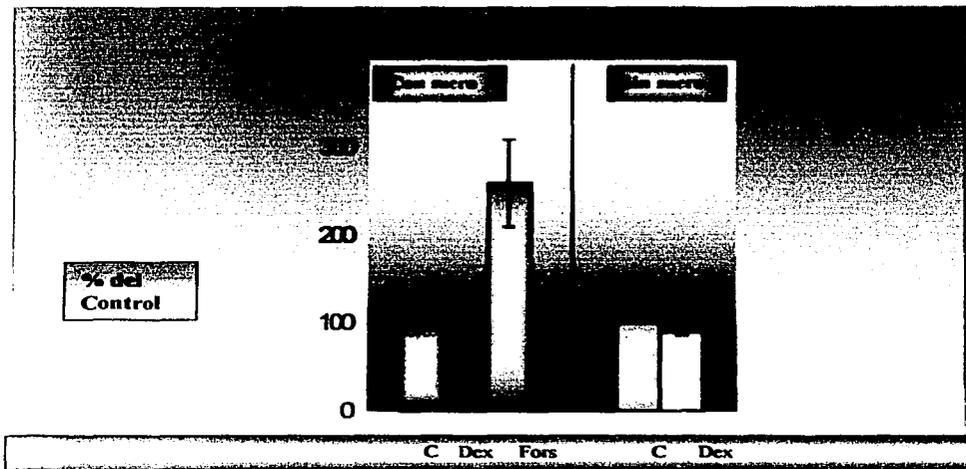
Gráfica 1.-Efecto de la dexametasona sobre los niveles de ARNm de la insulina en presencia o ausencia de suero. Los islotes fueron aislados de ratas Wistar por colagenasa y sembrados para su recuperación durante 17 h aproximadamente, después de este periodo se retiró el sobrenadante y se sembraron en medio suplementado con 10% de Suero de bovino fetal (SBF); o en medio suplementado con 0.5% de Albumina (BSA), en presencia o ausencia de  $1\mu\text{M}$  de dexametasona durante 24 h. Como control positivo los islotes fueron tratados con 8-Br-AMP ciclico (1mM). Cada barra representa la media de los porcentajes  $\pm$  el error estándar (E.S) de 6 experimentos independientes en el estudio de la dexametasona y 3 experimentos para el AMPc. La significancia fue evaluada por la prueba de Student.  $P \leq 0.05$ .

**EFFECTO DE LA DEXAMETASONA SOBRE LOS NIVELES DE ARNm DE LA  
GLUCOCINASA**  
En islotes obtenidos de ratas Wistar (n=3)



**GRÁFICA 2.-Efecto de la dexametasona sobre los niveles de ARNm de la glucocinasa pancreática.** Los islotes fueron aislados de ratas Wistar por colagenasa y sembrados para su recuperación por 17 h aproximadamente, después de este periodo se retiró el sobrenadante y se sembraron en medio suplementado con 10% de Suero bovino fetal (SBF), en presencia o ausencia de  $1\mu\text{M}$  de dexametasona durante 24 h. Cada barra representa la media de los porcentajes  $\pm$  el error estándar (E.S) de 3 experimentos independientes. La significancia fue evaluada por la prueba de Student. Significancia  $*P<0.05$ .

**EFFECTO DE LA DEXAMETASONA SOBRE LOS NIVELES DE ARNm DE LA INSULINA EN PRESENCIA O AUSENCIA DE SUERO**  
**En islotes obtenidos de ratas Sprague Dawley (n=4)**



**Gráfica 3.-Efecto de la dexametasona sobre los niveles de ARNm de la insulina en presencia o ausencia de suero** Los islotes fueron aislados de ratas Sprague-Dawley por collagenasa y sembrados para su recuperación durante 17 h aproximadamente, después de este periodo se retiró el sobrenadante y se sembraron en medio suplementado con 10% de Suero de bovino fetal (SBF), panel A; o en medio suplementado con 0.5% de Albumina (BSA), panel B, en presencia o ausencia de 1 $\mu$ M de dexametasona durante 24 h. Como control positivo los islotes fueron tratados con el agonista Forskolina. Cada barra representa la media de los porcentajes  $\pm$  el error estándar (E.S) de 4 experimentos independientes en el estudio de la dexametasona y 2 experimentos en los de Forskolina. La significancia fue evaluada por la prueba de Student.  $P \leq 0.05$ .

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se encontró que la dexametasona no afecta significativamente la expresión del gen de la insulina. Esta falta de efecto se observa tanto en los islotes cultivados en presencia o ausencia de suero (medio con albumina). Con estos resultados concluimos que la suplementación del medio de cultivo con suero no es una variable que determine la acción del glucocorticoide y que las discrepancias existentes en la literatura sobre el efecto de los glucocorticoides en la regulación de la expresión de la insulina no se deben a un efecto producido por los factores presentes en el suero.

Nuestros resultados son similares al efecto encontrado por Gremlich y cols. (1997). Existen sin embargo algunas diferencias entre las condiciones de cultivo usadas por estos autores y nuestros experimentos. En los experimentos de Gremlich la recuperación de los islotes se efectuó en medio RPMI 1640 conteniendo 11 mM de glucosa y 10% de suero bovino fetal, posteriormente a esta recuperación, los islotes son transferidos a medio RPMI conteniendo 2.8 mM de glucosa por 24 horas, para finalmente efectuar el tratamiento con dexametasona en medio RPMI sin suero conteniendo 5.6 mM de glucosa. En nuestros experimentos la recuperación de los islotes se efectuó en las mismas condiciones de Gremlich, pero a diferencia de estos autores, la incubación con dexametasona se efectúa al día siguiente en medio RPMI con 11 mM de glucosa en presencia o ausencia de suero. La similitud de los resultados entre los grupos indica que las diferencias metodológicas del cultivo no son determinantes en la acción de la dexametasona.

Resulta intrigante la diferencia encontrada entre los resultados de este trabajo de Tesis y los previamente encontrados en nuestro laboratorio (Fernández Mejía datos no publicados), en donde se observó un decremento de los niveles de ARNm de la insulina en los islotes de ratas Wistar cultivados en presencia de

suero, es posible sin embargo que la presencia de algún factor en el lote de suero de los experimentos previos sea la responsable de esta diferencia.

Por otra parte, es difícil explicar la diferencia encontrada entre nuestros experimentos en ausencia de suero (BSA 0.05%) y los resultados obtenidos por Philippe y cols. 1992. Una posibilidad es la utilización de diferentes cepas de ratas, donde el grupo de Philippe utilizó ratas de cepa Sprague-Dawley, en tanto que nosotros utilizamos ratas de la cepa Wistar. Sin embargo como se muestra en los resultados (Gráfica 3), la diferencia de cepa no es una determinante en el efecto de la dexametasona. Otra posibilidad, es una diferencia metodológica, ya que en los experimentos de Philippe se usaron tiempos de recuperación de 3 horas y en nuestros experimentos la recuperación se efectuó por 17 horas. Para descartar esta posibilidad se realizaron una serie de experimentos donde se analizó el efecto del tiempo de recuperación sobre la expresión del gen de la insulina. Los resultados obtenidos sugieren que el tiempo de recuperación no interviene en el efecto de la dexametasona, ya que en ambos casos la diferencia de ARNm respecto a su control no tuvo una diferencia significativa (control 100%, 17 horas de recuperación BSA Dex 102% y 3 horas de recuperación BSA Dex 100.65)

Finalmente, en estos estudios encontramos que en los cultivos de islotes la dexametasona incrementa más de 260% la expresión del gen de la glucocinasa. La glucocinasa es una enzima determinante en la regulación de los niveles de glucosa sanguíneos que encuentra presente en el hígado y en las células beta del páncreas (Weinhouse, 1976). En el hígado la glucocinasa es el paso determinante en la captación de glucosa post-prandial (Bedoya y cols. 1986). En el páncreas su actividad es esencial en la secreción de insulina en función de los niveles de azúcar en la sangre (Matschinsky, 1996). La clonación del gen de la glucocinasa puso de manifiesto la existencia de un único gen con dos diferentes promotores (Magnuson, 1989 y 1990), lo que indica que la transcripción de la

glucocinasa se encuentra regulada de manera diferente en estos dos tejidos. La mayor parte del conocimiento sobre la regulación de la expresión y actividad de la glucocinasa proviene de investigaciones efectuadas sobre la isoenzima hepática (Sibrowski y Seitz 1980, Minderop y cols.1987). En contraste, es escasa la información sobre los factores que regulan la expresión de la glucocinasa pancreática.

Gran parte de los conocimientos existentes sobre la regulación de la glucocinasa pancreática provienen de los trabajos efectuados por nuestro grupo (Fernández - Mejía 1992, Cabrera-Valladares y cols.1999, Romero-Navarro 1999). Estos han dejado establecido que la glucocinasa pancreática es capaz de ser regulada transcripcionalmente, hallazgo que se opone a la idea previamente aceptada, de que el gen en el páncreas sólo era capaz de expresarse en forma constitutiva, y que su regulación no se debía a cambios en la expresión del propio gen. Nuestros estudios también han puesto de manifiesto que existen diferencias entre la regulación de la isoenzima hepática y la pancreática (Fernández-Mejía 1992, Cabrera-Valladares y cols.1999, Romero-Navarro 1999 ).

Diversos estudios encontraron que los glucocorticoides tienen un efecto positivo en la expresión de glucocinasa hepática (Fernández 1992, Newgard 1996). Estudios por Fernández-Mejía y Davidson 1992, encontraron que la dexametasona aumenta la actividad de la glucocinasa en la línea celular de insulinoma RINm5F, sin embargo existen múltiples diferencias entre la función de las líneas tumorales pancreáticas y las células pancreáticas normales (Fernandez-Mejía y cols. 1997), entre ellas, la defectuosa secreción de insulina en respuesta a la glucosa en las líneas tumorales. Ya que la glucocinasa es determinante en la secreción de la insulina en respuesta a la glucosa, es por lo tanto importante el estudio de la regulación de la enzima en un modelo experimental fisiológico como lo es el cultivo primario de islotes. No existen en la literatura estudios que documenten el efecto de los glucocorticoides sobre el gen de la glucocinasa en

cultivos de islotes, por lo que los hallazgos encontrados en esta tesis sobre el efecto de los glucocorticoides sobre la glucocinasa, sientan las bases para una nueva investigación.

## **CONCLUSIÓN**

**El efecto de la dexametasona sobre los niveles de ARNm de la insulina no depende de la presencia o ausencia de suero en el medio de cultivo.**

## REFERENCIAS

Ashcroft FM and Ashcroft SLH (1992). Mechanism of insulin secretion. In: Ashcroft FM and Ashcroft SLH. Insulin: Molecular biology to pathology. IRL Press, New York. 93-150

Baillyes EM, Guest PC and Hutton JC (1992). Insulin synthesis In: Ashcroft FM and Ashcroft SJH (Eds) . Insulin: Molecular biology to pathology. IRL Press. New York. 64-92.

Beato M and Klug J (2000). Steroid hormone receptors: an update. Hum Reprod Update. 6(3): 225-36.

Bedoya FJ, Matschinsky FM., Shimizu T, O'Neil JJ, Appel MC 1986 Differential regulation of glucokinase activity in pancreatic islet and liver in the rat. J Biol Chem 261:10760-10764

Bell GI, Pictet RL, Rutter WJ, Cordel BB, Tischer E and Goodman HM (1980). Sequence of the insulina gene. Nature 284, 26-32.

Breibart RE, Andreadis A, Nadal-Guinard (1987). Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple proteins isoformas from single genes. Ann. Rev. Biochem. 56, 476-495.

Brunsted J and Chan S.J (1982). Direct effect of glucose on preproinsulin mRNA level in isolated pancreatic islets. Biochem. Biophys. Res. Commun. 106: 1383-1389.

Boam DSW, Clark AR and Docherty K (1990). Positive and negative regulations of the human insulin gene by multiple transacting factors. J. Biol. Chem. 265, 8285-8296.

Cabrera B, German MS, Franz M, Matschinsky, Wang J and Fernández M (1999). Effect of retinoic acid on glucocinasa activity and gene expression and on insulin secretion in primary cultures of pancreatic islets. *Endocrinology* Vol 140, No. 7 3091-96.

Cabrera-Valladares G, Michael S, German, Franz M., Matschinsky, Juehu Wang, Cristina Fernandez-Mejia (1999). Effect of Retinoic Acid on Glucokinase Activity and Gene Expression in Primary Cultures of Pancreatic Islets. *Endocrinology*, 140, 3091-3096.

Clark AR and Docherty K (1992). The insulin gene. In: Ashcroft FM and Ashcroft SJH (Eds). *Insulin: Molecular biology to pathology*. IRL Press, New York. 37-63.

Clack AR, Wilson ME, Leibiger I, Scott V and Docherty K (1995). A silencer and an adjacent positive element interact to modulate the activity of the human insulin promoter. *Eur. J. Biochem.* 232, 627-632.

Crowe DT and Tsai M (1989). Mutagenesis of the rat insulin II 5'-flanking region, defines sequences important for expression in HIT cell. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1784-1789

Cordle SR, Whelan J, Henderson E, Masuoka H, Weil PA and Stein R (1991). Insulin gene expression in non expressing cells appears to be regulated by multiple distinct negative-acting control elements. *Mol. Cell Biol.* 11, 2881-2886.

Damert A, Leibiger B and Leibiger IB (1996). Dual function of the intron of the insulin rat I gene in regulation of gene expression. *Diabetologia* 39: 1165-1172.

Devaskar SU, Giddings SJ, Rajakumar PA, Carnaghi IR, Menon RK and Zahm DS (1984). Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 269, 8445-8454.

Docherty K and Clark AR (1994). Nutrient regulation of insulin gene expression. *FASEB J.* 8, 20-27.

Feling P and Bergman M (1995). The endocrine pancreas: Diabetes mellitus. In: Feling P, Baxter JD and Frohman A (Eds); Endocrinology and Metabolism. 3<sup>th</sup> edn. McGraw Hill. New York. 1107-1250.

Fernández-Mejía C and Davidson MB (1992). Regulation of glucokinase and proinsulin gene expression and insulin secretion in RIN-m5F cells by dexamethasone, retinoic acid and thyroid hormone. *Endocrinology* 130 : 1660-1668.

Fernández-Mejía C, Goodman PA and Davidson MB (1993). Hormonal regulation of insulin gene transcription. *Diabetes* 42 S. 228<sup>a</sup>

Fernández-Mejía C (1996). Biología molecular de la diabetes mellitus. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 4(3): 55-62.

Fernandez-Mejia C, Sander M, German MS. 1997. Effect of glucocorticoids on the human insulin negative regulatory element in primary beta cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105: A1-A151

Fernández-Mejía C (1998). Regulación de la expresión génica por carbohidratos (Revisión). *Endocrinología y Nutrición*. 6 (2): 34-40.

German MS, Moss LG, Wang J and Rutter WJ (1992). The insulin and islet amyloid polypeptide genes contain similar cell-specific promoter elements that bind identical beta cell nuclear complexes. *Mol. Cell Biol.* 12, 1777-1788.

German MS and Wang J (1994). The insulin gene contains multiple transcriptional elements that respond to glucose. *Mol. Cell Biol.* 14, 4067-4075.

Giddings SJ, Chirgwin J, Permutt MA (1982). Effect of glucose on proinsulin messenger RNA. *Diabetes*. 31 (7): 624-9

Giddings SJ, Chirwin J and Permutt MA (1985). Evaluation of rat insulin messenger RNA in pancreatic and extrapancreatic tissues. *Diabetologia*, 28, 343-347.

Giddings SJ and Carnaghi LR (1988). The two non allelic rat insulin mRNA and Pre-RNA are regulated coordinately in vivo. *J. Biol. Chem.* 263, 3845-3849

Goodman PA, Medina-Martinez O and Fernández-Mejía C (1996). Identification of the human insulin negative regulatory element as a negative glucocorticoid response element. *Mol. Cell. Endocrinol.* 120, 139-146.

Hardman JJ (1996). Las bases moleculares de la terapéutica de Goodman y Gilman. Edt Mc Graw-Hill. Novena edición. 1459-85.

Hammonds P, Schofield PN A and Ashcroft SJ (1987). Glucose regulates proinsulin mRNA levels in a clonal cell line simian virus-transformed Beta-cells. *FEBS Lett.* 213: 149-154.

Henquin JC. Cell biology of insulin secretion (1994). In *Joslin's Diabetes Mellitus*. 13 Ed. Khan RC, Weir GC. Lean and Feibiger.

Inagaki T, Maekawa T, Sudo T, Ishii S, Seino Y and Imura H (1992). C-Jun represses the human insulin promoter activity that depends on multiple cAMP response elements. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 1045-1049.

Jones PM and Persaud (1998). Protein kinases, protein phosphorylation and the regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells. *Endocrine Rev.* 19, 429-461.

Kennedy and German (1996). Insulin gene regulation. *Diabetes Mellitus*. 20-26

Lomedico P, Rosenthal N, Efstratiadis A, Guilbert W, Kolodner R and Tizard R (1979). The structure and evolution of two non allelic rat preproinsulin genes. *Cell* 18, 545-558.

Lomedico P, Rosenthal N, Efstratiadis A, Guilbert W, Kolodner R and Tizard R (1979). The structure and evolution of two non allelic rat preproinsulin genes. *Cell* 18, 545-558.

Magnaterra R, Porzio O, Piemonte F, Bertoli A, Sesti G, Lauro D, Marlier LN, Federici G and Borboni O (1997). The effects of pregnancy steroids on adaptation of beta cell to pregnancy involve the pancreatic glucose sensor glucokinase. *J. Endocrinol.* 155, 247-253.

Magnuson MA., Shelton 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

Matschinsky FM 1996 A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45:223-242

Minderop RH, Hoepfner W, Seitz HJ 1987 Regulation of hepatic glucokinase gene expression. Role of carbohydrates, glucocorticoid and thyroid hormones. *Eur J Biochem* 164:181-187

Misler S, Barnett DW, Gillis KD and Presseel DM (1992). Perspectives in diabetes. Electrophysiology of stimulus-secretion coupling in human beta cells. *Diabetes* 41, 1221-1228.

Newgard CB 1996 Regulatory role of glucose transport and phosphorylation in pancreatic beta cells. *Diabetes Rev* 4:191-206

Nielsen DA, Welsh M, Casadaban MJ, Steiner DF (1985). Control of insulin gene expression in pancreatic beta-cells and in insulin-producing cell line, RIN-5F cell. Effects of glucose and cyclic AMP on the transcription of insulin mRNA. *J Biol Chem.* 260 (25): 13585-9.

Oetjen E, Diedrich T, Eggers A, Eckert B, Knepel W (1994). Distinct properties of the cAMP-responsive element of the rat insulin I gene. *J Biol Chem.* 28; 269 (43): 27036-44

Ohlsson H and Edlund T (1986). Sequence-specific interactions of nuclear factors with the insulin gene enhancer. *Cell* 45, 35-44.

Ohlsson H, Karlsson O and Edlund T (1988). A beta cell specific protein binds to two major regulatory sequences of the insulin gene enhancer. *Proc. Natl.Acad. Sci.* 85, 4228-4231.

Olson KL, Redmon JB, Towle HC and Robertson RP (1993). Chronic exposure of HIT cells to high glucose concentrations paradoxically decreases insulin gene transcription and alters binding of insulin regulatory protein. *J. Clin. Invest.* 92, 514-9.

Olson KL, Quian J and Poitout V (1998). Glucose rapidly and reversibly decreases INS-1 via decrements in STF-1 and C1 activator transcription factor activity. *Mol. Endocrinol.* 12: 207-219.

Philippe J and Missotten M (1990). Functional characterization of cAMP-responsive element of the rat insulin I gene. *J Biol. Chem.* 265, 1465-1469.

Philippe J, Pacheco I and Meda P (1994). Insulin gene transcription is decreased rapidly by lowering glucose concentrations in rat islets cells. *Diabetes* 43, 523-528.

Pickup, J. and W.S. Goseth. (1997) The hormonal and neural control of endocrine pancreatic function. In *Textbook of diabetes. Volume I Blackwell Science.* 9.1-9.17.

Pickup, J. and W.S. Goseth. (1997) The biosynthesis and secretion of insulin. In *Textbook of Diabetes. Volumen I. Blackwell Science.* 8.1-8-13.

Karlsson O, Edlund T, Moss LB, Rutter WJ and Walker MD (1987). A mutational analysis of the insulin gene transcription control region: expression in beta cells is

dependent on two related sequences within the enhancer. Proc. Natl. Sci. 84, 8819-8823.

Karlsson O, Walker MD, Rutter WJ and Edlund T. (1989). Individual protein binding domains of the insulin gene enhancer positively activate  $\beta$  cell specific transcription. Mol.Cell.Biol. 9, 823-827.

Koranyi L, Permutt MA, Chirwgin JM and Giddings SJ (1989). Proinsulin I and II gene expression in hibred mouse strains. Mol. Endocrinol. 3, 1895-1902.

Robertson RP. (1989). Tipe II diabetes glucose "no sense" and islet sentitization. Biabetes 38: 1501-1505.

Romero-Navarro G, Gabriela Cabrera-Valladares, Michael S. German, Franz M. Matschinsky, Antonio Velazquez, Juehu Wang, Cristina Fernandez-Mejia (1999). Biotin Regulation of Pancreatic Glucokinase and Insulin in Primary Cultured Rat Islets and in Biotin Deficient Rats. Endocrinology.; 140: 4595-4600.

Sanders M, Griffen SC, Huang J, German MS (1998). A novel glucose-responsive element in the human insuline gene functions uniquely in primary cultured islets. Proc Natl Acad Sci. USA. 29,95(20) : 11572-7.

Sibrowski W and Seitz H 1980 Hepatic glucokinase turnover in intact and adrenalectomized rats in vivo. Eur J Biochem 113:121-129

Soares MB, Schon E, Henderson A, Karathanasis SK, Cate R, Zeitlin S, Chirwgin J and Joose J (1985). RNA -mediated gene duplicatio: the rat preproinsulin I gene is a functional retroposon. Mol.Cell.Biol. 5, 2090-2103.

Walker MD, Edlund T, Boulet AM and Rutter WJ (1983). Cell specific expression controlled by 5' flanking region of insulin and chymotripsyn genes. Nature 306, 557-561.

Wang C, Shen L, Najafi H, Kolberg J, Matschinsky FM, Urdea M, German M (1997). Regulation of insulin pre RNA splicing by glucose. Pro Natl Acad Sci USA. 94, 4360-4365.

Weinhouse S 1976 Regulation of glucokinase in liver. *Curr Top Cell Reg* 11:1-50

Weinhouse AJ, Stout LE and 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): 1640-1649.

Welsh M, Nielsen DA, MacKrell AJ and Steiner DF (1985). Control of insulin gene expression in pancreatic beta cell and in a insulin-producing cell line RIN 5F cell. II. Regulation of insulin mRNA stability. *J. Biol. Chem.* 260, 13590-13594.

Welsh M, Weber T, Wrange O, Nielsen DA, Matthiew M and Steiner DF (1988). Regulation of insulin gene expression by dexamethasone, Ca<sup>+</sup>, and a phorbol ester. *Biomed. Biochim. Acta.* 47, 299-303.

Wenworth BM, Schaefer IM, Villa-Komaroff L and Chirgwin JM (1986). Characterization of the two noallelic genes encoding mouse preproinsulin. *J.Mol.Evol.* 23, 305-312.