



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL  
Y DE POSGRADO

CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

## EFFECTO DE LOS ESTEROIDES SEXUALES SOBRE LA SINTESIS Y LIBERACIÓN DE INSULINA EN LA RATA: ESTUDIOS *IN VIVO* E *IN VITRO*.

### T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P R E S E N T A:  
M. EN C. LIDYA SUMIKO MORIMOTO MARTINEZ

MEXICO, D.F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

272981

~~1999~~

1999



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

El presente trabajo fue realizado en el departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", bajo la dirección del Dr. Vicente Díaz Sánchez, con el apoyo de la beca de Doctorado del CONACyT y del Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado (PADEP) UNAM.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Cristina Fernández Mejía por su importante apoyo para la realización del trabajo experimental, y a su equipo de colaboradores y amigos míos Memo, Gaby y Jesús.

A Mary, Lulú, Roberto y Gerardo, por su apoyo y comprensión.

**Esta tesis está dedicada:**

**A la memoria de mi madre.**

**A René Morimoto y María Sánchez,  
fuente de experiencia inacabable.**

**A mis hermanos: María Oralia, Rosana,  
René y José Manuel.**

**A Luis Alberto.**

## INDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCION	3
Biosíntesis de la insulina	3
El gen de la insulina	3
La estructura del gen	3
Regulación de la expresión génica	4
Regulación de la transcripción por hormonas esteroides	6
Regulación de la transcripción del gen de insulina	7
Gen tipo I de insulina de rata	7
Gen tipo II de insulina de rata	10
Gen humano de la insulina	11
La Síntesis de la insulina	13
Estructura de la insulina	14
Regulación de la síntesis de la insulina	15
Regulación de la concentración de RNAm de insulina	15
Regulación de la vida media del mensajero	16
Regulación de la iniciación de la traducción del RNAm de la preproinsulina	16
Regulación de la translocación de la cadena de preproinsulina naciente	16
Regulación de la elongación de la cadena naciente de la preproinsulina	17
Secreción de la insulina	17
Transporte de glucosa	18
La glucocinasa	18
Modelo general de señalización iniciada por glucosa en la liberación de insulina	19

Moduladores de la secreción de insulina	21
Potenciadores de la secreción	21
Inhibidores de la secreción	21
Hormonas esteroides sexuales y la biosíntesis de la insulina	22
Estudios clínicos	22
Estudios en animales	23
HIPOTESIS	24
OBJETIVOS	24
MATERIALES Y METODOS	26
Estudios <i>in vivo</i>	26
Animales de estudio	26
Extracción del RNA y análisis de la expresión génica por "Northern blot"	27
Hormonas en suero	28
Estudios <i>in vitro</i>	29
Aislamiento y cultivo de islotes pancreáticos	29
Contenido de insulina en el islote	30
Análisis estadístico	30
RESULTADOS	31
Estudios <i>in vivo</i>	31
Ratas macho	31
Concentración de insulina	31
Expresión del gen de insulina	31
Concentración de testosterona	33
Concentración de estradiol	34
Ratas hembra	35
Concentraciones de insulina	35
Expresión del gen de insulina	36
Concentración de esteroides gonadales	37
Estudios <i>in vitro</i>	39
Tratamiento de los islotes por una hora	39

Secreción de insulina	39
Expresión del gen de insulina	40
Tratamiento por tres horas	41
Secreción de insulina	41
Contenido de insulina	42
DISCUSION	44
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFIA	53

## RESUMEN

Las hormonas esteroideas participan en la homeostasis de la insulina. Esto ha sido demostrado en modelos animales como la rata y en islotes pancreáticos en cultivo. Las evidencias principales muestran que el estradiol y la progesterona incrementan la secreción de la insulina basal y en respuesta a glucosa. A pesar de la importancia que las hormonas esteroideas parecen tener en el metabolismo de la insulina, no existen estudios que demuestren los efectos de estas hormonas, a nivel molecular en la biosíntesis de la insulina, por esta razón el presente estudio tuvo como objetivo general, estudiar los efectos del estradiol, progesterona y testosterona en la biosíntesis y secreción de la insulina *in vivo* e *in vitro*. Para el estudio *in vivo*, se utilizaron ratas Wistar de ambos sexos en diferentes condiciones endócrinas. Los machos fueron divididos en prepúberes, intactos (control), gonadectomizados, gonadectomizados y sustituidos con estradiol y testosterona. Las hembras se estudiaron en las diferentes etapas del ciclo estral (prepúberes, proestro, estro, metaestro y diestro). Se hicieron determinaciones en sangre de estradiol ( $E_2$ ), progesterona ( $P_4$ ), testosterona (T) e insulina en cada uno de los animales de estudio. El RNA total, fue extraído del páncreas de cada animal y la expresión del gen de insulina se estudió por Northern blot. Para el estudio *in vitro*, se estableció un cultivo primario de islotes pancreáticos de rata, los cuales fueron incubados por 1 hora con  $1 \mu\text{g/ml}$  de  $E_2$ ,  $P_4$  y T. Se midió la insulina secretada al medio, por radioinmunoanálisis (RIA). El RNA total fue extraído de los islotes pancreáticos y fue analizado por Northern blot. Otra serie de islotes fue tratado por 3 horas con  $E_2$ ,  $P_4$ , T, dihidrotestosterona (DHT) y androstendiona (A). De estos islotes se cuantificó el contenido total de insulina dentro del islote y la secreción de insulina, por RIA. **Resultados:** En los machos se encontró que la castración provoca una disminución en la expresión del gen de insulina, al administrar testosterona a los machos castrados, se recuperó la expresión de manera parcial en relación a las ratas control. Cuando estos animales fueron sustituidos con estradiol, la expresión sobrepasó a la de los controles. En las ratas hembra se observó que la expresión del gen de la insulina varía a lo largo del ciclo estral, y se encontró una correlación de los valores de estradiol y progesterona en sangre con la expresión del gen durante el ciclo estral, encontrándose una mayor expresión en el proestro. En relación a la concentración de insulina circulante, el efecto fue similar a lo observado en la expresión del gen. En el modelo *in vitro*, se observó que la testosterona a 1 h, causa una disminución en la secreción de insulina y un incremento en la expresión del gen; a las 3 hrs de incubación se incrementó la secreción, así como el contenido de insulina en el islote por efecto de esta misma hormona. El estradiol, incrementó la secreción de insulina en los islotes pancreáticos, después de 1 y 3 hrs de tratamiento, sin embargo no tuvo efecto sobre la expresión del gen. La progesterona provocó una disminución en la secreción de insulina a 1 h de tratamiento, pero no tuvo efecto significativo en el contenido de insulina dentro del islote ni en la expresión del gen. La DHT mostró un efecto positivo sobre la secreción de insulina pero no sobre el contenido. La A no mostró efectos consistentes. Con estos resultados podemos concluir que las hormonas esteroideas tienen un efecto diferencial en el metabolismo de la insulina, modulando la expresión del gen, la secreción de insulina previamente sintetizada y/o el contenido de insulina (insulina no secretada).

## SUMMARY

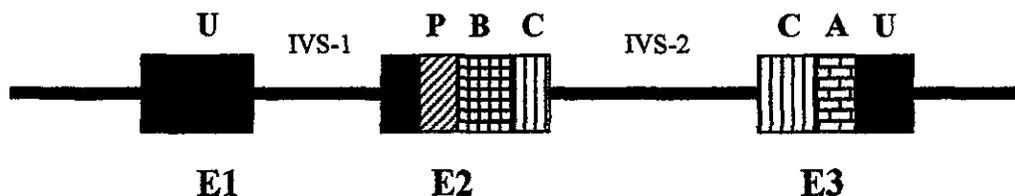
The role of sexual steroid hormones on insulin biosynthesis and secretion has been controversial. There is evidence that in the rat and isolated islets of Langerhans, the treatment with  $17\beta$ -estradiol or progesterone usually increase insulin secretion, both, basal and glucose-induced. To our knowledge the effects of sexual steroid hormones on insulin metabolism at molecular level have not been explored. The aim of the present work was to study the effects of estradiol, progesterone and testosterone on insulin biosynthesis and secretion *in vivo* and *in vitro*. For *in vivo* study, male and female Wistar rats in physiological conditions and under different experimental treatments were employed. Males were divided in intact (control), gonadectomized and testosterone or estradiol substituted. Females were studied at different stages of estral cycle, having 4-day vaginal cycle. Plasma progesterone ( $P_4$ ), estradiol ( $E_2$ ), testosterone and insulin concentrations were determined. From each animal, the pancreas was taken and total RNA was extracted. Northern blot was performed to analyze the pancreatic insulin gene expression. For *in vitro* study, primary cultures of islets of Langerhans were established.  $E_2$ ,  $P_4$  or T was added in  $1\ \mu\text{g/ml}$  for 1 h to each culture. Insulin was measured in the media. Total RNA was extracted from islets and the insulin gene expression was analyzed by Northern blot. Other series of islets were treated with  $E_2$ ,  $P_4$ , T, dihydrotestosterone (DHT) and androstenedione (A) for 3 h. Total insulin content in the islet and insulin secretion were quantified by radioimmunoassay (RIA). **Results:** In males the testosterone produced an increment in insulin gene expression but not clearly in insulin concentration. In female rats, the expression of insulin gene varies along estral cycle. During proestrous the expression was the greatest and was correlated with estradiol and progesterone levels. The plasmatic insulin concentration in female rats was correlated with insulin gene expression. In the islets culture, testosterone administration increased insulin gene expression as compared with control islets. In relation to insulin secretion,  $P_4$  and T caused a reduction while  $E_2$  increase almost twice the insulin secretion in isolated islets at 1 h of treatment. At 3 h of treatment, T and DHT caused an increase in insulin secretion, but in content only  $E_2$  and T produced a significant increment. Androstenedione didn't show any significant effect. In conclusion, in male rats the insulin gene was affected by testosterone and in female rats estradiol and progesterone were correlated with the variations in expression of insulin gene along the estral cycle. In the islet culture there were differential effects of the hormonal treatment. Testosterone acts at biosynthetic, storing and secretion levels. Estradiol acts on insulin secretion and content. DHT affects insulin secretion but not insulin content. Taken together this data indicate that insulin gene expression and secretion of previously synthesized insulin seem to be modulated by gonadal steroids.

# INTRODUCCION

## Biosíntesis de la insulina

### El gen de la insulina

**La estructura del gen.** La estructura del gen de la insulina se encuentra altamente conservada entre diferentes especies y consta de tres exones y dos intrones (Bell *et al.* 1980). El exón 1 está localizado en 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 1). 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 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 II, que son sintetizados casi en la misma proporción (52%-48%) (Lomedico *et al.* 1979; Wentworth *et al.* 1986). El intrón dos está ausente en el gen tipo I de la rata y el ratón. Los genes I y II de preproinsulina de rata, se encuentran separados uno del otro por 100,000 Kb en el cromosoma 1 (Soares *et al.* 1985). El gen de la insulina humana se localiza cerca del final del brazo corto del cromosoma 11 (Harper *et al.* 1981).



**Figura 1.** Estructura del gen de la insulina (tomado de Clark y Docherty, 1992). Disposición de los exones E1-E3 y los intrones (IVS-1 e IVS-2). El gen de la insulina humana tiene 1430 pares de bases (E1, 42 pb; IVS-1, 179 pb; E2, 204 pb; IVS-2, 786; y E3, 219 pb). Las regiones del RNAm y de la preproinsulina, son: U la región 3' y 5' no traducible del RNAm; P,B, C y A, son el pre-péptido, cadena B de la insulina, péptido C y cadena A de la insulina, respectivamente.

## Regulación de la expresión génica

La expresión de los genes puede ser regulada a nivel transcripcional (iniciación y elongación de la transcripción) y postranscripcional (procesamiento y transporte intracelular de los transcritos, estabilización de los mensajeros dentro del citoplasma, traducción de los mensajeros, modificaciones postraduccionales de las proteínas). La importancia de cada uno de estos tipos de regulación es variable dependiendo del gen de que se trate. En esta sección solamente se considerará la regulación de genes eucariontes (transcritos por la RNA polimerasa II) que ocurre a nivel de la iniciación.

La regulación de la transcripción, depende de la interacción de secuencias de DNA en "cis" (intragénicas) situadas en la proximidad del gen y con elementos en "trans" (Mitchel and Tjian, 1989) . Estas secuencias han sido clasificadas de acuerdo a sus propiedades como promotores, aumentadores (enhancers) y silenciadores (silencers).

Los *promotores* son un conjunto de secuencias agrupadas alrededor del sitio de inicio de la transcripción. Estas secuencias (de 100 pb típicamente), representan el sitio de unión y ensamblaje del complejo de iniciación, que comprende a la RNA polimerasa II y factores de transcripción relacionados (TFIIA, TFIIB, TFIIIC, TFIIE, TFIIIF y TFIIS; Saltzman and Weinmann, 1989). Muchos promotores poseen una secuencia conservada, TATAAA (la caja TATA; Breathnach and Chambon, 1981) situada en dirección 5' a unos 20 o 30 nucleótidos del sitio de inicio de la transcripción, su función primaria es asegurar que los transcritos sean iniciados precisamente. Sin embargo muchos promotores, particularmente de los genes (housekeeping) constitutivos carecen de cajas TATA y en su lugar, presentan elementos ricos en GCs (Bird, 1986) . Los potenciadores y silenciadores, son secuencias de regulación situadas a distancias variables del sitio de inicio de la transcripción (entre 100 y varios miles de pares de bases en dirección 5' o 3' de este sitio de inicio) Estas secuencias estimulan o reprimen (respectivamente) la transcripción de genes situados en la proximidad. Los aumentadores, fueron primero identificado en genes virales donde mostraron activar al gen de manera independiente de la posición y la orientación (Khoury and Gruss, 1983).

A diferencia de los aumentadores virales, que actúan en una gran variedad de tipos celulares, la actividad de los aumentadores en los genes eucariontes, está en la mayor parte restringida a tipos celulares particulares. Los aumentadores eucariontes pueden controlar de manera temporal o específica del tejido, la expresión de los genes, mediando la respuesta a agentes que inducen o modulan la expresión de los mismos (Maniatis *et. al.* 1987).

Se cree que los promotores y aumentadores operan interactuando con proteínas reguladoras de la transcripción (Ptashne, 1988; Johnson and McKnight, 1989); estas proteínas pueden agruparse en familias estructuralmente relacionadas, basadas en las regiones de unión al DNA y de dimerización:

1. hélice-giro-hélice; 2. dedos de zinc; 3. zipers de leucina; 4. hélice-asa-hélice.

El mecanismo por el cual los aumentadores activan a distancia la transcripción, no se conoce completamente sin embargo se cree que las secuencias de DNA situadas entre el promotor y el aumentador forman una asa en el seno de la cual las proteínas que se fijan a estas secuencias tienen la posibilidad de interactuar. Estas interacciones son importantes para la activación de la transcripción (Müler *et. al.* 1989).

Algunas de las proteínas que se fijan a los aumentadores se expresan constitutivamente en un gran número de tejidos y su papel es aún desconocido, pero se piensa que pueden contribuir al nivel basal de la actividad del aumentador en presencia de otras proteínas cuya expresión es regulada. Estas proteínas pueden expresarse selectivamente en tejidos específicos en uno o varios momentos precisos del desarrollo.

La actividad del potenciador puede también variar según el ambiente celular por fijación de las proteínas de regulación en respuesta por ejemplo a fenómenos de choque térmico, a la presencia de hormonas en el medio, a factores de crecimiento o a metales pesados.

**Regulación de la transcripción por hormonas esteroides.** Las hormonas esteroides participan en la regulación del desarrollo, la diferenciación celular y la respuesta fisiológica a diversos estímulos. Para producir estos efectos, las hormonas esteroides, penetran a la célula por difusión pasiva, dentro de ella son reconocidas por proteínas receptoras citoplásmicas o nucleares específicas. Los receptores a hormonas esteroides pertenecen a una superfamilia de factores de transcripción inducibles por su ligando, comprenden receptores para ácido retinóico, hormonas tiroideas y varios genes para los que su ligando fisiológico no es conocido aún. Estos receptores están organizados estructuralmente en diferentes regiones o dominios. Contienen una región amino-terminal (I) que participa en la regulación de la transcripción; un dominio de unión al DNA (II) de 66 a 68 aminoácidos (aa); una región bisagra (III) y un dominio de unión a la hormona (IV). El dominio I, es la región más variable entre los receptores a hormonas esteroides. El dominio de unión al DNA (II y III) es una región altamente conservada entre los miembros de esta familia. Este dominio tiene 2 regiones CI y CII parecidas a dedos de zinc, dichas estructuras se doblan para formar una sola región que asemeja a la conformación de las proteínas hélice-giro-hélice que constituyen factores transcripcionales. La región carboxilo terminal comprende aproximadamente 250 aa y corresponde al dominio de unión a la hormona (IV). Dentro de esta región se han identificado sub-regiones específicas responsables de la actividad transcripcional o TAF (por sus siglas en inglés transcriptional activating function), estas regiones son muy parecidas a los dominios ácidos de activación de ciertos factores de transcripción. La región III, situada entre las regiones de unión al DNA y de unión a la hormona, es rica en aminoácidos (aa) básicos y aunque no es un dominio altamente conservado, es similar a la secuencia de translocación nuclear del antígeno T del virus SV40 (Landers and Spelberg 1992).

El mecanismo por el cual los esteroides regulan la expresión de genes responsivos, se presenta después de la unión de la hormona a su receptor específico, esta unión resulta en un cambio conformacional del receptor, que aumenta su afinidad por el DNA. El complejo hormona-receptor se une en forma de dímero (homo o heterodímero) a una secuencia de reconocimiento en la proximidad del gen regulado, dichas secuencias son los elementos de respuesta a hormonas (ERH) en donde se puede activar o reprimir la

transcripción (Yamamoto, 1985; Beato, 1988; Schmitd *et. al.* 1989; Carson-Jurica *et. al.* 1990; Landers and Spelberg 1992).

## Regulación de la expresión del gen de la insulina

La mayor parte de los estudios sobre la regulación del gen de insulina se han llevado a cabo en los genes I y II de insulina de rata. El gen I surge del gen ancestral (tipo II) por un evento de transcripción mediado por una duplicación del RNA. El transcrito de RNA involucrado se inició desde un sitio secuencia arriba del promotor normal fisiológico del gen tipo II de la insulina, así, el gen I es homólogo al II en cerca de 500 pares de bases secuencia arriba del sitio de inicio de la transcripción (Soares *et. al.* 1985).

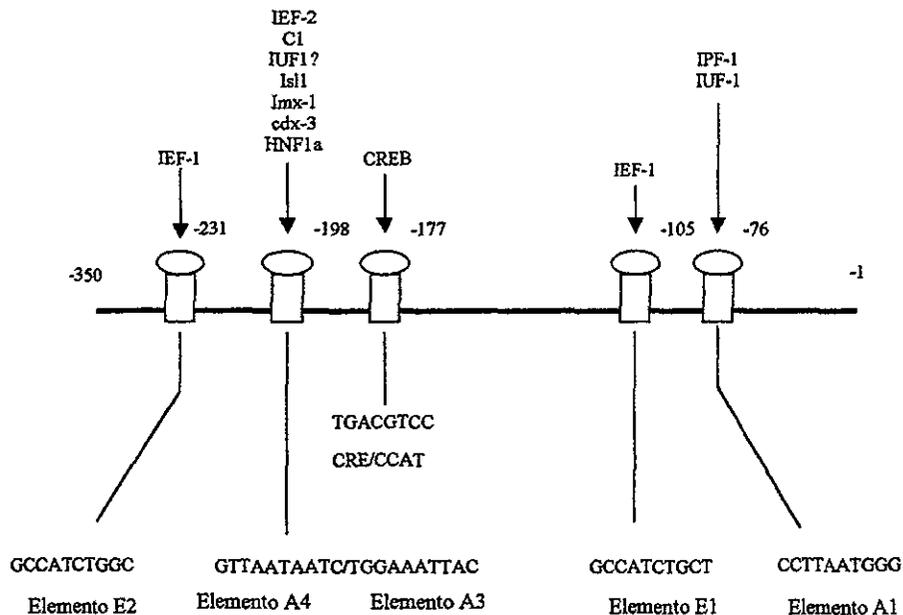
Los genes I y II de la insulina de rata se expresan en igual proporción en islotes normales, pero no en algunas líneas celulares derivadas de insulinomas (Koranyi *et. al.* 1989)

Dado que el gen tipo I ha sido estudiado con gran detalle, se mencionarán inicialmente los mecanismos de regulación en este gen y posteriormente se revisará el gen tipo II y el gen humano.

**Regulación de la transcripción del gen tipo I de la insulina de rata.** La regulación de la transcripción del gen de la insulina depende de la interacción de secuencias localizadas dentro del mismo gen y de proteínas transactivadoras.

Como muchos otros promotores, el promotor del gen de la insulina posee una secuencia conservada, la caja TATA, localizada 20 a 30 (-20 a -30) nucleótidos cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción. A esta secuencia se une el factor TFIID y marca el sitio de iniciación.

El aumentador del gen de la insulina está compuesto por secuencias que interactúan con proteínas nucleares reguladoras para modular la actividad del promotor, de una manera positiva o negativa (Karlsson *et. al.* 1987). El arreglo de las secuencias regulatorias del gen tipo I de la insulina de rata, se muestra en la figura 2.



**Figura 2.** Estructura de los elementos reguladores y las proteínas que se unen a ellos, en el gen tipo I de insulina de rata. La escala (-1 a -350) muestra los nucleótidos secuencia arriba del sitio de inicio de la transcripción. Las secuencias de los elementos se muestran abajo y las proteínas reguladoras arriba del esquema. (Tomado de Docherty and Clark, 1994 y German M, et al. 1995).

Utilizando un fragmento del gen de insulina fusionado con CAT como gen reportero, Walker y colaboradores (Walker *et. al.* 1983) encontraron que las secuencias entre -333 y +55 del gen tipo I de insulina de rata fueron suficientes para la expresión del gen en células  $\beta$  transfectadas. Después de utilizar mutagénesis dirigida en esta región, se encontró que algunas mutaciones tenían efectos deletéreos moderados sobre la transcripción, mientras que las mutaciones de tres diferentes regiones disminuían la transcripción hasta 5 veces o más. La primera de estas regiones fue la caja TATA (-20 a -30) y las otras dos coincidieron con una secuencia de ocho pares de bases GCCATCTG en -105 y -231.

Estas regiones han sido llamadas caja E1 y caja E2 respectivamente. Una doble mutación en E1 y E2 impide la transcripción del gen.

Estas secuencias pertenecen a una clase de sitios reguladores conocidos como caja E, los cuales tienen la secuencia consenso CANNTG y están implicados en la regulación tejido específica de genes en músculo, páncreas y tejido linfático. Las cajas E se unen a

una familia de factores reguladores conocidos como proteínas hélice-asa-hélice (HLH). 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 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 que está ausente en células no endócrinas (Ohlsson *et. al.* 1986).

Haciendo un análisis de bibliotecas genómicas de expresión, se ha logrado clonar ciertos genes de factores que se unen a las regiones E. Todos los clones, se derivan de un gen simple, el E2A, que genera al menos dos proteínas por procesamiento alternativo. El IEF-1, es un complejo heterodimérico HLH compuesto por el producto del gen E2A y IESF1. Como las proteínas E2A se expresan en una gran variedad de células, la expresión diferencial del heterodímero IEF1, puede ser debida a la expresión restringida del IESF1 (factor específico aumentador de la insulina). En este caso el IESF1 representa un importante factor de transcripción de las células  $\beta$  (Ohlsson *et. al.* 1988).

Una secuencia reguladora importante adicional contiene un motivo TAAT (uno de los 4 motivos o cajas A en esta región del promotor). En el gen I de la insulina de rata esta caja TAAT (A1) está localizada en la posición -77. Esta región, proximal al promotor, une al factor IPF-1 (factor promotor de la insulina) que se presenta solamente en células  $\beta$ .

Alrededor de la posición -198 existe una secuencia rica en AT (elemento A4 y A3) que contiene cuatro copias de la secuencia TAAT, 3 en la cadena superior y una en la inferior. Esta región, se une con diferentes proteínas, varias de las cuales han sido caracterizadas después del aislamiento de sus correspondientes DNAC y muestran que contienen "homeodominios". Estas proteínas incluyen: 1) Isl-1, factor relacionado con las proteínas homeodominio del nemátodo *Caenorhabditis elegans*; 2) cdx-3; 3) Imx-1 (caja LIM) la cual tiene un dominio rico en Cys/His; 4) la proteína hepática HNF1 $\alpha$  (factor nuclear de los hepatocitos). Otros factores que han sido caracterizados incluyen a IEF-2 y UIF-1 (factor 1 secuencia arriba del gen de la insulina) que está presente en

las células  $\beta$  únicamente; y el factor C1 que puede ser importante en la respuesta transitoria 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 mini aumentador E2/A1. Este sinergismo puede ser observado a nivel de proteínas, la proteína E2A, E47 (que forma parte del heterodímero IEF1 que se une a E2), no activa el mini aumentador por si solo. Sin embargo cuando se transfecta a fibroblastos que expresan Imx-1, la proteína E47 causa una activación sinérgica dramática del mini aumentador (Karlsson *et. al.* 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 el gen 2 y el gen humano) existe un elemento de respuesta a AMPc (CRE) en la posición -184 a -177. (Philippe and Missotten, 1990 a). Este elemento fue identificado probando la habilidad de constructos insulina-CAT para responder al AMPc. Este constructo quimérico contiene 410 pb del material 5' secuencia arriba del gen de CAT; así se mostró un aumento importante en la transcripción, de hasta cuatro veces. La delección o mutagénesis de la secuencia TGACGTCC (-184 a -177) compromete esta responsividad.

**Gen tipo II de la insulina de rata.** Aunque el gen II tiene un 80% de homología con el gen I en la región -370 a +1, su regulación difiere en algunas cuestiones.

Primero, en ausencia de secuencias aumentadoras, el promotor es bastante activo tanto en células secretoras como en no secretoras (Whelan *et. al.* 1989).

Una proteína específica de las células  $\beta$ , se une dentro de 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.

La mutagénesis de la región 5' del gen II de insulina de rata, revela más de 8 regiones distintas, en las que la mutación disminuye la tasa de transcripción más de dos veces (Crowe *et. al.* 1989).

Nuevamente la región E1 es de una importancia crítica, su mutación causa una disminución de la transcripción del gen reportero, de 25 veces. No existe una homología exacta de los dominios E1 y E2, por lo que se cree que una delección en E2 tuvo efecto significativo sobre la transcripción. Por eso aún no se conoce si esta región es transcripcionalmente activa en este gen; pero ciertamente no juega el mismo papel crítico que la caja E2 en el gen tipo I de la insulina de rata.

Otro elemento localizado entre -110 y -129 es altamente sensible a la mutación y contiene la secuencia GGAAA (A2I). Este elemento parece cooperar con la caja E1, si un fragmento de restricción contiene ambos elementos, y este se incluye dentro de un constructo, es capaz de estimular la transcripción de un promotor heterólogo de manera específica en las células  $\beta$  (Hwung *et. al.*, 1990).

Finalmente otros elementos sensibles a la mutación incluyen regiones de homología con el gen I, son las regiones E1 y A3; una región de homología al elemento de respuesta al AMPc del gen I; el sitio de unión al factor COUP; una región que contiene la secuencia CTTAAT y algunas secuencias mas, aún no caracterizadas alrededor del sitio -185.

**Gen humano de la insulina.** Una investigación preliminar del gen de la insulina, indica que las secuencias aumentadoras se encuentran localizadas cadena abajo en la posición -258 (Walker *et. al.* 1983). Estudios posteriores, utilizando el análisis por delección, revelan la presencia de regiones activas, cadena arriba de esta posición (Boam *et. al.* 1989).

Un elemento de regulación negativa, se encuentra alrededor de la posición -270 cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción, este elemento es activo tanto en células  $\beta$  como en células que no secretan insulina.

Boam y colaboradores (Boam *et. al.* 1990), encontraron que la delección de los nucleótidos -279 a -258, causaban un gran incremento (25 veces) en la transcripción

del gen, en células productoras de insulina. Ellos designaron esta secuencia como región regulatoria negativa o NRE.

Un fragmento que contiene esta región ha mostrado regular independientemente, a la baja el promotor de la timidina cinasa (tk) en una línea de células  $\beta$ . Esta región provoca una disminución del 50% en la actividad promotora de tk en células HIT productoras de insulina (Crowe and Tsai, 1989).

Estos sitios de regulación negativa pueden estar involucrados tanto en la regulación de la expresión del gen de insulina como en la respuesta a señales externas como hormonas (Welsh M, 1989; Docherty and Clark, 1994).

Así lo demuestran Goodman y colaboradores (Goodman *et. al.* 1996), quienes encontraron que la región comprendida entre -258 y -279 del promotor del gen de la insulina humana, sirve como sitio de regulación negativa (NRE), pues a través de experimentos de transfección en células HIT (células de insulinoma de hámster), se observó una disminución del 45% en la actividad del promotor, además se encontró que el dominio de unión al DNA del receptor a glucocorticoides (GR) se une a este sitio NRE. De esta manera estos autores sugieren la posibilidad de la regulación de la expresión del gen de insulina por efecto de los glucocorticoides, y dado que las células  $\beta$ , son las únicas en el islote que expresan el GR (Fisher *et. al.* 1990), muy probablemente la unión de GR con NRE desempeñe un papel muy importante en la diferenciación de la célula  $\beta$ .

Existe evidencia de que inmediatamente después (cadena arriba) de este sitio se encuentra una región que actúa positivamente y corresponde al "footprint" E1. Esta región antagoniza con el NRE adyacente y es activa tanto en células productoras de insulina, como en no productoras. Varios factores son capaces de unirse a esta región, uno de ellos parece ser que reconoce sitios CT.

Los resultados obtenidos tanto de estudios de expresión transitoria como estudios con ratones transgénicos (Fromont-Racine *et. al.* 1990.) sugieren que las secuencias localizadas aún más lejos del sitio de inicio de la transcripción, pueden estar involucradas en la regulación del gen. Un sitio putativo de regulación, aún no ha sido identificado y caracterizado, pero puede incluir una secuencia de alrededor de -340 que se asemeja a un sitio de unión para el factor Sp1.

La delección de la región E2 humana, tiene un efecto drástico sobre la transcripción, sugiriendo un papel positivo en la regulación del gen; aunque la homología con la región E2 del gen I de la rata es incompleta (tiene ocho de diez residuos) y los 2 residuos diferentes parecen ser importantes para la actividad de la caja E. Sin embargo las regiones E1 y E2 en el gen humano son capaces de competir de manera cruzada por la unión de factores nucleares, sugiriendo que al menos una de las proteínas es capaz de reconocer ambos sitios. Por lo tanto será necesario esclarecer si las cajas E1 y E2 en el gen humano regulan la transcripción de la misma manera.

La región -201, contiene una secuencia TCTAAT (A3), fuertemente conservada en los dos genes de insulina de rata y corresponde a la región A4/A3, una secuencia relacionada con CCTAAT (A11). Una delección en la región A3, causa una fuerte disminución en la actividad transcripcional.

Otros sitios reguladores putativos en el promotor del gen humano de la insulina, han sido detectados por estudios de unión de proteínas, y son los siguientes:

-La secuencia -167 a -221, contiene dos sitios de respuesta a AMPc, CREI y CREII (Inagaky *et. al.*, 1992). Proteínas nucleares que se unen a esta región han sido detectadas en todas las líneas celulares probadas, lo que puede esperarse por lo importante del factor CREB.

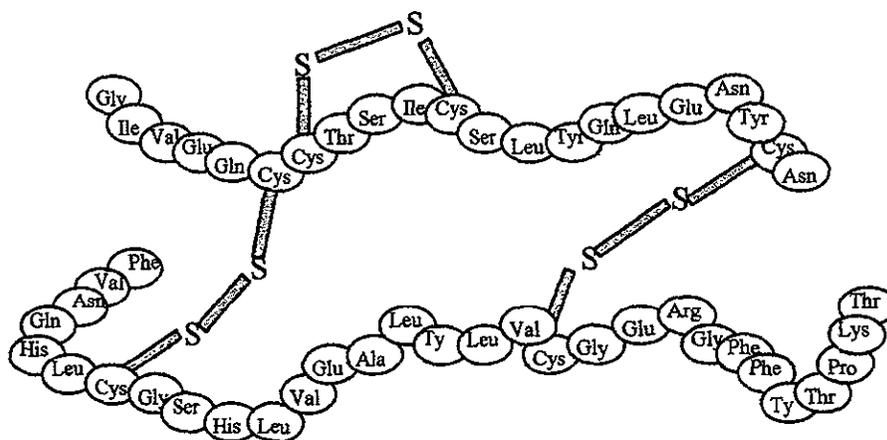
-En la posición -153 a -127, existen 2 copias de la secuencia GGAAT. El patrón de protección a la DNasa dentro de esta región, claramente difiere en células secretoras de insulina, de aquellas que no lo son (Clark and Docherty, 1992).

### La síntesis de la insulina

La insulina es sintetizada por las células  $\beta$  del páncreas, como una preprohormona que es procesada después de su traducción, para dar una molécula biológicamente activa. El precursor de la insulina es una cadena polipeptídica de ~9000 daltones, llamado proinsulina. El producto inmediato de la traducción del RNAm de la proinsulina, es un péptido de 11,500 daltones. Este precursor ha sido llamado preproinsulina; el cual consta de un péptido señal de 24 aa, seguido por la cadena B, un péptido conector

(péptido C) que contiene cerca de 30 aa y finalmente la cadena A (Feling and Bergman, 1995). La preproinsulina recién sintetizada y empacada dentro de gránulos secretores, es procesada durante su viaje a través del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. El péptido señal actúa como una contraseña que dirige el transporte de la proteína naciente desde los ribosomas al retículo endoplásmico (RE). Este proceso involucra la interacción con una partícula de reconocimiento citosólica (SRP), la cual causa una asociación del complejo, con el receptor a SRP presente en el RE, durante esta transferencia, una peptidasa remueve el péptido señal, convirtiendo la preproinsulina en proinsulina. La proinsulina se mueve a través de la formación de vesículas, desde el retículo endoplásmico hasta el aparato de Golgi. La conversión de insulina y péptido C, tiene lugar en el complejo de Golgi por efecto de dos endopeptidasas. El péptido C es co-secretado con la insulina (Baillyes *et. al.* 1992).

**Estructura de la insulina.** La insulina es una molécula pequeña con un peso molecular aproximado de 6000 . Esta formada por 2 cadenas polipeptídicas, la cadena A (21 aa) y la cadena B (30 aa), conectadas por 2 enlaces disulfuro intermoleculares (A7-B7 y A20-B19) y un enlace intermolecular entre A6 y A11. En la figura 3, se muestra de manera esquemática la estructura de la insulina.



**Figura 3. Secuencia de aminoácidos de la insulina**

**Regulación de la síntesis de insulina.** La biosíntesis y secreción de la insulina por las células  $\beta$  pancreáticas es regulada por una gran variedad de factores incluyendo a la glucosa, algunos aminoácidos, neurotransmisores y hormonas. Entre los diversos elementos capaces de estimular la secreción de insulina, la glucosa es fisiológicamente el más importante. (Feling and Bergman, 1995). Se sabe que el estímulo que promueve la liberación de insulina es el metabolismo de la glucosa u otro nutriente secretagogo, que provoca la secuencia de eventos que acoplan al cierre de canales de  $K^+$  regulado por ATP con la liberación de insulina; proceso en el que los cambios en la concentración citoplásmica de  $Ca^{2+}$  en las células  $\beta$ , es esencial (Jones and Persaud, 1998; Pertusa *et. al.* 1999).

La regulación de la síntesis de la insulina se lleva a cabo en diferentes niveles:

**Regulación de la concentración del RNAm de insulina.** El control a largo plazo de la producción de insulina está mediado por los cambios en las concentraciones de RNAm. De esta manera la célula  $\beta$  puede rápidamente restablecer los almacenamientos 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 del RNAm de la insulina han sido estudiados *in vitro*, en sistemas de cultivo. 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 RNAm. En islotes de humanos y de rata, los efectos en el incremento del RNAm de insulina fueron observados después de 4 horas de incubación con altas concentraciones de glucosa (Philippe *et. al.* 1994). Otros nutrientes y hormonas que regulan los niveles de RNAm de la insulina son la L-Leucina y su producto metabólico 2-cetoisocaproato, ambos incrementan el RNAm de la insulina en islotes aislados de rata, enfatizando el papel del metabolismo mitocondrial en la generación de señales que controlan la transcripción del gen de insulina (Docherty and Clark, 1994)

**Regulación de la vida media del mensajero.** La glucosa también tiene efecto sobre la vida media del RNAm de la insulina. Estos efectos fueron observados midiendo la tasa de decaimiento del RNAm de insulina marcado con  $^3\text{H}$ -uridina en islotes incubados en presencia y ausencia de el inhibidor transcripcional, actinomicina D. El RNAm 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 cultivados con 17 mM de glucosa, comparados con 3.3 mM de glucosa (Docherty and Clark, 1994). También los glucocorticoides tienen efecto sobre la vida media del mensajero de la insulina. La dexametasona desestabiliza el RNAm de la insulina, regulando así negativamente la expresión del gen de insulina en células HIT T15 y en preparaciones de islotes que han sido disgregados (Philippe and Missoten, 1990).

**Regulación de la iniciación de la traducción del RNAm de la preproinsulina.** Un análisis de la distribución celular del mensajero de la preproinsulina en islotes pancreáticos de rata, sugiere que la glucosa incrementa la tasa de iniciación de la traducción. La exposición de islotes a glucosa, en concentraciones mayores de 3.3 mM, resultó en un incremento en la transferencia del RNAm de insulina desde el citoplasma a las fracciones subcelulares que contienen ribosomas y polisomas (Baillyes *et. al.* 1992).

**Regulación de la translocación de la cadena de preproinsulina 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 preproinsulina por glucosa, puede ser el resultado de un incremento en la asociación del complejo de iniciación con el receptor a SRP. La adición de receptor a SRP purificado de páncreas de perro a homogenados de islotes, incrementa la incorporación de la tirosina- $^{125}\text{I}$  a la preproinsulina. Esta respuesta fue aún mayor cuando los islotes se incubaron en glucosa 16.7 mM; lo que indica que en islotes estimulados con glucosa la SRP puede ser alterada estructuralmente, aumentando la interacción con su receptor (Baillyes *et.al.* 1992).

**Regulación de elongación de la cadena naciente de preproinsulina.** La tasa de elongación traduccional de la preproinsulina puede ser regulada específicamente por glucosa en un rango de 0 a 5.6 mM. Esto ha sido mostrado en experimentos sobre la biosíntesis de proinsulina bajo condiciones en las que la elongación es la etapa limitante, por ejemplo en presencia de bajas concentraciones de cicloheximida. La síntesis de proinsulina 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 RNAm de la preproinsulina y esto sugiere un incremento en la tasa de elongación de la cadena polipeptídica. (Baillyes *et. al.* 1992).

### Secreción de la insulina

Las primeras ideas acerca de los mecanismos de secreción de insulina inducida por glucosa, fueron propuestas por Grodsky y colaboradores en 1963, ellos mostraron que la liberación de insulina del páncreas aislado y perfundido puede ser estimulada por glucosa, y en menor grado por otros azúcares metabolizables como la manosa y fructosa pero ningún efecto fue observado con la galactosa, xilosa o arabinosa. Este concepto obtuvo apoyo con la demostración de que análogos no metabolizables de la glucosa (2-deoxiglucosa o 3-metil-O-glucosa) no fueron capaces de promover la liberación de insulina, y además que los inhibidores de la glucólisis como la manohéptulosa o la glucosamina, bloquearon la respuesta a la D-glucosa. Igualmente importante resultó la evidencia de que la secreción de la insulina y el metabolismo de la glucosa, se incrementan en paralelo a la elevación de la concentración de glucosa extracelular. Estas observaciones sugieren que la glucosa y los "combustibles metabólicos" relacionados, estimulan la liberación de insulina a través del acceso a la célula  $\beta$  y que su metabolismo genera señales que activan la exocitosis de los gránulos que contienen la insulina. A través del tiempo, las evidencias se han acumulado en favor de esta hipótesis, la cual, ahora es ampliamente aceptada (Newgard and McGarry, 1995).

En el proceso de la secreción de insulina inducida por glucosa existen 2 elementos clave, de los que se hablará por separado: el transportador de glucosa y la glucocinasa.

**Transporte de glucosa.** La glucosa entra a la célula por difusión facilitada. La concentración de glucosa intracelular es similar a la extracelular, esto quiere decir que la glucosa es equilibrada a través de la membrana plasmática, y que su transporte no es una etapa limitante. De acuerdo con esta observación, algunos estudios han mostrado que el transportador de glucosa de la célula  $\beta$ , es de alta capacidad, con una  $V_{\max}$  10 veces mayor que la tasa de utilización de glucosa (Johnson *et. al.* 1990). La  $K_m$  del transportador de glucosa es de 50 mM. Estudios de clonación de los transportadores de glucosa, indican que pertenecen a una familia de proteínas estructuralmente relacionadas codificadas por distintos genes. Tanto en el hígado como en las células  $\beta$ , se expresa preferencialmente la misma isoforma, el GLUT-2. Técnicas inmunocitoquímicas han mostrado que la localización de este transportador en las células  $\beta$  de roedores, es principalmente en los microvellos del revestimiento de las células endócrinas, lo que sugiere cierta interacción con el citoesqueleto (Ashcroft and Ashcroft, 1992).

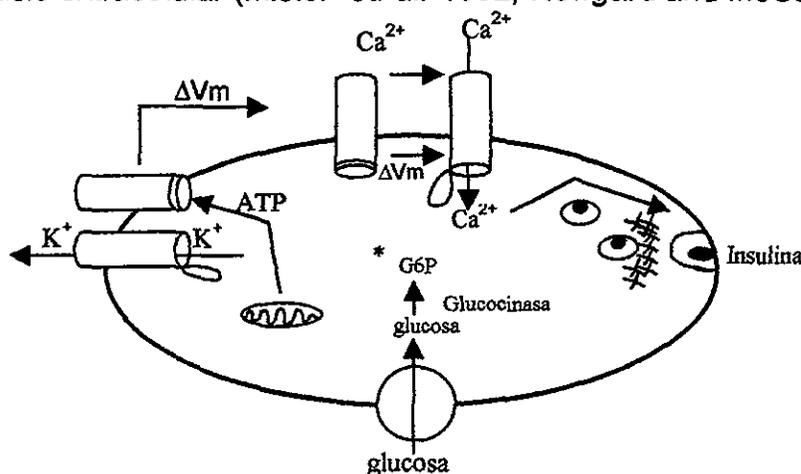
**La glucocinasa.** La importancia de la fosforilación de la glucosa fue demostrada utilizando inhibidores como la manoheptulosa; y con la medición directa de la toma de glucosa y la fosforilación en los islotes pancreáticos.

Matschinsky y Ellerman en 1968, mostraron que los homogenados de islotes pancreáticos presentan actividad de fosforilación, con una  $K_m$  alta y otra  $K_m$  baja ( 0.1 y 10 mM respectivamente) lo que indica la presencia de mas de una enzima para este propósito. En tejidos de mamíferos, la glucosa es fosforilada por los miembros de la familia de la hexocinasa. Existen 4 diferentes tipos. De la hexocinasa I a la III tienen una  $K_m$  de 10-100  $\mu$ M y la hexocinasa IV mejor conocida como glucocinasa, tiene una afinidad de aproximadamente 5.5 mM. La máxima actividad de la glucocinasa en los islotes, es similar a la tasa máxima de utilización de baja afinidad de la glucosa. Una disminución en la actividad de la glucocinasa en las células  $\beta$ , ha sido asociada a situaciones de disminución de la liberación de insulina; en pacientes con diabetes no

insulino dependiente tipo MODY por sus siglas en inglés "maturity-onset diabetes of the young" se han identificado un gran número de mutaciones en el gen de la glucocinasa, lo que trae como resultado, alteraciones en la secreción de insulina estimulada por glucosa (Froguel *et. al.*, 1992). Una evidencia más, del importante papel de la glucocinasa ha sido demostrado en ratones transgénicos donde se ha inducido una disminución en la actividad de la glucocinasa. En estudios de perfusión del páncreas de estos animales, se ha encontrado una reducción en la respuesta secretora de insulina estimulada por glucosa (Efrat *et. al.*, 1994).

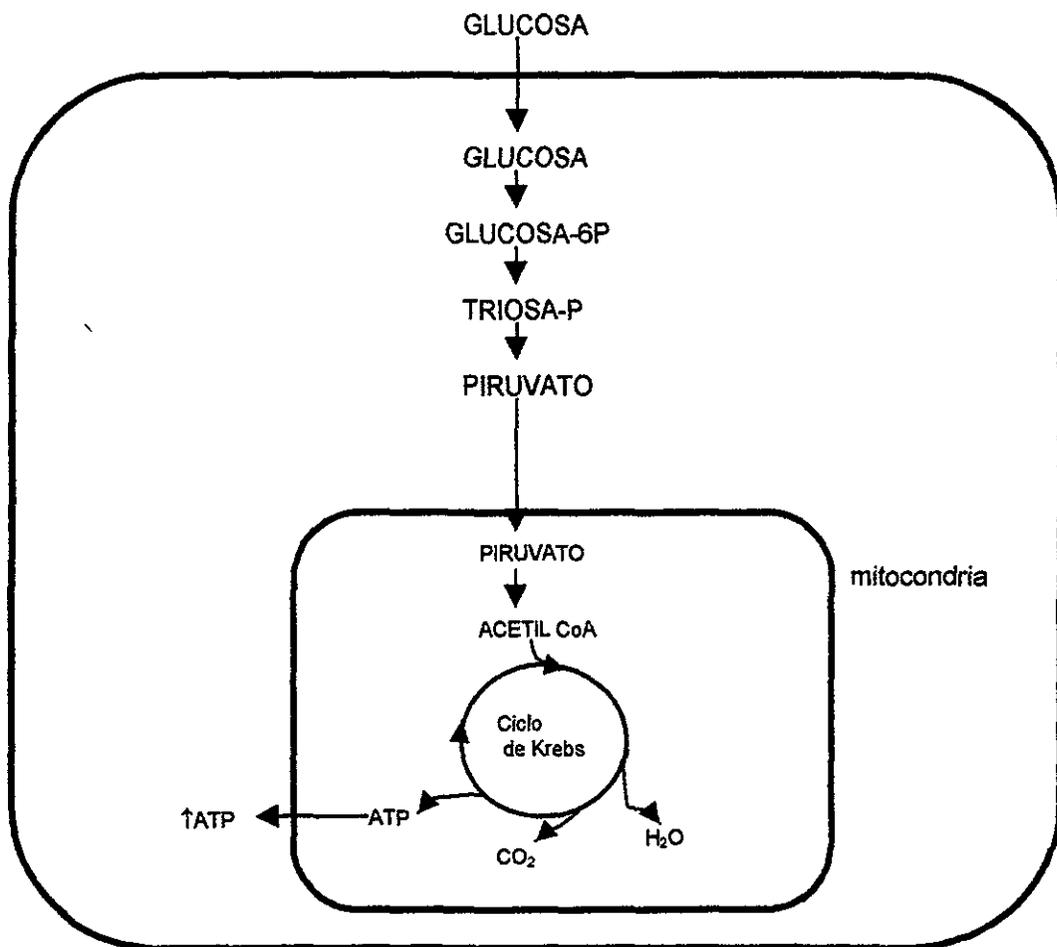
### Modelo general de señalización iniciada por glucosa en la liberación de insulina.

Según la hipótesis del acoplamiento entre el estímulo y la secreción de insulina (figura 4), el metabolismo de la glucosa provoca un incremento en la relación ATP:ADP, lo que resulta en el cierre de los canales de  $K^+$  sensibles a ATP, produciendo una despolarización lenta, seguida por una despolarización rápida hasta alcanzar una fase de meseta en donde se superponen potenciales de acción debidos a la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje. El incremento en el calcio intracelular dispara la liberación de la insulina a través de la exocitosis. Es decir, el influjo de calcio, activa ciertas proteínas cinasas que interactúan con componentes del citoesqueleto que participa en el transporte del gránulo secretor hacia la superficie celular donde su membrana se fusiona con la membrana plasmática y su contenido es vertido al espacio extracelular (Misler *et. al.* 1992; Newgard and McGarry, 1995).



**Figura 4.** Representación esquemática de la hipótesis del acoplamiento estímulo-secreción de insulina en la célula  $\beta$  pancreática (Modificado de Misler *et. al.* 1992 y Newgard and McGarry, 1995). \*Esquema abreviado del metabolismo de la glucosa y el ciclo de Krebs.

El metabolismo de la glucosa (figura 5) y otros secretagogos es una etapa esencial en el acoplamiento del estímulo-secreción en la célula  $\beta$ . En el citosol, la glucosa se convierte en piruvato por la glucólisis en una serie de 9 pasos enzimáticos. Aunque el ATP es sintetizado durante este proceso, la mayor parte de la energía derivada de la glucosa, es producida durante la subsecuente oxidación del piruvato dentro de la mitocondria. El piruvato es primero convertido a acetil CoA que es oxidada a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  en el ciclo del ácido cítrico. El NADH producido por estas reacciones es oxidado por la cadena respiratoria, la cual está acoplada a la síntesis de ATP en un proceso conocido como fosforilación oxidativa.



**Figura 5.** Esquema que muestra de manera resumida el metabolismo de la glucosa para la producción de ATP, sustancia clave para el acople estímulo-secreción de la insulina.

## Moduladores de la secreción de insulina

Como se ha mencionado anteriormente, los nutrientes secretagogos, son los responsables de la secreción de insulina por las células  $\beta$ , sin embargo esta respuesta secretora, puede ser modificada por otros secretagogos no nutrientes, quienes pueden tener una acción inhibitoria o potenciadora (Ashcroft and Ashcroft, 1992; Berggren, 1992; Jones and Persaud, 1998).

Las sustancias moduladas de la secreción de insulina incluyen una gran variedad de hormonas y neurotransmisores que actúan a través de receptores de membrana celular, que están ligados a proteínas G (Jones and Persaud, 1998).

**Potenciadores de la secreción.** Los potenciadores de la secreción de insulina inducida por glucosa, incluyen al glucagon, acetilcolina (ACh), vasopresina, péptido intestinal vasoactivo, péptido gástrico inhibitorio (GIP), colicistocinina y bombesina entre otros. Algunos como la ACh y CCK, activan la ruta de los fosoinositidos de membrana a través de la activación de la fosfolipasa C (PLC), que produce un incremento de segundos mensajeros como inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El incremento en el IP<sub>3</sub> lleva a la liberación de  $Ca^{2+}$  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 B. 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 fosforilación de proteínas del citoesqueleto, que desempeñan un papel fundamental en la secreción de insulina (Jones and Persaud, 1998).

**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 intracelulares como  $Ca^{2+}$  y AMPc. La adrenalina, galanina y somatostatina, por ejemplo, reducen la actividad eléctrica de las células  $\beta$ , hiperpolarizando la membrana plasmática

debido a la activación de canales de  $K^+$  regulados por una proteína G. Estos tres agentes, actúan así mismo, disminuyendo la actividad de la AC y disminuyendo la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  libre.

## Hormonas esteroideas sexuales y biosíntesis de la insulina

En diferentes estudios clínicos y experimentales se ha demostrado que los esteroides gonadales participan en la homeostasis de la insulina, modificando la función de los islotes pancreáticos a través de diferentes mecanismos (Lenzen and Bailey, 1984).

**Estudios clínicos.** En humanos la hiperinsulinemia y la disminución en la tolerancia a la glucosa durante el embarazo ha sido atribuida al menos en parte, al estradiol y a la progesterona. En esta etapa, la concentración de insulina basal y posprandial se incrementa (Kühl, 1977).

Estudios realizados en mujeres posmenopáusicas, muestran que la terapia estrogénica de reemplazo favorece la disminución de las concentraciones de glucosa e insulina en ayuno (Barret-Connor and Laasko, 1990). Por otra parte estudios epidemiológicos muestran una reducción en la incidencia de diabetes en mujeres con terapia de reemplazo hormonal (Barret-Connor and Laasko, 1990; Hammond *et. al.* 1979).

En mujeres con el síndrome de ovarios poliquísticos (SOP) y concentraciones elevadas de testosterona, se ha observado una concentración mayor de insulina inmunoreactiva que en las mujeres control. Se sugiere que en estas pacientes, la testosterona pudiera ser un modulador de los niveles de insulina, participando en el procesamiento de la proinsulina (Burhem *et. al.* 1980; Shoupe and Lobo, 1984; Poretsky, 1991; Buffington and Kitabchi, 1994).

Por otra parte se ha reportado una variación en la sensibilidad a la insulina lo largo del ciclo menstrual en mujeres normales. Durante la fase lútea (estradiol y progesterona

elevados) hay una disminución a la sensibilidad a la insulina y se observa un incremento adaptativo en la concentración de insulina en esa fase, en comparación con el resto del ciclo (Escalante and Alpizar, 1999).

**Estudios en animales.** Estudios experimentales en roedores, tanto en el animal intacto como en cultivos de islotes pancreáticos, muestran consistentemente que los esteroides ováricos pueden aumentar la respuesta pancreática de secreción de insulina (Lenzen and Bailey, 1984).

Utilizando a la rata como modelo experimental, estudios a corto y largo plazo han demostrado un incremento en la secreción de insulina por efecto del estradiol y la progesterona (Ashby *et. al.* 1978, Bailey and Ahmed-Sorour, 1980). En ratas ovariectomizadas, la privación de esteroides ováricos provoca una disminución en la concentración de insulina plasmática en respuesta a glucosa (Bailey and Ahmed-Sorour, 1980).

En islotes pancreáticos aislados de roedores, se ha observado un incremento en la secreción de insulina basal y en respuesta a glucosa después de la administración de concentraciones fisiológicas de estradiol y progesterona (Costrini and Kalkhoff, 1971; Hager *et. al.* 1972; El Seifi *et. al.* 1981).

En experimentos de perfusión de páncreas en ratas ovariectomizadas, se ha observado una disminución de la secreción de insulina en comparación con las ratas intactas. En este mismo modelo, la administración de progesterona y estradiol produjo un incremento en la secreción de insulina en respuesta a glucosa (Lenzen, 1978; Sutter-Dubb, 1979).

En modelos de diabetes experimental inducida por aloxana o estreptozotocina, así como en ratones transgénicos con degeneración de los islotes pancreáticos, se sugiere que las hormonas ováricas tienen un efecto protector contra estas patologías, mientras

que las hormonas testiculares las exacerban. Se ha observado una menor incidencia y en su caso una menor severidad de los daños en las hembras, mientras que en los machos se incrementa la susceptibilidad a este tipo de diabetes (Rossini *et. al.* 1978; Maclaren *et. al.* 1980; Shi *et. al.* 1994; Efrat, 1994).

A pesar de la importancia que los esteroides parecen tener en la homeostasis de la glucosa y la secreción de insulina, existen pocos trabajos recientes respecto a los mecanismos de acción de las hormonas esteroides sobre la síntesis y secreción de la insulina. A nuestro conocimiento no existen datos en la literatura de los mecanismos moleculares de las hormonas esteroides sobre el metabolismo de la insulina, por lo que en el presente trabajo se estudiaron los efectos de los esteroides gonadales en la expresión del gen de insulina en el páncreas de la rata. Tomando en cuenta que nuestro grupo de trabajo y otros autores, hemos detectado y corroborado la presencia de receptores específicos a diferentes hormonas esteroides en los islotes pancreáticos (Winborn *et. al.* 1987; Fisher *et. al.* 1990; Matthes *et. al.* 1994; Díaz-Sánchez *et. al.* 1995), se propone la siguiente:

## **HIPOTESIS**

Las hormonas esteroides sexuales actúan directamente sobre el islote pancreático, regulando los procesos de síntesis y secreción de la insulina.

## **OBJETIVOS**

Objetivo general:

Detectar los efectos de los esteroides sexuales (estrógenos, progestágenos y andrógenos) en la síntesis y secreción de insulina en la rata y en cultivos primarios de islotes pancreáticos.

Objetivos particulares:

1. Evaluar el efecto del estradiol, progesterona y testosterona en la síntesis y la secreción de la insulina en la rata.

que las hormonas testiculares las exacerban. Se ha observado una menor incidencia y en su caso una menor severidad de los daños en las hembras, mientras que en los machos se incrementa la susceptibilidad a este tipo de diabetes (Rossini *et. al.* 1978; Maclaren *et. al.* 1980; Shi *et. al.* 1994; Efrat, 1994).

A pesar de la importancia que los esteroides parecen tener en la homeostasis de la glucosa y la secreción de insulina, existen pocos trabajos recientes respecto a los mecanismos de acción de las hormonas esteroides sobre la síntesis y secreción de la insulina. A nuestro conocimiento no existen datos en la literatura de los mecanismos moleculares de las hormonas esteroides sobre el metabolismo de la insulina, por lo que en el presente trabajo se estudiaron los efectos de los esteroides gonadales en la expresión del gen de insulina en el páncreas de la rata. Tomando en cuenta que nuestro grupo de trabajo y otros autores, hemos detectado y corroborado la presencia de receptores específicos a diferentes hormonas esteroides en los islotes pancreáticos (Winborn *et. al.* 1987; Fisher *et. al.* 1990; Matthes *et. al.* 1994; Díaz-Sánchez *et. al.* 1995), se propone la siguiente:

## **HIPOTESIS**

Las hormonas esteroides sexuales actúan directamente sobre el islote pancreático, regulando los procesos de síntesis y secreción de la insulina.

## **OBJETIVOS**

Objetivo general:

Detectar los efectos de los esteroides sexuales (estrógenos, progestágenos y andrógenos) en la síntesis y secreción de insulina en la rata y en cultivos primarios de islotes pancreáticos.

Objetivos particulares:

1. Evaluar el efecto del estradiol, progesterona y testosterona en la síntesis y la secreción de la insulina en la rata.

que las hormonas testiculares las exacerban. Se ha observado una menor incidencia y en su caso una menor severidad de los daños en las hembras, mientras que en los machos se incrementa la susceptibilidad a este tipo de diabetes (Rossini *et. al.* 1978; Maclaren *et. al.* 1980; Shi *et. al.* 1994; Efrat, 1994).

A pesar de la importancia que los esteroides parecen tener en la homeostasis de la glucosa y la secreción de insulina, existen pocos trabajos recientes respecto a los mecanismos de acción de las hormonas esteroides sobre la síntesis y secreción de la insulina. A nuestro conocimiento no existen datos en la literatura de los mecanismos moleculares de las hormonas esteroides sobre el metabolismo de la insulina, por lo que en el presente trabajo se estudiaron los efectos de los esteroides gonadales en la expresión del gen de insulina en el páncreas de la rata. Tomando en cuenta que nuestro grupo de trabajo y otros autores, hemos detectado y corroborado la presencia de receptores específicos a diferentes hormonas esteroides en los islotes pancreáticos (Winborn *et. al.* 1987; Fisher *et. al.* 1990; Matthes *et. al.* 1994; Díaz-Sánchez *et. al.* 1995), se propone la siguiente:

## **HIPOTESIS**

Las hormonas esteroides sexuales actúan directamente sobre el islote pancreático, regulando los procesos de síntesis y secreción de la insulina.

## **OBJETIVOS**

Objetivo general:

Detectar los efectos de los esteroides sexuales (estrógenos, progestágenos y andrógenos) en la síntesis y secreción de insulina en la rata y en cultivos primarios de islotes pancreáticos.

Objetivos particulares:

1. Evaluar el efecto del estradiol, progesterona y testosterona en la síntesis y la secreción de la insulina en la rata.

1.1 Observar el patrón de secreción de la insulina en el animal intacto en ambos sexos, en diferentes condiciones de función gonadal.

1.2 Evaluar la síntesis de la insulina a través de la detección del RNAm en el tejido pancreático de ratas de ambos sexos, bajo diferentes condiciones de función gonadal.

2. Determinar los efectos de las hormonas esteroides sobre el proceso de síntesis y secreción de insulina en cultivos primarios de islotes pancreáticos de rata.

2.1 Cuantificar la secreción de insulina en los islotes pancreáticos, bajo tratamiento con diferentes hormonas esteroides.

2.2 Determinar la concentración de insulina madura no secretada, por efecto de  $E_2$ ,  $P_4$  y T.

2.3 Observar los efectos de estas hormonas, en la expresión del gen de insulina, a través de la detección del RNAm en islotes pancreáticos en cultivo.

## MATERIALES Y METODOS

### ESTUDIOS *IN VIVO*

#### **Animales de estudio**

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, prepúberes y adultas (de 21 y 60 días de edad respectivamente), de ambos sexos.

Los machos, fueron agrupados en conjuntos de 6 ratas cada uno, de la siguiente manera:

- 1 prepúberes
- 2 adultos intactos
- 3 adultos gonadectomizados
- 4 adultos gonadectomizados y sustituidos con testosterona
- 5 adultos gonadectomizados y sustituidos con dihidrotestosterona
- 6 adultos gonadectomizados y sustituidos con estradiol -

Los animales del grupo 3, fueron gonadectomizados y 72 horas después fueron sacrificados para obtener el páncreas de cada uno de ellos.

En los grupos 4,5,y 6, los animales se gonadectomizaron y 72 horas después, se sustituyeron con una dosis única (i.m.) de 5 mg de enantato de testosterona (grupo 4), 100 µg de dihidrotestosterona (grupo 5) y 100 µg de benzoato de estradiol (grupo 6). Al término de 48 horas, los animales fueron sacrificados para obtener el páncreas, simultáneamente con los animales de los grupos 1 y 2.

Para el estudio del ciclo estral se utilizaron ratas hembra prepúberes y adultas vírgenes. Fueron agrupadas en número de seis por caja y se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura, con un horario de 12 horas luz (6:00-18:00 hrs). Las diferentes etapas del ciclo estral fueron determinadas mediante análisis microscópico de frotis vaginales, tomados diariamente a las 12.00 a.m.

aproximadamente. Los animales que tuvieron ciclos regulares de 4 días por 3 ciclos consecutivos fueron considerados para el estudio.

Los grupos de hembras fueron:

- 1 prepúberes
- 2 adultas en proestro
- 3 adultas en estro
- 4 adultas en metaestro
- 5 adultas en diestro

Las etapas del ciclo fueron diferenciadas de acuerdo a las características descritas por Freeman, 1994.

- Proestro (PE): día en el cual predominan las células epiteliales.
- Estro (E): el día en el que únicamente se observan células epiteliales escamosas cornificadas.
- Metaestro (ME): el día del ciclo en el que el tipo celular predominante lo constituyeron los leucocitos.
- Diestro (DE): se caracteriza por una menor presencia de leucocitos y algunas células nucleadas.

### **Extracción de RNA y análisis de la expresión génica por *Northern blot***

El páncreas fue removido inmediatamente después del sacrificio de cada animal. El RNA total fue extraído, utilizando 2 ml de TRizol (Gibco BRL). Una vez obtenido, el RNA se cuantificó por espectrofotometría.

Un total de 20 µg de RNA de cada rata, se separó en geles desnaturalizantes de agarosa al 1% y 2.2 M de formaldehído (Sambrook *et. al.* 1989). Después de la electroforésis, el gel fue transferido por capilaridad a membranas de nitrocelulosa (Genescreen, NEN Research Products, Dupon) con SSC 10X (citrato de sodio 150 mM, NaCl 1.5 M) por toda la noche. Las membranas se prehibridizaron en 0.2 ml/cm<sup>2</sup> de la solución A (formamida 50%, SDS 0.2%, EDTA 10mM, SSC 2X, fosfato de sodio 120mM,

pH 6.8 y 50 µg/ml de DNA de esperma de salmón) por 24 horas a 42°C. Después de este tiempo, las membranas fueron hibridizadas con un fragmento PstI de 360 pares de bases del DNA complementario (DNAC) de la insulina humana, el cual fue marcado radiactivamente con <sup>32</sup>P con el método de "random primer" (Feinberg and Vogelstein, 1983).

Las membranas fueron incubadas en 0.1 ml/cm<sup>2</sup> de la solución A, en presencia de la sonda radiactiva, a 42°C durante toda la noche. Después de la hibridización, las membranas se lavaron en condiciones de alta astringencia, 2 veces a temperatura ambiente en una solución de SSC 2X y 2 veces a 50°C en una solución de SSC 0.1X, SDS 0.1% y se expusieron a placas autorradiográficas Kodak X-OMAT por 24 horas a -70°C, usando pantallas intensificadoras.

Los autorradiogramas fueron analizados en un densitómetro de imagen (Eagle eye II, Stratagene).

Las membranas fueron lavadas y rehibridizadas con el DNAC de la actina como control de expresión constitutiva.

### **Hormonas en suero**

De cada uno de los animales de estudio, se tomaron muestras de sangre. Se colectó por punción cardíaca justo después del sacrificio del animal. El suero fue obtenido por centrifugación y se almacenó a -20°C para su procesamiento posterior.

Se determinaron las concentraciones de estradiol (E<sub>2</sub>), progesterona (P<sub>4</sub>) y testosterona (T) utilizando el método del radioinmunoanálisis (RIA) empleando tritio como trazador (Abraham, 1976). El anticuerpo de cada hormona fue obtenido de la OMS (Ginebra, Suiza) y la hormona marcada, de Amersham International, Buckinghamshire U.K.

La insulina fue cuantificada por RIA, utilizando <sup>125</sup>I, como trazador, estándar de insulina humana y anticuerpo anti-insulina humana. Todos los reactivos fueron proporcionados por el departamento de Diabetes del Instituto Nacional de Endocrinología de La Habana, Cuba.

## ESTUDIOS *IN VITRO*

### **Aislamiento y cultivo de islotes pancreáticos**

Los islotes de Langerhans fueron obtenidos utilizando las técnicas modificadas de Lacy and Kostianovsky, 1967 y Sutton *et. al.* 1986. El páncreas de la rata fue perfundido (a través del ducto pancreático) con 10 ml de solución salina balanceada de Hank's (Gibco BRL) para poder visualizarlo y obtenerlo completo. Se cortó en fragmentos de aproximadamente 1 mm con unas tijeras y se digirió con 8 mg de colagenasa P (Boehringer Mannheim) a 37 °C en un baño maría, por 10 minutos, con una agitación de 180 golpes/minuto. Después de la digestión, el tejido pancreático se lavó 2 veces con 0.5% de albúmina sérica bovina (BSA) en solución de Hank's y se purificó utilizando un gradiente de ficol 400 DL (Sigma) con concentraciones de 27, 23, 20 y 11%. Los islotes fueron tomados de la interfase 27-23% y se lavaron una vez en la misma solución de BSA-Hank's y se centrifugaron a 800 rpm por 2 minutos a 4°C. Una vez lavados, los islotes se resuspendieron en 15 ml de Hank's 0.5% BSA y se tomaron de una caja de petri, bajo un microscopio estereoscópico (Nikon modelo SMZ-2B), con una pipeta Pasteur. Una vez colectados, todos los islotes, se centrifugaron a 800 rpm por 2 minutos, para eliminar la solución de Hank's. Después de la centrifugación se resuspendieron y se sembraron en cajas de petri de 60 mm de diámetro, a una densidad de 300 islotes por caja con 6 ml de medio RPMI 1640 (IN VITRO S.A. de C.V México) suplementado con 10% de suero bovino fetal.

Los cultivos se mantuvieron en un incubador a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>, por 18 horas. Después de ese tiempo, se retiró el medio y se agregaron 6 ml de medio nuevo. Al mismo tiempo se adicionó a cada caja el tratamiento correspondiente. Los tratamientos manejados fueron E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>, T, DHT y Androstendiona (A), diluidos en etanol a una concentración de 1µg/ml. Los controles recibieron 6 µl de etanol. Después de 60 minutos exactamente, se retiró el medio de cada caja y se congeló a -20°C para la cuantificación de insulina.

A los islotes se les adicionaron 500 µl de TRIzol (Gibco BRL) y se siguieron las especificaciones del fabricante para la obtención del RNA total, DNA y proteínas .

La concentración de RNA y DNA se cuantificó por espectrofotometría y las proteínas totales por el método de Bradford (Bradford, 1976).

La expresión del gen de insulina en el islotes pancreáticos, fue analizada por "Northern blot" como ya ha sido descrito en una sección previa.

La insulina secretada al medio fue cuantificada por RIA.

### **Contenido de insulina en el islote**

Se cultivaron 35 islotes por tratamiento en cajas multipozos de 6. Se trataron de la misma forma con las hormonas E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>, T, DHT y A a una concentración de 1µg/ml y etanol como control, después de 3 horas de tratamiento, se obtuvieron las células y se trataron con 500 µl de etanol ácido (HCl 15 mmol/l, etanol 75%) y se incubaron por 16 horas a 0° C. Estas muestras fueron diluidas e inmediatamente analizadas por RIA para la cuantificación de la insulina.

Todos los experimentos realizados, se repitieron al menos 3 veces.

### **Análisis estadístico**

Los datos de las cuantificaciones hormonales fueron analizados por ANOVA o por la prueba de Mann-Witney. Además se utilizó la prueba de Tukey para comparación múltiple de medias. Los datos de expresión del gen de insulina durante el ciclo estral, fueron correlacionados con las concentraciones de estradiol y progesterona en cada etapa del ciclo, mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Los resultados de los estudios *in vitro*, se analizaron por mínimos cuadrados en un modelo de efectos aleatorios (Sokal, 1980). Este procedimiento, estima la variabilidad debida al azar y calcula el efecto producido cada tratamiento, este, se expresa como coeficiente con una probabilidad asociada. Dicho valor indica, la probabilidad de que cada tratamiento sea diferente del control. La expresión que describe el modelo de efectos aleatorios, es la siguiente:

Secreción de insulina =  $\alpha + \tau_i + u_i + e$

donde:

$\alpha$  = valor del control

$u_i$  = variabilidad de cada tratamiento

$\tau_i$  = efecto de cada tratamiento

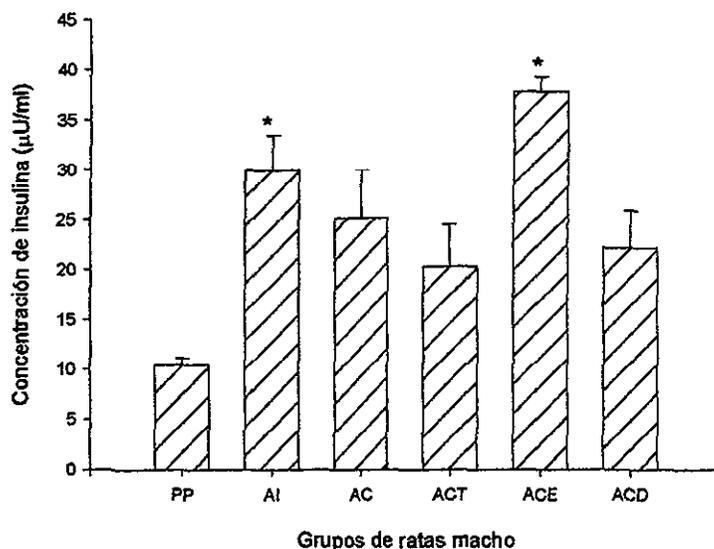
$e$  = error aleatorio

## RESULTADOS

### Estudios *in vivo*.

#### Ratas macho

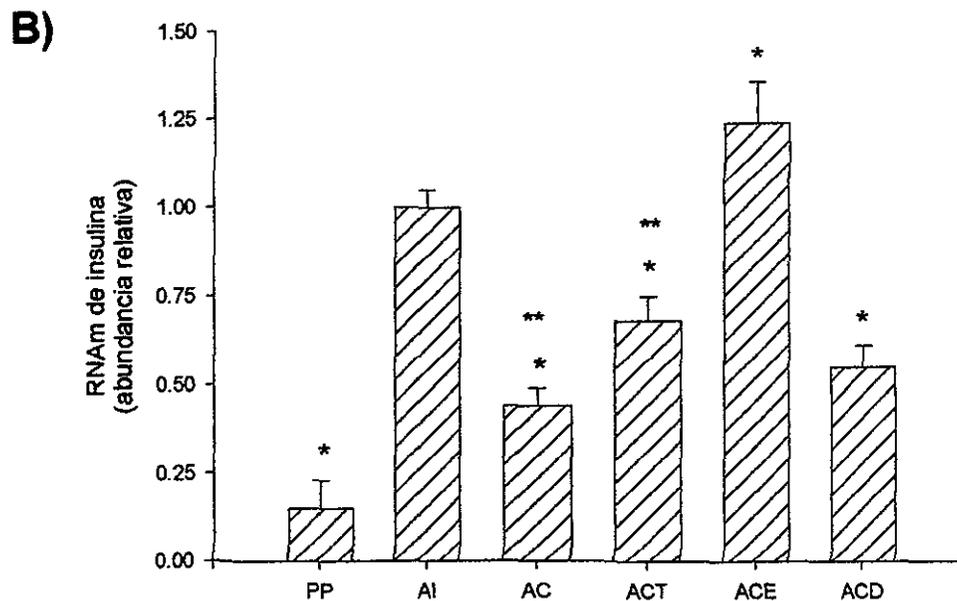
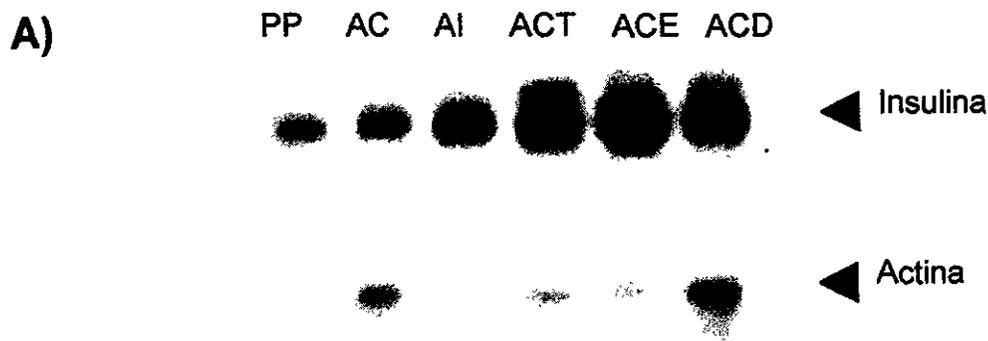
**Concentración de insulina.** Los valores de la insulina en suero, fueron similares en los diferentes grupos de estudio. Únicamente se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los machos prepúberes ( $10.44 \pm 0.66 \mu\text{U/ml}$ ) comparados con los adultos intactos ( $29.93 \pm 3.55 \mu\text{U/ml}$ ) y los prepúberes comparados con los machos sustituidos con estradiol ( $37.82 \pm 1.43 \mu\text{U/ml}$ ). Estos resultados se presentan en la figura 6.



**Figura 6.** Concentración de insulina en suero de diferentes grupos de ratas macho. PP, prepúberes; AI, adultos intactos; Ac, adultos castrados; ACT adultos castrados y sustituidos con testosterona; ACE, adultos castrados y sustituidos con estradiol; ACD, adultos castrados y sustituidos con dihidrotestosterona. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  error estándar. \*  $p < 0.05$  comparado con PP.

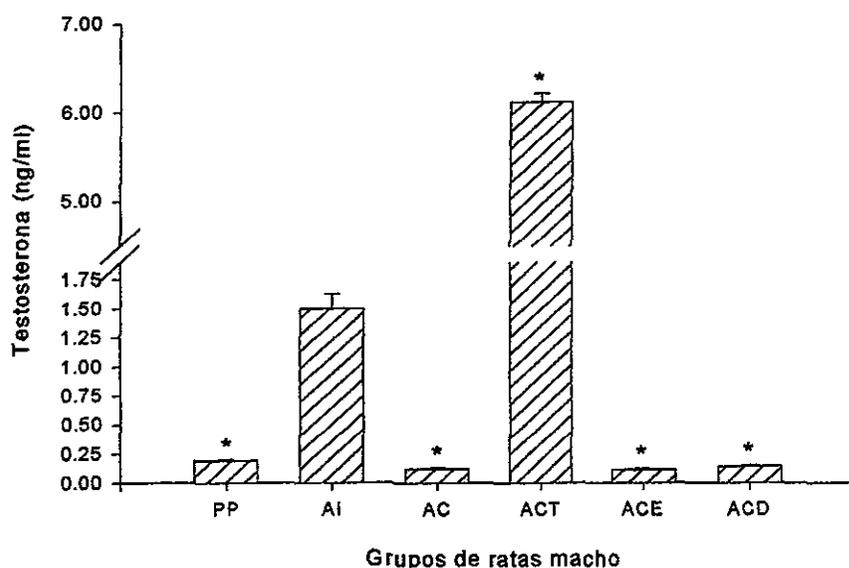
**Expresión del gen de insulina.** La expresión del gen de insulina se muestra como abundancia relativa de su RNAm en la figura 7. Se encontró que los andrógenos tienen un efecto positivo sobre la expresión del gen de insulina. La menor expresión se

observó en las ratas prepúberes, con menos de la quinta parte de la expresión mostrada por el grupo control (adultos intactos). En los machos castrados, la expresión disminuyó a menos de la mitad del valor de los machos intactos y se recuperó (aunque no al 100 %) en los machos castrados y sustituidos con testosterona. La expresión del gen de insulina mostrada por este grupo fue similar al observado en los machos castrados y sustituidos con DHT. Es importante destacar que los animales castrados y sustituidos con estradiol, presentaron una expresión del gen aún mayor que el grupo control (AI).



**Figura 7.** Expresión del gen de insulina en ratas macho. A) Northern blot de insulina y del control constitutivo de expresión. B) Abundancia relativa del RNAm de insulina normalizado por la actina. PP, prepúberes; AI, adultos intactos; AC, adultos castrados; ACT, adultos castrados y sustituidos con testosterona; ACE, adultos castrados y sustituidos con estradiol; ACD, adultos castrados y sustituidos con dihidrotestosterona. \*  $p < 0.05$  comparado con AI. \*\*  $p < 0.05$  comparados entre sí.

**Concentración de testosterona.** Los valores de testosterona en las ratas macho, se muestran en la figura 8. La concentración de esta hormona, se correlaciona (al menos en parte), con la expresión del gen de insulina. En las ratas prepúberes, los adultos castrados y los sustituidos con estradiol y DHT, los valores de testosterona son menores a 0.5 ng/ml; esto concuerda con la baja expresión del gen en los prepúberes y con la disminución de la expresión en los machos castrados, cuando se compara con los controles (AI) en donde la expresión representa el 100% y la concentración de T que mostraron fue > 1.5 ng/ml. En lo que respecta a los sustituidos con estradiol, puede observarse (figura 7) que esta hormona tiene efectos aún mayores que los producidos por la testosterona en la expresión del gen de insulina. En las ratas castradas y sustituidas con testosterona, aunque el valor fue cercano a 6 ng/ml la expresión del gen de insulina no alcanza el valor del control. De manera similar, los animales castrados y sustituidos con DHT, incrementan ligeramente la expresión comparados con los sujetos control.



**Figura 8.** Concentración de testosterona en ratas macho. PP, prepúberes; AI, adultos intactos; AC, adultos castrados; ACT, adultos castrados y sustituidos con testosterona; ACE, adultos castrados y sustituidos con estradiol; ACD, adultos castrados y sustituidos con dihidrotestosterona. Los datos se muestran como promedio  $\pm$  error estándar. \*  $p < 0.05$  comparados con el control (AI).

**Concentración de estradiol.** La concentración de estradiol fue determinada en estos mismos animales, y se encontró que las ratas castradas y sustituidas con E2, presentaron valores comparables a los encontrados en ratas hembra (ver apartado correspondiente) y mayores en más del doble que el resto de los grupos de machos. Los datos completos pueden observarse en la tabla I.

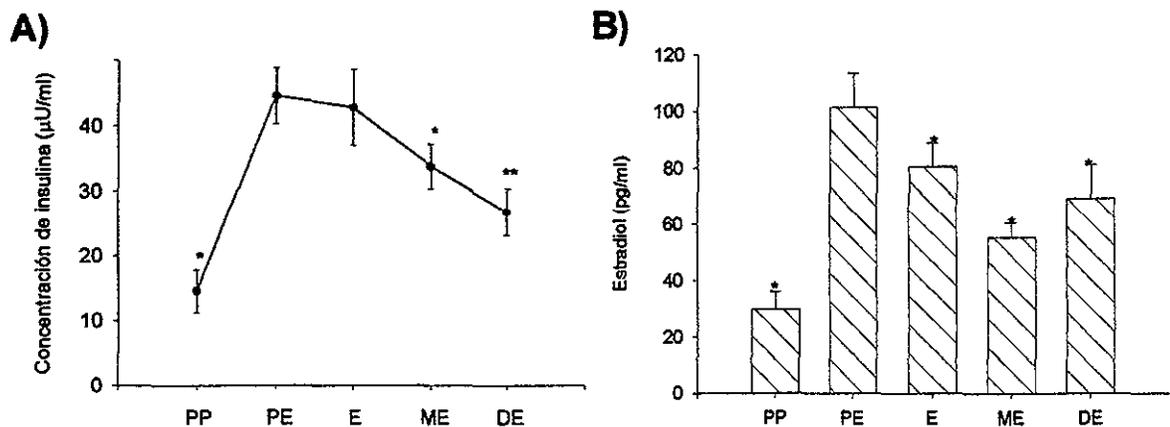
Tabla I. Concentración de estradiol en diferentes grupos de ratas macho.

Grupo	Concentración (pg/ml)
PP	39.12 ± 4.29
AI	43.03 ± 5.59
AC	34.27 ± 5.14
ACT	43.20 ± 9.30
ACE	80.39 ± 4.31 *
ACD	42.95 ± 6.54

PP, prepúberes; AI, adultos intactos; AC, adultos castrados; ACT, adultos castrados y sustituidos con testosterona; ACE, adultos castrados y sustituidos con estradiol; ACD, adultos castrados y sustituidos con dihidrotestosterona. \* p < 0.05 comparado con el resto de los grupos.

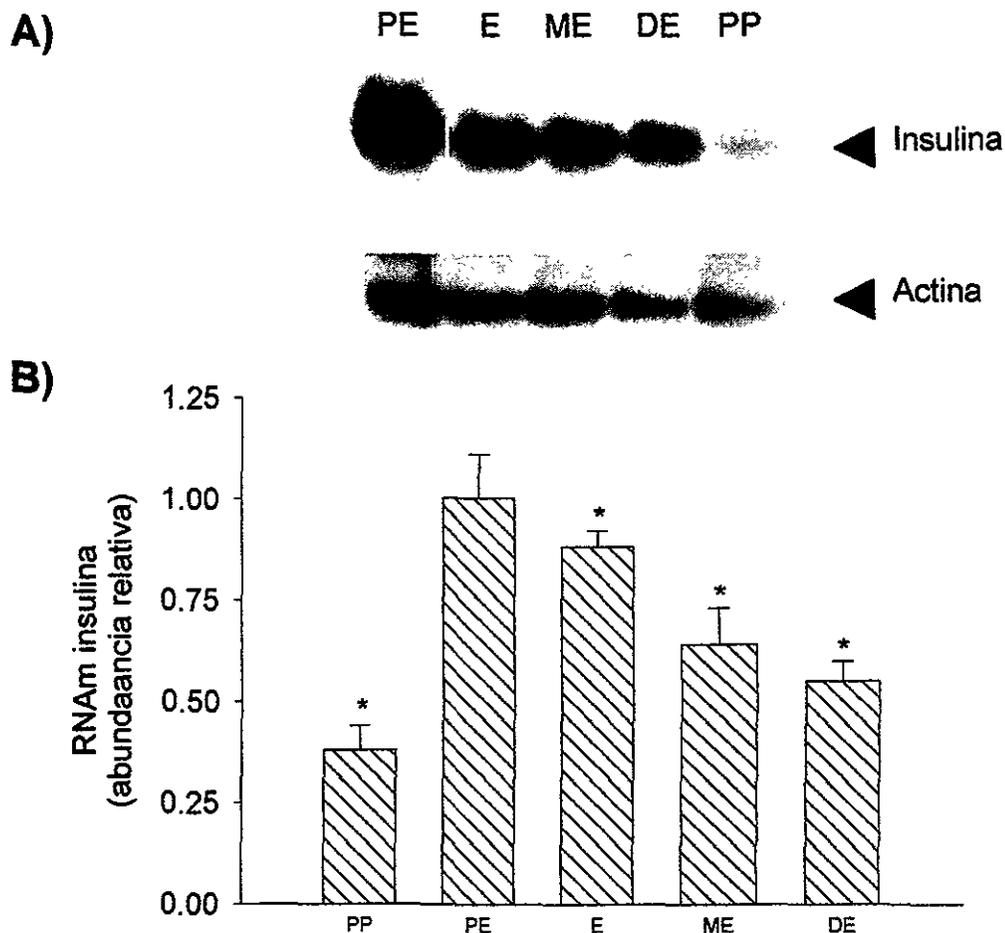
## Ratas hembra

**Concentración de insulina.** Las ratas hembra, presentaron variaciones en la concentración de insulina a lo largo del ciclo estral (figura 9A). Se observó una tendencia a disminuir de acuerdo a la variación en la concentración de estradiol en las diferentes etapas del ciclo (figura 9B). Sin embargo sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las ratas prepúberes y en diestro comparadas con las ratas en proestro y estro, y entre las hembras en metaestro comparadas con las del proestro.



**Figura 9.** Concentración de insulina (A) y concentración de estradiol (B) en suero de ratas hembra en diferentes etapas del ciclo estral. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  error estándar. PP, prepúberes; PE, proestro; E, estro; ME, metaestro; DE, diestro. \*  $p < 0.05$  comparados con PE, \*\*  $p < 0.05$  comparados con PE y E.

**Expresión del gen de insulina.** La expresión del gen de insulina se muestra como abundancia relativa del RNAm y puede observarse en la figura 10A y 10B. La abundancia relativa del RNAm de insulina en las ratas hembra se modificó a lo largo del ciclo estral. Se encontró una mayor expresión en el proestro y esta disminuye en el resto de las etapas. Se observó que las ratas prepúberes presentaron la menor expresión del gen de insulina en comparación con todas las etapas del ciclo estral.



**Figura 10.** Expresión del gen de insulina a lo largo del ciclo estral de la rata. A) Northern blot del gen de insulina y un gen de expresión constitutiva (experimento representativo). B) Expresión del gen de insulina mostrada como abundancia relativa de su RNAm. \*  $p < 0.05$  comparados con PE.

**Concentración de esteroides gonadales.** La concentración de E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> y T en el suero de las ratas hembra se muestran en la tabla II, pueden observarse variaciones en la concentración de estradiol y progesterona a lo largo del ciclo estral, mostrando la concentración mas alta de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> durante el proestro y la mas baja en los animales prepúberes. La concentración de testosterona no se modificó en los diferentes grupos de ratas hembra. Los valores de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> se correlacionaron con la expresión del gen de insulina durante el ciclo estral. Sin embargo la concentración de la testosterona no mostró ninguna correlación. En la tabla III puede observarse el coeficiente de correlación de Pearson para cada hormona en relación con la expresión del gen y su correspondiente probabilidad asociada.

Tabla II. Concentraciones de esteroides sexuales en ratas hembras en diferentes etapas del ciclo estral.

Etapa del ciclo	Estradiol (pg/ml)	Progesterona (ng/ml)	Testosterona (ng/ml)
Prepúberes	29.7 ± 6.3	1.0 ± 0.5	0.189 ± 0.08
Proestro	101.3 ± 12.0	23.4 ± 4.3	0.418 ± 0.11
Estro	80.6 ± 8.2	10.8 ± 4.6	0.292 ± 0.09
Metaestro	55.2 ± 5.3	11.3 ± 2.0	0.213 ± 0.03
Diestro	69.3 ± 11.9	12.9 ± 2.9	0.272 ± 0.02

Valores de E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> y T en suero de ratas hembra a lo largo del ciclo estral. Los datos se muestran como promedio ± error estándar.

Tabla III. Análisis de correlación de Pearson entre la expresión del gen de insulina y las concentraciones de E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> y T a lo largo del ciclo estral.

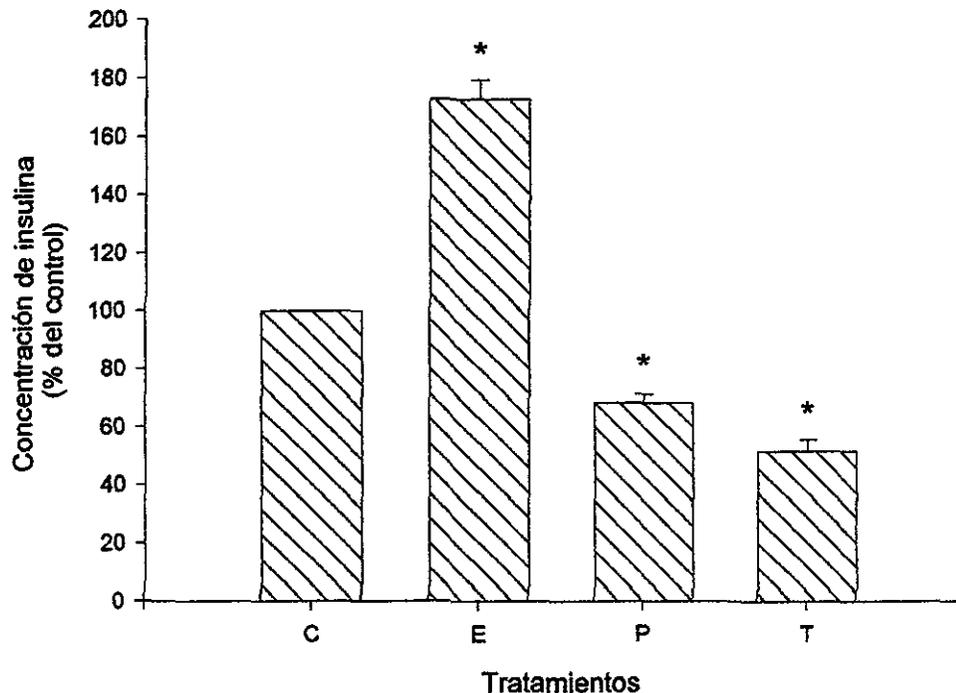
Hormona	Coefficiente de correlación	P
Estradiol	0.913	0.0303*
Progesterona	0.907	0.0353*
Testosterona	0.865	0.1350 <sup>NS</sup>

Coefficiente de correlación de Pearson con su correspondiente probabilidad asociada.  
\*estadísticamente significativo. <sup>NS</sup> no significativo.

## Estudios *in vitro*

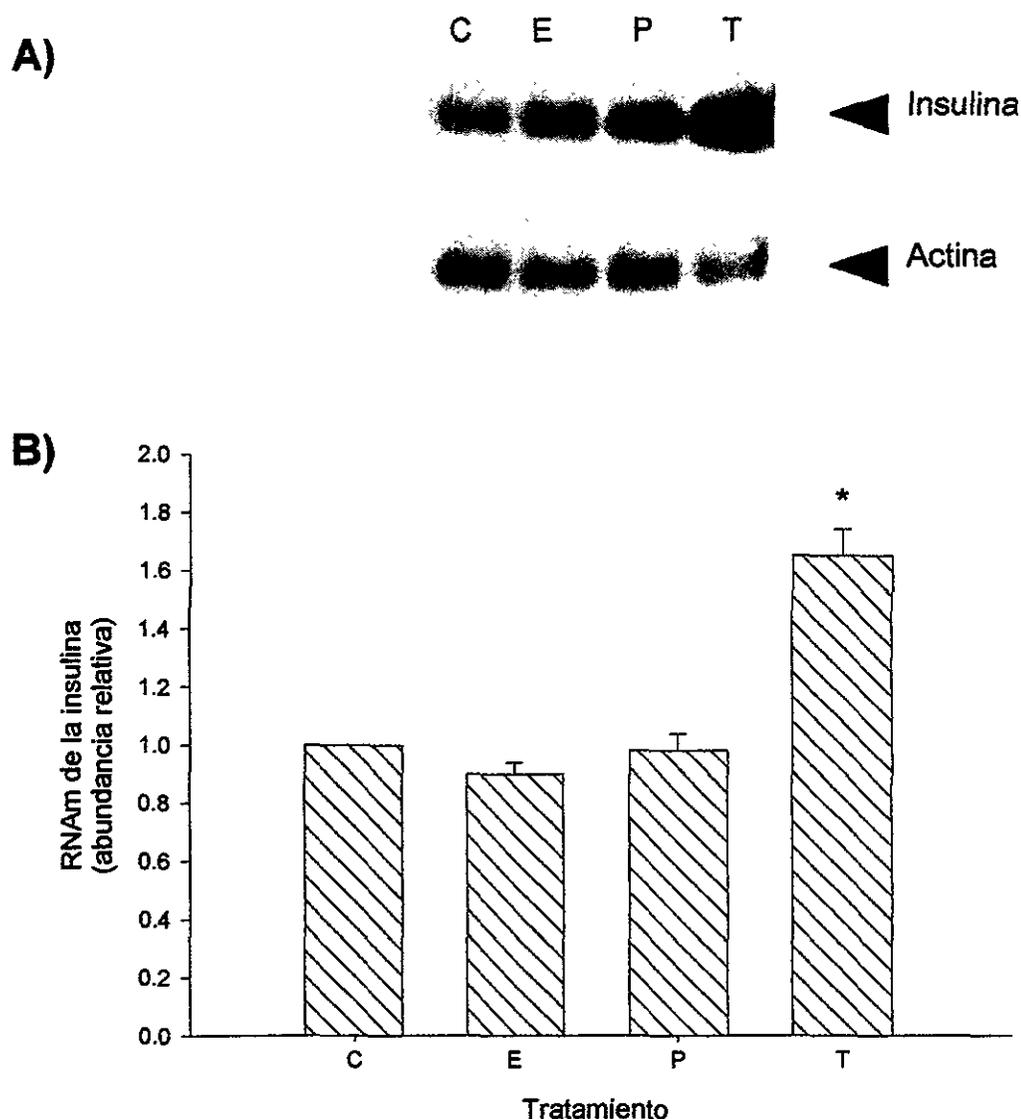
### Tratamiento de los islotes por una hora

**Secreción de insulina.** Para estos experimentos, islotes de ratas macho, se trataron con E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> y T a una concentración de 1 µg/ml por una hora. Se observó que el tratamiento con progesterona provocó una disminución de 20% en la secreción de insulina respecto al control, y la testosterona una disminución del 60%; en cambio el estradiol produjo un incremento en la secreción de casi el doble (75% más respecto al control). Estos resultados pueden observarse en la figura 11.



**Figura 11.** Concentración de insulina secretada al medio por islotes pancreáticos de rata. Los cultivos de islotes pancreáticos fueron tratados por una hora con 1 µg/ml de estradiol (E), progesterona (P), testosterona (T) y etanol al control (C).

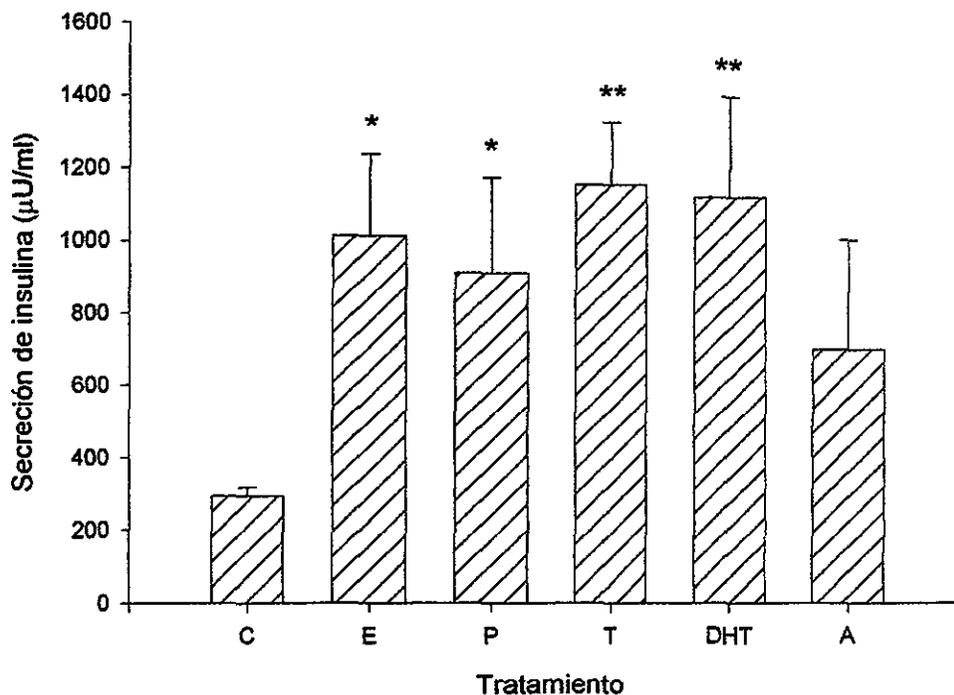
**Expresión del gen de insulina.** En los islotes pancreáticos aislados, únicamente la testosterona aplicada por una hora, tuvo efecto sobre la expresión del gen de insulina. Se observó un incremento de aproximadamente 1.6 veces la expresión mostrada por los islotes control. Ni la progesterona ni el estradiol mostraron efecto alguno (figura 12).



**Figura 12.** Expresión del gen de insulina en islotes pancreáticos de rata tratados con 1  $\mu\text{g/ml}$  de estradiol (E), progesterona (P), testosterona (T) o con etanol (C) a los controles. A) Northern blot representativo donde se muestra la hibridación con insulina y con actina. B) Abundancia relativa del RNAm de insulina en islotes bajo diferentes tratamientos. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  el error estándar. \*  $p < 0.05$  comparado con el control.

### Tratamiento por tres horas

**Secreción de insulina.** Para conocer el efecto de otros andrógenos (androstendiona y dihidrotestosterona) y observar si el aumento en el tiempo de tratamiento con E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> y T modificaba la síntesis de la insulina, se hicieron observaciones de la secreción y contenido de insulina, en islotes tratados con 1 μg/ml de cada hormona, durante 3 horas. La concentración de insulina secretada al medio, se incrementó por el tratamiento con las hormonas utilizadas, aunque de manera altamente significativa (P < 0.006), sólo por T y DHT. Se observa que estos andrógenos incrementan la secreción de insulina entre tres y cuatro veces respecto al control. En la figura 13 se muestra el promedio de la insulina secretada al medio ± el error estándar.



**Figura 13.** Secreción de insulina por cultivos de islotes pancreáticos de rata sometidos a tres horas de tratamiento con diferentes hormonas esteroides. C, control; E, estradiol; P, progesterona; T, testosterona; DHT, dihidrotestosterona; A, androstendiona. \* p < 0.05  
\*\* p > 0.006. Estas probabilidades fueron obtenidas con el modelo de efectos aleatorios para el análisis de estos experimentos (ver texto).

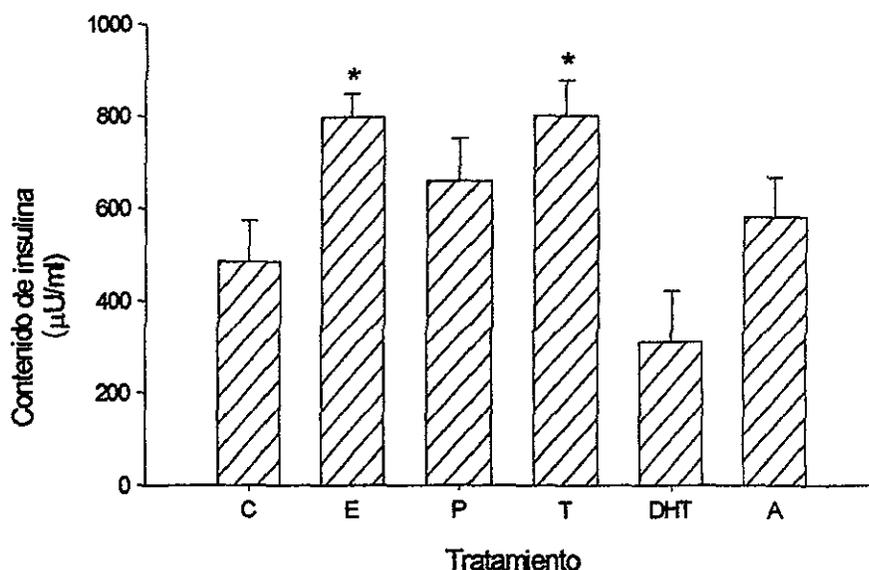
Después de aplicar el modelo de efectos aleatorios (Sokal, 1980) a los datos mostrados en la gráfica anterior, se obtuvo a manera de coeficiente, el efecto producido por cada hormona, con el valor de la probabilidad de que este efecto sea diferente de cero, esto es, diferente a la secreción de insulina mostrada por el control. Estos valores se muestran en la tabla IV.

Tabla IV. Coeficientes y probabilidades asociadas de cada tratamiento obtenidos por el modelo de efectos aleatorios.

Tratamiento	Coeficiente	P
Estradiol	718.18	0.015*
Progesterona	615.53	0.037*
Testosterona	856.83	0.004**
Dihidrotestosterona	822.03	0.005**
Androstendiona	404.93	0.169

El coeficiente corresponde al efecto de cada hormona sobre la secreción de insulina en islotes pancreáticos en cultivo. P, probabilidad \*, significativa y \*\*, altamente significativa.

**Contenido de insulina (insulina no secretada).** Se observó un incremento significativo en la insulina no secretada de los islotes tratados con estradiol y testosterona, ambos esteroides provocaron un aumento de aproximadamente 1.6 veces con respecto al control. En cambio el resto de las hormonas empleadas en esta serie de experimentos, no mostró efectos significativos. Ver figura 14.



**Figura 14.** Contenido de insulina de islotes pancreáticos de rata tratados con diferentes hormonas esteroides. C, control; E, estradiol; P, progesterona; T, testosterona; DHT, dihidrotestosterona; A, androstendiona. \* $p < 0.02$

La tabla V, muestra los coeficientes y su probabilidad asociada, obtenidos después de la aplicación del modelo de efectos aleatorios a los datos obtenidos para contenido de insulina de islotes pancreáticos de rata mantenidos en cultivo, tratados con 1 mg/ml de cada hormona por tres horas.

Tabla V. Valores de los coeficientes y probabilidades asociadas del modelo de efectos aleatorios para los datos de contenido de insulina en islotes en cultivo.

Tratamiento	Coefficiente	P
Estradiol	313.93	0.011*
Progesterona	176.68	0.150
Testosterona	317.84	0.010*
Dihidrotestosterona	-172.33	0.161
Androstendiona	96.34	0.433

P, probabilidad de que el efecto producido por cada tratamiento sea diferente de cero. \* probabilidad estadísticamente significativa.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se muestran los efectos de los esteroides gonadales sobre la síntesis y secreción de la insulina en la rata.

En el modelo *in vivo*, se encontró que la concentración de insulina en suero es diferente en machos y en hembras, lo que supone una condición sexualmente dimórfica. En las hembras (durante PE y E) se determinó una mayor concentración de insulina en comparación con los machos, destacando el hecho de que en los machos castrados y sustituidos con estradiol, la concentración de insulina fue similar a los valores encontrados en las hembras. La influencia de los factores gonadales queda de manifiesto por el hecho de que en los animales prepúberes, tanto machos como hembras se encontraron valores semejantes.

La contribución del dimorfismo sexual, en las concentraciones de insulina en sangre, es también evidente en el humano, como lo demuestran los trabajos de Hale *et. al.* en 1985 y de Ferrara *et. al.*, 1995. En ambos estudios se reportan concentraciones de insulina significativamente mayores en las mujeres que en los hombres, además demuestran que ante iguales concentraciones de glucosa en sangre, la mujer secreta mas insulina que el hombre (Hale *et. al.*, 1985).

La concentración de insulina en sangre en las ratas macho no parece tener cambios tan marcados como en los individuos del sexo femenino, las concentraciones de insulina sólo varían de manera importante entre animales adultos y prepúberes, siendo estos últimos los que tuvieron menores concentraciones de insulina circulante. La influencia de los esteroides gonadales queda de manifiesto cuando a los machos adultos castrados se les sustituye con estradiol. En este grupo de animales, se presentaron las concentraciones más altas de insulina de todos los grupos experimentales.

La expresión del gen de la insulina en los animales macho parece ser regulada al menos en parte por las concentraciones de andrógenos. En los machos castrados se observa una disminución de la expresión con relación al control, situación que se revierte cuando los machos castrados son sustituidos con testosterona. La administración de estradiol a los animales macho produce un efecto similar pero de mayor intensidad. Para descartar que el efecto provocado por la sustitución con testosterona fuera debido a la transformación de esta hormona a estradiol (aromatización), se utilizó en un grupo de animales un andrógeno no aromatizable, la dihidrotestosterona como terapia sustitutiva. En estos animales, el patrón de expresión, fue semejante al mostrado por los machos castrados y sustituidos con testosterona, lo que se interpretó como que el efecto observado es debido a la acción de los andrógenos y no a sus productos de aromatización.

En las ratas hembra, las concentraciones de insulina en sangre se modificaron a lo largo del ciclo estral, siendo durante el proestro donde se observó una mayor concentración de insulina. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Bailey y Matty en 1978, quienes encuentran una mayor secreción de insulina y un aumento en la tolerancia a la glucosa durante el proestro y el estro.

La expresión del gen de insulina en las ratas hembra mostró un comportamiento paralelo a las concentraciones de insulina en cada etapa del ciclo. Durante el proestro, se observó la mayor expresión, y esta fue disminuyendo hasta mostrar la expresión mas baja en las hembras prepúberes. Las concentraciones circulantes de  $E_2$  y  $P_4$  son máximas durante la tarde del proestro (Freeman, 1994) y se reducen durante las otras etapas del ciclo estral; estos datos se correlacionan con la expresión del gen de insulina demostrada en el páncreas. Estos datos sugieren que los cambios en la expresión del gen y en las concentraciones de insulina en suero durante el ciclo estral están probablemente relacionados con las concentraciones endógenas de esteroides sexuales.

En la literatura, se ha reportado que la variación en las concentraciones de esteroides gonadales, tiene efecto en la secreción de insulina y en el metabolismo de la glucosa. Varios estudios indican que los esteroides sexuales en la mujer afectan la sensibilidad a la insulina, alteraciones en el control de la glicemia durante la fase lútea del ciclo menstrual han sido reportadas en mujeres sanas (Valdes and Elkind-Hirsch, 1991; Escalante and Alpizar, 1999). Un efecto similar se ha reportado en mujeres con falla ovárica prematura durante la terapia de reemplazo con estradiol y medroxiprogesterona (Elkind-Hirsch *et. al.*, 1993).

Con los resultados del presente estudio es posible proponer que los esteroides gonadales modifican el metabolismo de la insulina. Algunos autores han sugerido una asociación entre la sensibilidad y secreción de la insulina, que podría explicar el efecto de los esteroides en los estados de resistencia a esta hormona. Kahn y colaboradores (Kahn *et. al.*, 1993) proponen que la sensibilidad a la insulina y su secreción están ligadas a través de una asa de retroalimentación negativa, esto es, que una mayor resistencia a la insulina, ocurre por que la función de la célula beta está aumentada.

A nuestro conocimiento el presente es el primer reporte que demuestra que las hormonas esteroides sexuales participan directamente en la expresión del gen de insulina.

Otra contribución original del presente trabajo, fue el estudio del efecto de las hormonas esteroides en el modelo *in vitro*, de cultivo de islotes pancreáticos de rata. Desde el punto de vista metodológico este modelo ofrece la ventaja de un mejor control de las variables, sin embargo, como todos los modelos de órganos o células aisladas, tiene la limitación de que los datos obtenidos no necesariamente explican los cambios que ocurren en el modelo *in vivo*.

En el modelo *in vitro*, se evaluaron los efectos del E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> y T en la síntesis y secreción de insulina en cultivos agudos de islotes pancreáticos. El tratamiento con E<sub>2</sub>, provocó un incremento en la secreción de insulina a 1 y 3 horas (de casi el doble y el triple del

valor del control respectivamente), este incremento probablemente sea debido al efecto estimulador que también produjo el E<sub>2</sub> en el contenido de insulina. El contenido de insulina en el islote constituye un indicador de la biosíntesis y almacenamiento de esta hormona (Bailey *et. al.*, 1980). Lo interesante de este hecho es que el aumento en el contenido de insulina observado en el tratamiento con estradiol, no corresponde con un incremento en la expresión del gen de insulina. Probablemente el efecto del estradiol sea a nivel de la traducción de los transcritos ya sintetizados, lo que explicaría el incremento en el contenido y no en la síntesis de RNAm de insulina.

La progesterona en los cultivos de islotes provocó un incremento en la secreción de insulina, de aproximadamente 3 veces el valor del control, después de 3 horas de tratamiento. Ni el contenido, ni la expresión del gen de insulina, se modificaron significativamente por efecto de esta hormona. Probablemente la progesterona actúa favoreciendo únicamente, la liberación de la insulina ya procesada; datos similares fueron reportados por Hager *et. al.*, 1972.

A este respecto, existen en la literatura diversos estudios que proponen al E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> como estimuladores de la secreción de insulina basal e inducida por glucosa en islotes pancreáticos de rata ( Costrini and Kalkhoff, 1971; Bailey and Ahmed-Sorour, 1980; El Seifi *et. al.*, 1981) y en algunos casos, como promotores del incremento en el contenido de la insulina almacenada en el islote (Lenzen, 1978).

La testosterona en cambio, administrada como tratamiento por 1 hora, provocó un incremento de casi el doble del valor del control en la expresión del gen de insulina. Este tiempo no fue suficiente para provocar efectos en la secreción, sin embargo, después de 3 horas de tratamiento, se observó un aumento en la insulina almacenada (2 veces el valor del control) y en la concentración de insulina secretada (aproximadamente 3 veces mas que los controles).

Los efectos producidos por la testosterona sobre la síntesis, almacenamiento y secreción de la insulina, muy probablemente están mediados por mecanismos

genómicos y no genómicos en la célula beta del páncreas. Los resultados encontrados en el presente trabajo muestran que existe una regulación de la expresión del gen inducida por la interacción de la testosterona con su receptor, el cual ha sido detectado en el páncreas (Pousette, 1976; Díaz-Sánchez *et. al.*, 1995). Este hallazgo se correlaciona con los datos obtenidos en el modelo *in vivo* en donde los andrógenos influyeron de manera positiva en la expresión del gen de insulina. Además podría contribuir a la explicación de ciertas observaciones clínicas de enfermedades como el síndrome de ovarios poliquísticos, donde un incremento en las concentraciones circulantes de testosterona, se refleja en un aumento de insulina sérica (Burhem *et. al.* 1980).

Aunque el promotor del gen de la insulina no contiene la secuencia consenso de un elemento de respuesta a andrógenos, se ha demostrado que presenta una secuencia reguladora que responde a glucocorticoides (Goodman *et. al.*, 1996). Si bien, este es un elemento de regulación negativa, no se descarta la posibilidad de que la interacción con otros complejos hormona-receptor den como resultado una respuesta diferente. Este hecho abre la posibilidad de que el complejo testosterona-receptor interactúe con este elemento regulador, pues se ha reportado que los andrógenos y los glucocorticoides pueden ejercer su efecto a través de una misma secuencia y también formar heterodímeros con capacidad de actuar sobre la actividad transcripcional de uno y otro receptor (Chen *et. al.*, 1997). Por otra parte, existen reportes de efectos a nivel transcripcional de los receptores a hormonas esteroideas en donde la interacción del complejo hormona-receptor con elementos reguladores no sucede a la manera convencional. Esto ha sido reportado para el receptor a andrógenos en donde la regulación transcripcional puede darse en ausencia de una interacción directa con una secuencia de DNA específica (Kallio *et. al.*, 1998) y para el receptor a progesterona, el cual se une directamente a secuencias no-consenso y actúa regulando la transcripción de ciertos genes (Kepa *et. al.*, 1996).

Por otra parte, los efectos no genómicos de los andrógenos han sido demostrados en células especializadas como los osteoclastos y las células de Sertoli. La testosterona a

través de la unión con su receptor, provoca un aumento en el influjo de calcio desde el exterior y una movilización de los depósitos internos de este catión (Lieberherr *et. al.*, 1994; Gorczynska and Handelsman, 1995). Más evidencias de estos efectos han sido aportadas por Steinsapir y colaboradores quienes en 1991 observaron que en la línea celular LNCaP (de células humanas de cáncer de próstata), la DHT incrementa el calcio intracelular a través de canales de calcio tipo L. Es bien conocido que en las células  $\beta$  del páncreas están presentes (entre otros) canales de calcio tipo L (Misler *et. al.*, 1992; Prentki, 1996; Matschinsky, 1996) y que los cambios en la concentración citoplásmica de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células  $\beta$  pancreáticas es esencial para la regulación de la secreción de insulina, lo que es posible pues promueve la fusión de los gránulos secretores con la membrana plasmática (Pertusa *et. al.*, 1999). Los datos anteriores abren la posibilidad de que la testosterona en el páncreas pueda participar en la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular al interior del islote y con esto modificar también la secreción de insulina.

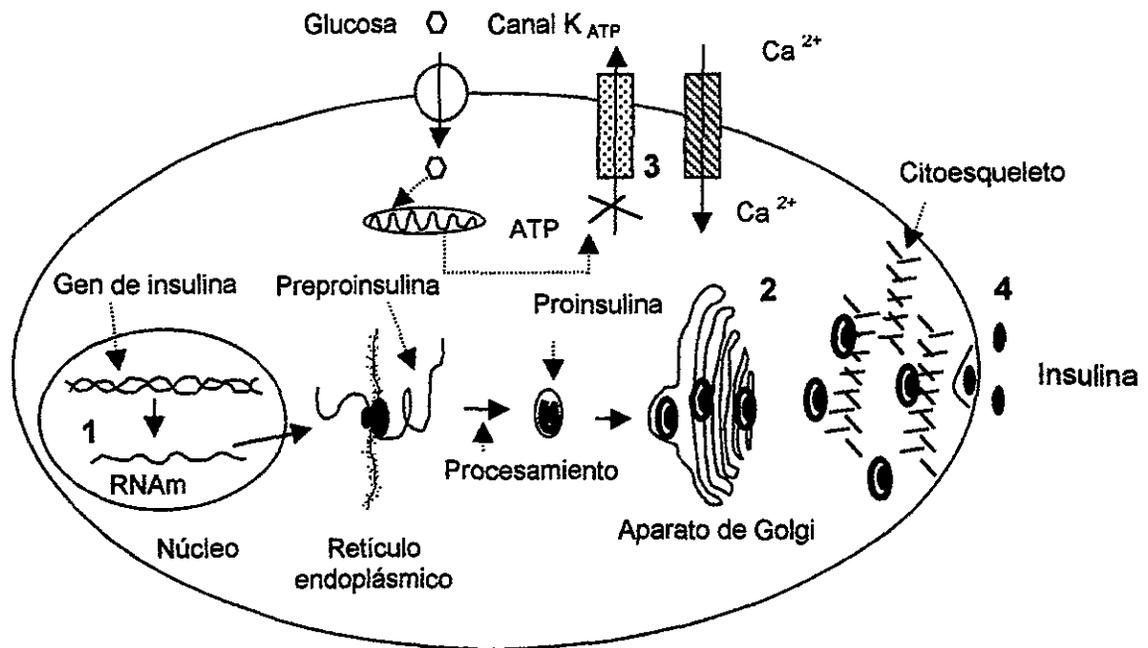
Con respecto a los efectos no genómicos producidos por los estrógenos, se ha observado que en osteoclastos (Fiorelli *et. al.*, 1996) y en el músculo liso vascular (Kitazawa *et. al.*, 1997) el estradiol modifica el calcio intracelular. En la línea celular MCF7 (células humanas de cáncer de mama) los efectos no genómicos del estradiol están involucrados con la modificación de la actividad de ciertas enzimas que participan en la vía de traducción de señales mitogénicas (Migliaccio *et. al.*, 1996). Recientemente (Nadal *et. al.* 1998), se ha demostrado que el estradiol en concentraciones fisiológicas, actúa sinérgicamente con la glucosa para inhibir la actividad de los canales de  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$  y así incrementar la secreción de insulina en el islote pancreático.

Con los datos obtenidos en el presente trabajo, podemos decir que los esteroides sexuales actúan de manera diferencial sobre el metabolismo de la insulina: esto es, que cada grupo de hormonas gonadales, tiene un sitio de regulación específico, ya sea a nivel del RNAm de la preproinsulina, de la síntesis de la hormona madura o de la secreción de la insulina almacenada. Lo anterior se resume en la figura 15.

El presente trabajo, representa la primera evidencia de los mecanismos moleculares de acción de las hormonas esteroides sexuales en la biosíntesis de la insulina. A pesar de que el tema de los efectos de los esteroides en el páncreas ya ha sido abordado con anterioridad (Lenzen and Bailey, 1984), nunca antes se había propuesto que estas hormonas pudieran actuar en tantos y tan diferentes niveles en el proceso de síntesis y secreción de la insulina. Estos resultados abren las posibilidades de explicación de algunas entidades patológicas y una mejor comprensión de los procesos fisiológicos.

La resistencia a la insulina presente por ejemplo en algunos pacientes con el SOP, la mejoría en la tolerancia a los carbohidratos en mujeres menopáusicas con terapia estrogénica de reemplazo, la diferencia en el metabolismo de los carbohidratos y la secreción de insulina en hombres y mujeres; y muchos otros procesos que también se podrían mencionar.

Este trabajo también abre la puerta a otras investigaciones en el futuro. Se debe establecer claramente que determina la actuación de estas hormonas a través de los diferentes mecanismos de acción y en que proporción actúan por mecanismos genómicos y no genómicos en toda la ruta de biosíntesis de insulina. Tratar de establecer un modelo en el que se puedan separar los efectos en particular de cada hormona y así mismo tratar de dar una explicación completa de estos procesos fisiológicos, tomando en cuenta los efectos periféricos y como estos influyen a nivel de la célula  $\beta$  pancreática y su función.



**Figura 15.** Modelo simplificado del mecanismo de síntesis y secreción de la insulina en la célula  $\beta$ . En la figura se muestran los sitios de acción que se proponen para los esteroides sexuales. 1. La testosterona actúa a nivel de la transcripción del gen de insulina, provocando un incremento en la síntesis del RNAm de la insulina. 2. La T y el  $E_2$ , actúan a nivel del almacenamiento de la insulina madura. 3. Los esteroides sexuales (T,  $E_2$ ,  $P_4$ , DHT) pueden modificar la actividad de algunos canales iónicos presentes en la célula  $\beta$ , así como el flujo de iones como el  $Ca^{2+}$ . 4. Favoreciendo el proceso de secreción de la insulina (T, DHT y  $P_4$ ).

## CONCLUSIONES

El metabolismo de la insulina es sexualmente dimórfico y está relacionado con la función gonadal de los individuos.

Los esteroides sexuales, tienen efectos diferenciales en la síntesis, almacenamiento y secreción de la insulina.

En las hembras, las variaciones en las concentraciones del estradiol y la progesterona observadas durante el ciclo estral se correlacionan positivamente con las concentraciones de insulina en sangre y con la expresión del gen.

Se confirma la hipótesis planteada de que el estradiol, la progesterona y la testosterona actúan directamente sobre los islotes pancreáticos.

Estas hormonas mostraron tener efectos directos sobre el proceso de síntesis, secreción y almacenamiento de la insulina en los islotes.

La testosterona mostró efectos a nivel de la transcripción del gen de la insulina en el modelo *in vivo* e *in vitro*.

Los andrógenos, testosterona y DHT, incrementaron significativamente y de manera similar, la secreción de insulina por los islotes de Langerhans, su efecto no depende de procesos de aromatización.

El estradiol y la testosterona provocaron un aumento de magnitud semejante, en el contenido de insulina en los islotes.

La progesterona y la androstendiona no mostraron efectos relevantes sobre la síntesis y contenido de insulina en los islotes en cultivo.

## BIBLIOGRAFIA

Abraham GE (1976). Radioimmunoassay of steroids in biological fluids. **J. Steroid Biochem.** **5**, 161-270.

Ashby CJ, Shirling D, Baird JD (1978). Effects of progesterone on insulin secretion in the rat. **J. Endocrinol.** **76**, 479-486.

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.

Barret-Connor E, Laakso M (1990). Ischemic heart disease risk in postmenopausal women. Effects of estrogen use on glucose and insulin levels. **Arteriosclerosis** **10**, 531-534.

Bailey CJ and Matty AJ (1972). Glucose and plasma insulin of the rat in relation to the oestrous cycle and sex hormones. **Horm. Metab. Res.** **4**, 266-270.

Bailey CJ and Ahmed-Sorour H (1980). Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis. Effects on insulin secretion. **Diabetologia** **19**, 475-481.

Bailyes 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 (1988). Gene regulation by steroid hormones. **Cell** **56**, 275-284.

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

Berggren PO, Rorsman P, Efendic S, Österson G, Flatt PR, Nilsson T Arkhamar P and Juntti-Berggren L (1992). Mechanisms of action of entero-insular hormones, islet peptides and neural input on the insulin secretory process. In: Flatt PR (Ed). **Nutrient regulation of insulin secretion**. Portland Press, London U.K. 289-318.

Bertuzzi F, Saccomanno K, Soggi C, Davalli AM, Taglietti MV, Berra C, Dalcin E, Monti LD, Pozza G and Pontiroli AE (1998). Long-term exposure to high glucose increase proinsulin-like molecules release by isolated human islets. **J. Endocrinol.** **158**, 205-511.

Bird AP (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. **Nature** **321**, 209-213.

Boam DSW and Docherty K (1989). A tissue specific nuclear factor binds to multiple sites in the human insulin gene enhancer. **Biochem. J.** **264**, 233-239.

- 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.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.** **72**, 248-254.
- Breathnach R and Chambon P (1981). Organization and expression of eucariotic split genes coding for proteins. **Ann. Rev. Biochem.** **50**, 349-383.
- Buffington CK, Kitabchi A (1994). Evidence for a defect in insulin metabolism in hyperandrogenic women with polycystic ovarian syndrome. **Metabolism** **43**, 1367-1372.
- Burhem GA, Givens JR, Kitabchi AE (1980). Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** **50**, 113-116.
- Carson-Jurica MA, Schrader WT and O'Malley W (1990). Steroid receptor family: structure and functions. **Endocrine Rev.** **11**, 201-214.
- Cato ACB, Peterziel H (1998). The androgen receptor as mediator of gene expression and signal transduction pathways. **Trends Endocrinol.** **9**, 150-154.
- Cheatham B, Kahn R (1995). Insulin action and the insulin network. **Endocrine Rev.** **16**, 117-142.
- Chen SY, Wang J, Yu GQ, Liu W, Pearce D (1997). Androgen and glucocorticoid receptor heterodimer formation. A possible mechanism for mutual inhibition of transcriptional activity. **J. Biol. Chem.** **272**, 14087-14092.
- 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.
- Corbishley TP, Iqbal MJ, Wilkinson ML and Williams R (1986). Androgen receptor in human normal and malignant pancreatic tissue and cell lines. **Cancer** **57**, 1992-1995.
- Costrini NV, Kalkhoff RK (1971). Relative effects of pregnancy, estradiol and progesterone on plasma insulin and pancreatic islet secretion. **J. Clin. Invest.** **50**, 992-999.
- Crowe DT and Tsai M (1989). Mutagenesis of the rat insulin II 5'-flanking region, defines sequences important for expression in HIT cells. **Mol. Cell. Biol.** **9**, 1784-1789.
- De Vos P, Claessens F, Peeters B, Rombatus W, Heyns W and Verhoeven G (1993). Interaction of androgen and glucocorticoid receptor DNA-binding domains with their response elements. **Mol. Cell. Endocrinol.** **90**, R11-R16.

Díaz-Sánchez V, Morimoto S, Morales A, Robles-Díaz G, Cerbón M (1995). Androgen receptor in the rat pancreas: genetic expression and steroid regulation. **Pancreas** **11**, 241-245.

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

Efrat S (1994). Sexual dimorphism of pancreatic  $\beta$ -cell degeneration in transgenic mice expressing an insulin-ras hybrid gene. **Endocrinology** **128**, 897-901.

Efrat S, Leiser M, Wu Y-J, Fusco-DeMane D, Emran OA, Surana M, Jetton TL, Magnuson MA, Weir G and Fleischer N (1994). Ribozyme-mediated attenuation of pancreatic beta-cell glucokinase expression in transgenic mice results in impaired glucose-induced insulin secretion. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **91**, 2051-2055.

El Seifi S, Green IC, Perrin D (1981). Insulin release and steroid-hormone binding in isolated islets of Langerhans in the rat: effects of ovariectomy. **J. Endocrinol.** **90**, 59-67.

Elkind-Hirsch KE, Sherman LD and Malinak R (1993). Hormone replacement therapy alters insulin sensitivity in young women with premature ovarian failure. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** **76**; 472-475.

Escalante PJM and Alpizar SM (1999). Changes in insulin sensitivity, secretion and glucose effectiveness during menstrual cycle. **Arch. Med. Res.** **30**, 19-22.

Feinberg A and Vogelstein B (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Anal. Biochem.** **137**, 6-13

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.

Ferrara A, Barret-Connor E, Wingard D and Edelstein SL (1995). Sex differences in insulin levels in older adults and the effect of body size, estrogen replacement therapy and glucose tolerance status. **Diabetes Care** **18**, 220-225.

Fiorelli G, Gori F, Frediani U, Franceschelli F, Tanini A, Tosti-Guerra C, Benvenuti S, Gennari L, Becherini L and Brandi ML (1996). Membrane binding sites and non-genomic effects of estrogen in cultured human pre-osteoclastic cells. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.** **59**, 233-240.

Fisher B, Raush U, Wollny P, Westphal H, Seitz J, Aumüller G (1990). Immunohistochemical localization of the glucocorticoid receptor in pancreatic  $\beta$ -cells of the rat. **Endocrinology** **126**, 2635-2641.

Freeman ME (1994). The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Knobil E and Neill JD (Eds). **The Physiology of Reproduction**. 2<sup>nd</sup> edition. Raven press, Ltd. New York. 613-658.

Froguel Ph, Vaxillaire M, Sun F, Vehlo G, Zouali H, Butel MO, Lesage S, Vionnet N, Clement K, Fougerousse F, Tanizawa Y, Weissenbach J, Beckmann, Lathrop GM, Passa Ph, Permutt MA and Cohen D (1992). Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Nature** **356**, 162-164.

Fromont-Racine M, Bucchini D, Madsen O, Besbois P, Linde S, Nilsen JH, Saulnier C, Ripoche MA, Jami J and Pictet R (1990). Effect of 5' flanking sequence deletions on expression of the human insulin gene in transgenic mice. **Mol. Endocrinol.** **4**, 669-677.

Gang GX and Rothenberg PL (1998). Insulin receptor signaling in the  $\beta$ -cell influence insulin gene expression and insulin content. Evidence for autocrine  $\beta$ -cell regulation. **Diabetes** **47**, 1243-1252.

German M, Ashcroft S, Docherty K, Edlund H, Edlund T, Goodison S, Imura H, Kennedy G, Melloul D, Moss L, Olson K, Permutt MA, Philippe J, Robertson RP, Rutter WJ, Serup P, Stein R, Steiner D, Tsai MJ and Walker D (1995). The insulin gene promoter. A simplified nomenclature. **Diabetes** **44**, 1002-1004.

Githens S (1993). Differentiation and development of the pancreas in animals. In: Go VLW, Dimagno P, Gardner UD, Lebenthal E, Reber HA, Scheele A, (Eds). **The Pancreas, Biology, Pathobiology and Disease**. Raven Press Ltd, New York 21-55.

Goodman PA, Medina-Martínez 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.

Gorczyńska E and Handelsman DJ (1995). Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells. **Endocrinology** **136**, 2052-2059.

Green IC, El Seifi S, Perrin D, Howell SL (1981). Cell replication in the islets of Langerhans of adult rats: effects of pregnancy ovariectomy and treatment with steroid hormones. **J. Endocrinol.** **88**, 219-224.

Hager D, George RH, Leitner JW, Beck P (1972). Insulin secretion and content in isolated rat pancreatic islets following treatment with gestational hormones. **Endocrinology** **91**, 977-981.

Hale PJ, Wright JV and Nattrass M (1985). Differences in insulin sensitivity between normal men and women. **Metabolism** **34**, 1133-1138.

- Hammond CB, Jelousek FR, Lee KL, Creasman WT, Parker RT (1979). Effects of long term estrogen replacement therapy. I. Metabolic effects. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **133**, 525-536.
- Harper ME, Ullrich A and Saunders GF (1981). Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 4458-4460.
- Howell SL, Tyhurst M, Green IC (1977). Direct effects of progesterone of rat islets of Langerhans in vivo and in tissue culture. *Diabetologia* **13**, 579-583.
- Hwung YP, Gu YZ and Tsai MJ (1990). Cooperativity of sequences elements mediates tissue specificity of the rat insulin II gene. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 1784-1788.
- Hyuk II and Ping-Cheung L (1992). Autologous regulation pancreatic glucocorticoid receptors in suckling rats. *Pancreas* **7**, 226-232.
- 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.
- Johnson PF and McKnight SL (1989). Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **58**, 799-839.
- Jones PM and Persaud (1998). Protein kinases, protein phosphorylation and the regulation of insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells. *Endocrine Rev.* **19**, 429-461.
- Kallio P, Poukka H, Moilanen A, Jänne OA, Palvimo JJ (1995). Androgen receptor-mediated transcriptional regulation in the absence of direct interaction with a specific DNA element. *Mol. Endocrinol.* **9**, 1017-1028.
- Kahn S, Prigeon RL, McCulloch DK, Boyco EJ, Bergman RN, Schwartz MW, Neifing JL, Ward K, Beard JC, Palmer JP and Porte D Jr (1993). Quantification of the relationship between insulin sensitivity and  $\beta$ -cell function in human subjects. *Diabetes* **42**, 1663-1672.
- Karlisson 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. Acad. Sci.* **84**, 8819-8823.
- Karlisson O, Walker MD, Rutter WJ and Edlund T. (1989). Individual protein binding domains of the insulin gene enhancer positively activate  $\beta$  cells specific transcription. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 823-827.

Kepa JK, Jacobsen BM, Boen EH, Pendergast P, Edwards P, Takimoto G, Wierman ME (1996). Direct binding of progesterone receptor to nonconsensus DNA sequences repress rat GnRH. **Mol. Cell. Endocrinol.** **117**, 27-39.

Khatim MS, Mahmood HA, Gumma KA, Helleström C (1984). Effects of steroid hormones on DNA synthesis and insulin production of isolated fetal rat pancreatic islets in tissue culture. **Med. Biol.** **62**, 210-213.

Khoury G and Gruss P (1983). Enhancer elements. **Cell** **33**, 313-314.

Kitazawa T, Hamada E, Kitazawa K and Gaznabi AK (1997). Non-genomic mechanism of 17  $\beta$ -oestradiol-induced inhibition of contraction in mammalian vascular smooth muscle. **J. Physiol.** **499**, 497-511.

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

Kühl C (1977). Serum insulin and plasma glucagon in human pregnancy. On the pathogenesis of gestational diabetes. **Acta Diabetol. Lat.** **14**, 1-8.

Lacy PE and Kostianovsky M (1967). Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes** **16**, 35-39.

Landers JP and Spelberg TC (1992). New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. **Crit. Rev. Eukaryot. Gene Express.** **2**, 19-63.

Lenzen S (1978). Effects of ovariectomy and treatment with progesterone or estradiol 17 $\beta$  on the secretion of insulin by the perfused rat pancreas. **J. Endocrinol.** **78**, 153-154.

Lenzen S, Bailey CJ (1984). Thyroid hormones, gonadal and adrenocortical steroids and the function of the islets of Langerhans. **Endocrine Rev.** **5**, 411-434.

Lieberherr M and Grosse B (1994). Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-triphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein. **J. Biol. Chem.** **269**, 7217-7223.

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

Maclaren NK, Neufeld M, Mclaughlin JV, Taylor G (1980). Androgen sensitization of streptozotocin induced diabetes in mice. **Diabetes** **29**, 710-718.

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 cells to pregnancy involve the pancreatic glucose sensor glucokinase. **J. Endocrinol.** **155**, 247-253.

Maniatis T, Goodbourn S and Fisher JA (1987). Regulation of inducible and tissue-specific expression. **Science** **236**, 1237-1245.

Matschinsky FM (1996). A lesson in metabolic regulation inspired the glucokinase glucose sensor paradigm. **Diabetes** **45**, 223-241.

Matthes H, Kaiser A, Stier U, Riecken EO, Rosewick S (1994). Glucocorticoid receptor gene expression in the exocrine and endocrine rat pancreas. **Endocrinology** **124**, 476-479.

McEwan I and Gustafsson JA (1997). Interaction of the human androgen receptor transactivation function with the general transcription factor TFIIF. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **94**, 8485-8490.

Migliaccio A, Domenico MD, Castoria G, De Falco A, Bontempo P, Nola E and Auricchio F (1996). Tyrosine kinase/p21<sup>ras</sup>/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF7 cells. **EMBO J.** **15**, 1292-1300.

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

Mitchel PJ and Tjian R (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. **Science** **245**, 371-378.

Moggetti P, Tosi F, Castello R, Magnani CHM, Negri C, Brun E, Furlani L, Caputo M and Muggeo M (1996). The insulin resistance in woman with hyperandrogenism is partially reversed by antiandrogen treatment: evidence that androgens impair insulin action in women. **J Clin. Endocrinol. Metab.** **81**, 952-960.

Müller HP, Sogo JM and Schaffner W (1988). An enhancer stimulates transcription in trans when attached to the promoter via a protein bridge. **Cell** **58**, 766-777.

Nadal A, Rovira JM, Laribi O, León-Quinto T, Andreu E, Ripoll C and Soria B (1998). Rapid insulinotropic effect of 17 $\beta$ -estradiol via a plasma membrane receptor. **FASEB J.** **12**, 1341-1348.

Newgard CB and McGarry JD (1995). Metabolic coupling factors in pancreatic  $\beta$ -cell signal transduction. **Ann. Rev. Biochem.** **64**, 689-719.

ESTA TESIS NO SALI  
DE LA BIBLIOTECA

- Nielsen JH (1984). Direct effect of gonadal and contraceptive steroids on insulin release from mouse pancreatic islets in organ culture. **Acta Endocrinol.** **105**, 245-250.
- Nielsen JH, Nielsen V, Pedersen ML, Deckert T (1986). Effects of pregnancy hormones on pancreatic islets in organ culture. **Acta Endocrinol.** **111**, 336-341.
- 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.
- Pertusa JAG, Sánchez-Andrés JV, Martín F and Soria F (1999). Effects of calcium buffering on glucose induced insulin release in mouse pancreatic islets: an approximation to the calcium sensor. **J. Physiol.** **520**, 473-483.
- Philippe J and Missotten M (1990). Dexamethasone inhibits insulin biosynthesis by destabilizing insulin messenger ribonucleic acid in hamster insulinoma cells. **Endocrinology** **127**, 1640-1645.
- Philippe J and Missotten M (1990 a). Functional characterization of a 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.
- Poretsky L (1991). On the paradox insulin-induced hyperandrogenism in insulin resistant states. **Endocrine Rev.** **12**, 3-13.
- Poussete A (1976). Demonstration of an androgen receptor in rat pancreas. **Biochem. J.** **157**, 229-232.
- Prentki M (1996). New insights into pancreatic  $\beta$ -cell metabolic signaling in insulin secretion. **Eur. J. Endocrinol.** **134**, 272-286.
- Ptashne M (1988). How to eukaryotic transcriptional activators work. **Nature** **333**, 683-689.
- Rossini AA, Williams RM, Appel MC, Like AA (1978). Sex differences in the multiple dose streptozocin model of diabetes. **Endocrinology** **103**, 1518-1528.
- Sambrook J, Fritsch T, Maniatis T (1989) **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2<sup>nd</sup> edn. Cold Spring Harbord Lab. New York. Vol I, II, III.
- Saltzmann AG and Weinmann R (1989). Promoter specificity and modulation of RNA polymerase II transcription. **FASEB J.** **3**, 1723-1733.

Shi K, Mizuno A, Sano T, Ishida K, Shima K (1994). Sexual difference in the incidence of Diabetes mellitus in Otsuka-Long-Evans-Tokushima-Fatty rats: effects of castration and sex hormone replacement on its incidence. **Metabolism** **43**, 1214-1220.

Shmid W, Strahle U, Mestrlil R, Klock G, Akenbauer W and Schutz G (1989). Steroid response elements. Definition of a minimal promoter and interaction with other activating sequences. In: Roy AK and Clark JH (Eds). **Gene regulation by steroid hormones IV**. Springer-Verlag, New York. 78-88.

Shoupe D, Lobo RA (1984). The influence of androgens on insulin resistance. **Fert. Esteril.** **41**, 385-388.

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

Sokal RR and Rohlf FJ (1980). **Introducción a la bioestadística**. REVERTE, Barcelona. 1320-156.

Sorenson RL, Brelje C, Roth C (1993). Effects of steroid and lactogenic hormones on islets of Langerhans: a new hypothesis for the role of pregnancy steroids in the adaptation of islets to pregnancy. **Endocrinology** **133**, 2227-2234.

Steinsapir J, Socci R and Reinach P (1991). Effects of androgen on intracellular calcium of LNCaP cells. **Biochemm. Biophys. Res. Comm.** **179**, 90-96.

Sutter-Dub MT (1979). Effects of pregnancy and progesterone and/or oestradiol on the insulin secretion and pancreatic insulin content in the perfused rat pancreas. **Diab. Metab.** **5**, 47-56.

Sutton P, Peters M and McShane P (1986). Isolation of rat pancreatic islets by ductal injection of collagenase. **Transplantation** **42**, 689-691.

Tropeano G, Liberale I, Voulo IP, Barini A, Caroli G, Carfagna P and Menini E (1997). Effects of ovary suppression by a long-acting GnRH-agonist on circulating GH; insulin-like growth factor I and insulin levels in women with polycystic ovary syndrome. **J. Endocrinol. Invest.** **20**, 220-224.

Valdes CT and Elkind-Hirsch KE (1991). Intravenous glucose tolerance test-derived insulin sensitivity changes during the menstrual cycle. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** **72**, 642-646.

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

Welsh M (1989). Glucose regulation of insulin gene expression. **Diabetes. Metab.** **15**, 367-371.

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

Whelan J, Poon D, Weil PA and Stein R (1989). Pancreatic  $\beta$ -cell specific expression of the rat insulin II gene is controlled by positive and negative cellular transcriptional elements. **Mol. Cel. Biol.** **9**, 3253-3259.

Winborn WB, Sheridan PJ, McGill HC (1987). Localization of progestin receptors in the islets of Langerhans. **Pancreas** **2**, 289-294.

Xu GG and Rothenberg PL (1998). Insulin receptor signaling in the  $\beta$ -cell influence insulin gene expression and insulin content. Evidence for autocrine  $\beta$ -cell regulation. **Diabetes** **47**, 1243-1252.

Yamamoto KR (1985). Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. **Ann. Rev. Genet.** **19**, 209-252.