

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III



**MODULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN DEL
RECEPTOR DE INSULINA POR LA 1,25-
DIHIDROXIVITAMINA D₃. IMPLICACIONES EN EL
CONTROL DE LAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LA
INSULINA.**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

Begoña Maestro Gutiérrez

Bajo la dirección del Doctor:

Consuelo Calle García

Madrid, 2003

ISBN: 84-669-1700-4

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**MODULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN DEL
RECEPTOR DE INSULINA POR LA 1,25-
DIHIDROXIVITAMINA D₃. IMPLICACIONES EN EL
CONTROL DE LAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LA
INSULINA.**

Trabajo presentado por **Begoña Maestro Gutiérrez**,
Licenciada en Ciencias Biológicas,
para optar al grado de Doctor.

Director: Prof. **Consuelo Calle García**

Lugar de Realización: **Depto. Bioquímica y Biología Molecular III
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid**

VºBº del Director de la Tesis:

El autor:

Fdo.: Prof. Consuelo Calle García

Fdo.: Begoña Maestro Gutiérrez



DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID (SPAIN)
FAX: 34-91-3941691

CONSUELO CALLE GARCÍA doctora en Ciencias Biológicas y Profesora Titular del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA:

Que Dña. **Begoña Maestro Gutiérrez**, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado **Modulación transcripcional del gen del receptor de insulina por la 1,25-dihidroxitamina D₃. Implicaciones en el control de las actividades biológicas de la insulina** que presenta como Tesis Doctoral.

Madrid, a 9 de Diciembre de dos mil dos.

**“Y que me perdonen si no supe verlo todo,
recordarlo todo, ni fui capaz de intuirlo”**

Alexsandr Solzhenitsyn.

“La naturaleza es sobre todo admirable en sus detalles”

San Isidoro.

A mis padres y hermanos.

AGRADECIMIENTOS

En Primer lugar quiero agradecer a la Dra. Consuelo calle, mi Directora de Tesis, el haberme introducido en el mundo de la investigación y darme la oportunidad de poder realizar mi Tesis Doctoral.

Quiero agradecer a la Universidad Complutense el haberme otorgado la Beca Predoctoral UCM con la que he realizado mi Tesis Doctoral, y al departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la UCM el haberme admitido y hacerme partícipe en el uso de su infraestructura.

A mis compañeras, Susana Bajo y Susana Molero quiero agradecerles la ayuda que me han dado tanto emocional como material y en este sentido muy especialmente un enorme agradecimiento a mi compañero Javier Campión, también agradecerle a su esposa Ainhoa Ripodas el aguantar las charlas monotema. También quiero agradecer a Moisés su ayuda logística.

Agradezco la ayuda de José Luis Rodríguez, Alfonso Luque, gracias al cual he pasado grandes momentos en el departamento, Juan Carlos Gallego y Oscar Jiménez. Todos ellos me han ayudado mucho con sus conocimientos.

Además, agradecer a mis vecinos de departamento (el Dr. José Antonio Ramos y todo su equipo) la ayuda que me han brindado y su magnífica hospitalidad.

A los doctores Norma Dávila, Patricio Aller, Nuria Vilaboa, Feli Mata y Angel Santos también quiero agradecerles su ayuda.

Quiero hacer un agradecimiento general a todos los que formamos el grupo del café: Javi, Alfonso, Nati, Torres, Javier, Juan Carlos, José Luis, M^a Jose, etc.

A mis amigos de la cuarta planta (Bienve, Mar, Pili, Patricia, y todos los que no he puesto porque la lista se hace muy grande y ellos saben muy bien quiénes

son) les agradezco los buenos momentos que he pasado tanto en las “fiestas del departamento” como en las comidas y los cafés, también agradecerles que soportaran mis malos rollos en los momentos de “depre”.

Y finalmente, y por supuesto no el menos importante, el agradecimiento eterno a mi familia, cuñadas y novio que me ha dado su apoyo incondicional demostrándolo en cualquier momento, alegrándose junto a mí con mis logros y soportando todos mis disgustos sin demasiadas quejas.

PUBLICACIONES

Esta Tesis Doctoral y las publicaciones a las cuales ha dado lugar han sido financiadas por las Ayudas a la Investigación: 97/1218 del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, PB96-0573 y BCM2000/0765 de la Dirección General de Enseñanza Superior y 08.6/0010/98 de la Comunidad de Madrid.

Esta Tesis Doctoral ha producido las siguientes publicaciones y congresos:

Publicaciones:

Maestro B, Campión J, Dávila N, Calle C.: Stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ of insulin receptor expression and insulin responsiveness for glucose transport in U-937 human promonocytic cells. *Endocr. J.* 47(4): 383-391, 2000.

Maestro B., Molero S., Bajo S., Dávila N., Calle C.: Transcriptional activation of the human insulin receptor gene by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Cell Biochemistry and Function* 20: 227-232, 2002.

Maestro B., Dávila N., Carranza M.C., Calle C.: Identification of a vitamin D₃ response element in the human insulin receptor gene promotor. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* (en prensa 2002).

Congresos:

Maestro B., Campión J., Mata F., Dávila N., Carranza MC., Calle C.: La acción de la 1,25-dihidroxivitamina D₃ incrementando la expresión del gen del receptor de insulina humano implica la regulación de sus propios receptores. XIV Congreso de la Sociedad Española de Diabetes. Marzo 1998. Murcia, España.

Maestro B., Campión J., Dávila N., Carranza MC., Calle C.: La 1,25-dihidroxivitamina D₃ induce una regulación positiva de su propio receptor a nivel de ARN y a nivel de proteína en promonocitos humanos U-937. XXII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Septiembre 1999. Pamplona, España.

Maestro B., Campión J., Dávila N., Carranza MC. , Calle C.: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases insulin binding and insulin-stimulated glucose

transport in U-937 cells. XXXV Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. Septiembre 1999. Bruselas, Bélgica.

Maestro B., Campión J., Dávila N., Molero S., Calle C.: Differential regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ of two insulin actions: glucose oxidation and DNA synthesis. XXXVI Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. Septiembre 2000. Jerusalem, Israel.

Maestro B., Molero S., Dávila N., Calle C.: Activación transcripcional del gen del receptor de insulina humano por la 1,25-dihidroxitamina D₃. 43 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición. Mayo 2001. Santiago de Compostela, España.

Maestro B., Molero S., Dávila N., Bajo S., Calle C.: Transcriptional activation of the human insulin receptor gene by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. XXXVII Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. Septiembre 2001. Glasgow, Escocia.

Maestro B., Dávila N., Carranza M.C., Calle C.: Identification of a vitamin D₃ response element in the human insulin receptor gene promoter. Mayo 2002. 15th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology. Munich, Alemania.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. La 1,25-dihidroxitamina D₃ y su receptor	2
1.1. El gen del receptor de la 1,25-dihidroxitamina D ₃	4
1.2. El receptor de la 1,25-dihidroxitamina D ₃ . Dominios estructurales.....	5
1.3. El receptor de la 1,25-dihidroxitamina D ₃ como mediador de las actividades biológicas de la 1,25-dihidroxitamina D ₃	8
1.4. Distribución tisular del receptor de la 1,25-dihidroxitamina D ₃ . Autorregulación por los niveles de la 1,25-dihidroxitamina D ₃	11
2. LA INSULINA Y SU RECEPTOR	13
2.1. Regulación de los niveles plasmáticos de insulina por la 1,25-dihidroxitamina D ₃ . Antecedentes.....	13
2.2. El receptor de insulina. Características estructurales.....	14
2.3. El receptor de la insulina como mediador de las acciones biológicas de la insulina.....	15
2.4. Regulación del receptor de la insulina y de la actividad insulínica por la 1,25-dihidroxitamina D ₃ . Antecedentes.....	18
2.5. El gen del receptor de insulina. Características estructurales.....	19
2.6. El promotor del gen del receptor de insulina. Presencia de elementos de respuesta a distintos factores transcripcionales.....	20
2.7. Regulación de la expresión del gen del receptor de insulina por la 1,25-dihidroxitamina D ₃ . Antecedentes.....	27
OBJETIVOS	28
MATERIALES Y MÉTODOS	30
1. APARATOS	31
2. REACTIVOS	32
3. MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	35
3.1. Animales.....	35
3.2. Tratamientos.....	36

3.3.	Obtención de las muestras de orina, sanguíneas y tisulares.....	37
3.4.	Valoraciones en orina.....	37
3.5.	Valoraciones en plasma.....	37
3.6.	Valoraciones en tejidos.....	38
3.6 a)	ADN.....	38
3.6 b)	Proteínas.....	38
4.	MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i>	39
4.1.	Línea celular U-937.....	39
4.2.	Condiciones de cultivo.....	40
4.3.	Tratamientos.....	40
4.4.	Análisis de viabilidad celular.....	41
5.	OBTENCIÓN DE SONDAS DE ADN	41
5.1.	Sondas obtenidas.....	41
5.2.	Métodos utilizados.....	42
5.2 a)	Obtención de bacterias competentes.....	42
5.2 b)	Transformación de las bacterias con los plásmidos.....	43
5.2 c)	Crecimiento de las bacterias transformadas.....	43
5.2 d)	Lisis bacteriana y purificación del ADN plasmidial.....	44
5.2 e)	Extracción y purificación de fragmentos de ADN contenidos en plásmidos.....	45
6.	MARCAJE RADIOACTIVO DE SONDAS DE ADN	47
6.1.	Reacción de marcado.....	47
6.2.	Purificación de la sonda marcada.....	47
7.	PURIFICACIÓN DE ARN	48
7.1.	Extracción del ARN de los tejidos.....	48
7.2.	Extracción del ARN de las células U-937.....	49
7.3.	Valoración y comprobación de la integridad del ARN obtenido.....	49
8.	SEPARACIÓN ELECTROFORETICA DEL ARN	50

9. TRANSFERENCIA A MEMBRANAS DEL ARN E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE ADN MARCADAS RADIATIVAMENTE (TÉCNICA NORTHERN)	51
9.1. Prehibridación.....	52
9.2. Hibridación.....	52
9.3. Lavados y autorradiografías.....	52
9.4. Tratamiento cuantitativo de los datos.....	53
10. DETERMINACIÓN DE RECEPTORES DE INSULINA	54
10.1. Aislamiento de adipocitos del tejido epididimal de rata.....	54
10.2. Estudios de la unión de la insulina a su receptor en adipocitos de rata.....	54
10.3. Recogida de las células U-937.....	55
10.4. Estudios de la unión de la insulina a su receptor en las células U-937.....	56
11. DETERMINACIÓN DE RECEPTORES DE 1,25-DIHIIDROXIVITAMINA D₃	57
11.1. Estudios de la unión de la 1,25-dihidroxitamina D ₃ a su receptor en las células U-937. Separación de fracciones nucleares.....	57
11.2. Estudios de <i>Western blot</i> . Obtención de extractos nucleares de células U-937.....	58
12. ESTUDIOS DE VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA INSULINA	60
12.1. Transporte de glucosa basal e inducido por insulina.....	60
12.1 a) En adipocitos aislados del tejido epididimal de rata...	60
12.1 b) En células U-937.....	61
12.2. Oxidación de glucosa basal e inducida por insulina.....	62
12.2 a) En adipocitos aislados del tejido epididimal de rata...	62
12.2 b) En células U-937.....	62
12.3. Incorporación de timidina basal e inducida por insulina en las células U-937.....	63
12.4. Determinación de la respuesta y sensibilidad a la insulina.....	64

13. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS POR ELECTROPORACIÓN EN CÉLULAS U-937	64
13.1. Construcción de plásmidos <i>reporter</i> por la técnica de subclonaje o delección.....	64
13.2. Transfecciones transitorias.....	69
13.3. Cuantificación de la actividad transcripcional.....	70
14. BÚSQUEDA Y ANÁLISIS COMPUTERIZADO DE SECUENCIAS DE ADN	71
15. TÉCNICA DE RETARDO EN GEL UTILIZANDO EXTRACTOS NUCLEARES DE CÉLULAS U-937	72
15.1. Oligonucleótidos utilizados.....	72
15.2. Marcaje de oligonucleótidos por la T4 polinucleótido quinasa.....	73
15.3. Reacciones de competición.....	73
16. REPRESENTACIÓN Y ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS..	74
<u>RESULTADOS</u>	76
1. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	77
1.1. Efecto de altos niveles de 1,25-dihidroxitamina D ₃ en ratas sin o con diabetes experimental inducida por estreptozotocina..	77
1.1 a) Medida de peso de los animales.....	77
1.1 b) Valoraciones en orina.....	78
1.1 c) Valoraciones plasmáticas.....	79
1.1 d) Características tisulares de los distintos tejidos en estudio.....	80
1.1 e) Regulación de la expresión del gen del receptor de insulina en los distintos tejidos en estudio.....	84
1.1 f) Regulación de la unión de la insulina a su receptor en adipocitos aislados del tejido adiposo epididimal.....	90
1.1 g) Regulación del transporte de glucosa basal e inducido por insulina en adipocitos aislados del tejido adiposo epididimal.....	93

1.1 h) Regulación de la oxidación de glucosa basal e inducida por insulina en adipocitos aislados del tejido adiposo epididimal.....	94
2. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	96
2.1. Regulación por la 1,25-dihidroxitamina D ₃ de la expresión del gen de su propio receptor.....	96
2.2. Regulación por la 1,25-dihidroxitamina D ₃ de la proteína de su propio receptor.....	98
2.2 a) Por estudios de unión.....	98
2.2 b) Por <i>Western blot</i>	99
2.3. Regulación de la expresión del gen del receptor de insulina por la 1,25-dihidroxitamina D ₃	100
2.4. Regulación de la unión de la insulina a su receptor por la 1,25-dihidroxitamina D ₃	101
2.5. Regulación de las respuestas biológicas de la insulina por la 1,25-dihidroxitamina D ₃	103
2.5 a) Sobre el transporte de glucosa basal e inducido por insulina.....	103
2.5 b) Sobre la oxidación de glucosa basal e inducida por insulina.....	106
2.5 c) Sobre la incorporación de timidina basal e inducida por insulina.....	109
2.6. Regulación de la actividad transcripcional del promotor del gen del receptor de insulina por la 1,25-dihidroxitamina D ₃	110
2.7. Estudio de unión del receptor de la 1,25-dihidroxitamina D ₃ a potenciales VDREs en el promotor del gen del receptor de insulina.....	114
<u>DISCUSIÓN</u>	123
1. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	124
2. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	132

<u>CONCLUSIONES</u>	139
----------------------------------	-----

<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	142
----------------------------------	-----

ABREVIATURAS

1,25-(OH)₂D₃	1,25-Dihidroxitamina D ₃
A	Adenina
aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
B	Hormona unida a receptores
C	Citosina
DR3, 6	Repeticiones directas espaciadas por 3 o 6 nucleótidos
F	Hormona libre
G	Guanina
GAB-1	Unidor asociado a dos receptores del factor de crecimiento-1.
GRE	Elemento de respuesta a glucocorticoides
h	Hora
hOC	Osteocalcina humana
IR	Receptor de insulina
IRS	Sustratos del receptor de insulina 1-4
kb	Kilobases
K_d	Constante de disociación
kDa	Kilodalton
MAPK	Proteína quinasa activadora de la mitogénesis
min	Minutos
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PBSA	Tampón fosfato salino más albumina
PBST	Tampón fosfato salino más Tween 20
PI3-K	Fosfoinositol 3-quinasa
PKA	Proteína quinasa A
PKB	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PP	Proteína fosfatasa
seg	Segundos
SEM	Error estándar
SHC	Proteína homología a SRC y colágeno
SRC	Coactivadores de receptor esteroides
T	Tirosina
VDR	Receptor de la 1,25-dihidroxitamina D ₃
VDR*	Complejo activo 1,25-dihidroxitamina D ₃ -receptor
VDRE	Elemento de respuesta a 1,25-dihidroxitamina D ₃

INTRODUCCIÓN

1. 1,25-DIHIIDROXIVITAMINA D₃ Y SU RECEPTOR

La 1,25-dihidroxitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃) es la forma activa de la vitamina D₃. La vitamina D₃ se puede sintetizar en la piel, tanto en el hombre como en otros animales, a partir del precursor inactivo 7-deshidrocolesterol, mediante reacciones provocadas por la exposición al componente ultravioleta de la luz solar. La vitamina D₃ también se puede obtener a través de la dieta. Esta vitamina, obtenida de cualquiera de las dos formas antes mencionadas, se dirige al hígado a través del torrente circulatorio. Es en el hígado donde se produce la primera hidroxilación de las dos que han de originarse para transformar la vitamina D₃ en la 1,25-(OH)₂D₃ (Figura 1). La primera hidroxilación se produce en el carbono 25 de la vitamina D₃ y da lugar a la 25-hidroxitamina D₃ (Hausler MR. y col., 1998), que es el metabolito de mayor proporción en el torrente circulatorio, por ello, es el parámetro que determina el estado de la vitamina D₃ y de la 1,25-(OH)₂D₃ en el organismo. Posteriormente, en el riñón la 25-hidroxitamina D₃ sufre una 1 α -hidroxilación dando lugar a la 1,25-(OH)₂D₃ (DeLuca HF.,1988).

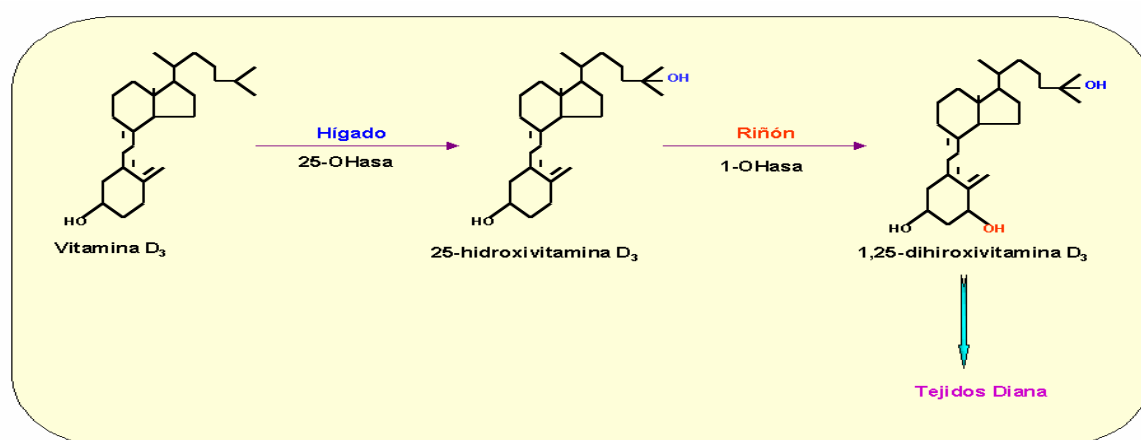


Figura 1: Síntesis de la 1,25-dihidroxitamina D₃.

Se ha demostrado que la piel no sólo puede producir vitamina D₃, sino que directamente puede producir 1,25-(OH)₂D₃ ya que dispone de la maquinaria enzimática necesaria (Bikle DD. y col., 1986). Esta maquinaria también se ha observado en células de las mamas, próstata y colon (Schwartz GG. y col., 1998; Cross HS. y col., 2001; Tangpricha V. y col., 2001). Parece ser que hay una gran variedad de tejidos que de manera local producen la hormona 1,25-(OH)₂D₃ cuya función es autocrina/paracrina y actúa en la regulación del crecimiento (Holick MF., 2002).

La 1,25-(OH)₂D₃ y sus metabolitos son moléculas lipofílicas y por tanto tienen una baja solubilidad en el plasma. Por ello, estos metabolitos son transportados a través del torrente sanguíneo asociados a proteínas transportadoras, la más importante de estas proteínas es la *vitamin D-binding protein* (Brown AJ. y col., 1999). Por medio de esta proteína la 1,25-(OH)₂D₃ llega a los tejidos o células diana y allí ejerce distintos efectos biológicos.

Los efectos biológicos de la 1,25-(OH)₂D₃ son altamente variados, los más relevantes son la regulación de los niveles plasmáticos de calcio y fósforo (Hausler CA. y col., 1986; Darwish HM. y col., 1996), la modulación de los niveles de citoquinas en linfocitos T (Tsoukas CD., y col., 1984; Hewison M., 1992), la inhibición de la proliferación y estimulación de la diferenciación en queratinocitos y células mieloides (Smith EL. y col., 1986; Pan P. y col., 1991), la modulación de la secreción de insulina en islotes pancreáticos (Lee S. y col., 1994) y la regulación de la expresión de distintos genes en varios tipos celulares (Christakos S. y col., 1996; Hausler MR. y col., 1998).

Para llevar a cabo estos efectos la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ necesita unirse a su receptor específico (VDR) en el interior de células diana.

1.1. El gen del receptor de la 1,25-dihidroxitamina D_3

El gen que codifica al VDR humano está localizado en el cromosoma 12 q13-14 (Faraco JH. y col., 1989; Labuda M. y col., 1992) y su secuencia ha sido obtenida por Miyamoto K. y col., 1997. Este gen carece de caja TATA, tiene zonas ricas en GC lo que le confiere la presencia de putativos sitios de unión para el SP1 (Dyran WS. y col., 1983) y una variedad de sitios de unión a distintos factores transcripcionales.

Este gen está formado por 11 exones y sus intrones asociados (Figura 2). En la zona 5' no codificante se encuentran los exones 1A, 1B, 1C, como consecuencia del proceso de transcripción alternativo de estos exones se puede formar tres tipos de especies de mRNA (Baker AR. y col., 1988). Los exones del 2 al 9 codifican la estructura de la proteína producto de este gen, que es el VDR. El exón 2 codifica un primer dedo de zinc de la proteína que está formado por 21 aminoácidos (aa) y el exón 3 codifica el segundo dedo de zinc formado por 16 aa.

Estos exones y sus intrones parecen estar bastante conservados en los genes de la familia de receptores nucleares. Lo único que diferencia al gen del VDR humano del resto de los receptores nucleares es la presencia de un exón 5 adicional que codifica los aa desde 155 hasta 194 (hélices H1 y H3) de esta proteína del VDR humano.

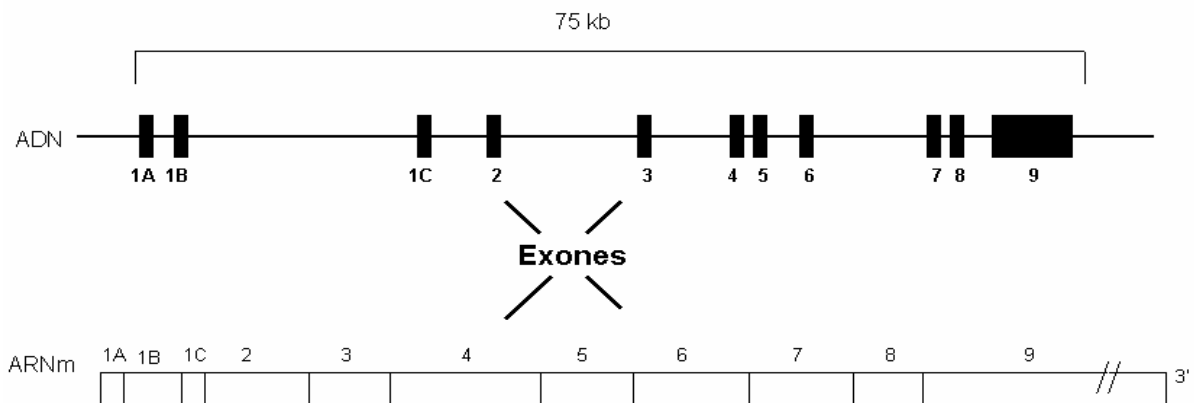


Figura 2: Organización estructural del gen del VDR.

1.2. El receptor de la 1,25-dihidroxitamina D₃. Dominios estructurales

El VDR es un reconocido miembro de la superfamilia de receptores nucleares que regulan la expresión de genes de forma dependiente del ligando (Evans RM., 1988; Haussler MR. y col., 1988). Desde el punto de vista de su clasificación, esta superfamilia se divide en cuatro clases, atendiendo a sus características de dimerización y propiedades de unión al ADN. El VDR, junto a los receptores de las hormonas: tiroidea (TR), ácido retinoico (RAR), ácido 9-cis retinoico (RXR) y troglitazona (PPARs), pertenecen a la Clase II (Mangelsdorf DJ. y col., 1995). Todos ellos actúan principalmente como heterodímeros con el RXR.

La proteína del VDR está formada por distintos dominios con respecto a su acción: el dominio de unión al ADN, el dominio de unión de la hormona, el dominio relacionado con la dimerización y el dominio relacionado con la transactivación (Figura 3).

El dominio de unión al ADN fue cristalizado por Shaffer PL. y col., 2002. Este dominio se encuentra cercano al N-terminal de la proteína, tiene una gran importancia debido a que requiere una secuencia específica de ADN para su unión y

así poder dar lugar a la respuesta genómica de la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. Este dominio consta de dos dedos de zinc, localizados entre los aa 24 y 91 de la proteína (Figura 3) que son los responsables de la unión del VDR al ADN. La zona inmediatamente cercana a ésta (91 – 115 aa) contiene varias regiones helicoidales y también podría estar relacionada con contactos con el ADN. Entre los dos dedos de zinc existe una secuencia de 5 aa básicos (49 – 55 aa) que podría tener contactos directos con el ADN. Estos mismos aa han sido requeridos para la localización nuclear de este VDR. En esta función también se ha implicado a la secuencia entre los aa 79 - 105. Así este dominio podría ser la unidad funcional requerida para la óptima retención del VDR en el núcleo como resultado de la interacción entre el VDR y el ADN.

El dominio de unión a la hormona fue cristalizado por Rochel N. y col., 2000. Las características de este dominio se parecen mucho a las de otros miembros de la clase II. Parecen existir tres zonas principales, que van de los aa 227 – 240, 268 – 316 y 396 – 422, dentro de la zona de tipo sándwich que incluye a la α -hélices 12 y algunas cadenas β , formando una estructura tridimensional característica. Concretamente las hélices 3, 5, 11 y 12 y algunas cadenas β son las responsables de la unión al ligando (Vaisanen S. y col., 2002).

El dominio relacionado con la dimerización comparte zonas con el dominio de unión al ADN y zonas con el dominio de unión a la hormona (Figura 3). Concretamente los aa 91 - 92, 244 - 263 y 317 - 395. Esto sugiere que la unión al ligando y la heterodimerización funcionan interrelacionadas, posiblemente en un contexto de estructura terciaria y quizás a través de efectos alostéricos.

El dominio relacionado con la transactivación, consta de dos regiones principales, una constituida por los aa 244 - 263 (Figura 3), que como hemos

dicho anteriormente también participa en la heterodimerización; en esta región se encuentra un aa altamente conservado entre los miembros de la superfamilia de receptores nucleares, la lisina 246. La otra región formada por los aa 410 - 427 incluye a la leucina 417 y la glutamina 420. Los tres aa mencionados participan en el mecanismo de transcripción del VDR, involucrando asimismo a otras proteínas o coactivadores. En esta capacidad transcripcional ocupa un importante lugar la fosforilación de ciertos aa del VDR por quinasas. Esto último implicaría un *cross-talk* entre el VDR y otros mecanismos de señalización. Así, la PKA fosforila a la serina 208 localizada en el centro de la molécula (Jurutka PW. y col., 1993a; Nakajima S. y col., 1996) y la PKC a la serina 51, localizada entre los dos dedos de zinc del dominio de unión al ADN.

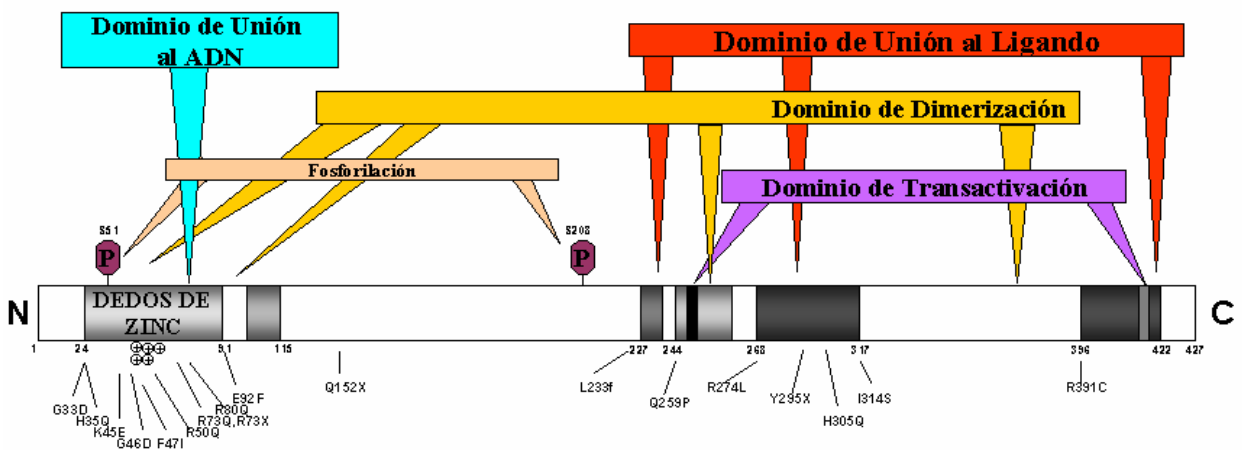


Figura 3: Dominios estructurales del receptor de la 1,25-dihidroxitamina D₃.

1.3. El receptor de la 1,25-dihidroxitamina D₃ como mediador de las acciones biológicas de la 1,25-dihidroxitamina D₃

La hipótesis del mecanismo de la actividad genómica de la 1,25-(OH)₂D₃ (Figura 4), es la siguiente: La 1,25-(OH)₂D₃ atraviesa la célula hasta el núcleo y allí se une a su receptor nuclear, VDR (Pike JW., 1985). Esta unión produce un drástico cambio conformacional en el VDR, posiblemente producido por la fosforilación de residuos de serina (Jurutka PW. y col., 1993b; Hilliard GM 4th, y col., 1994; Nakajima S. y col., 1994; Jurutka PW. y col., 1996; Bettoun DJ. y col., 2002). Una vez que se ha formado el complejo 1,25-(OH)₂D₃-VDR activo (VDR*) se une fuertemente al RXR formando así el heterodímero que probablemente llevará a cabo la función biológica de la 1,25-(OH)₂D₃. El RXR no se encuentra unido a su ligando, ya que cuando esto ocurre se desplaza el heterodímero y se forma un homodímero RXR-RXR (Thompson PD. y col., 1998). Estudios *in vitro* han demostrado que antes de unirse a secuencias específicas de ADN, las proteínas VDR y RXR son principalmente monómeros, junto con pequeñas cantidades de homodímeros (Craig TA. y col., 2001). El heterodímero (VDR*-RXR) se une a secuencias específicas de ADN, que se denominan elementos de respuesta a 1,25-(OH)₂D₃ (VDREs), situadas en el promotor de genes respondedores a esta hormona (Macdonald PN. y col., 1992; Whitfield GK. y col., 1995; Thompson PD. y col., 1998; Hsieh JC. y col., 1999). En un paso posterior pueden unirse proteínas coactivadoras de receptores esteroides, SRC (Zhang C. y col., 2001; MacDonald PN. y col., 2001), y factores transcripcionales IIB (Jurutka PW. y col., 2000), entre otros, aumentando de esta forma la actividad transcripcional del VDR dependiente de la 1,25-(OH)₂D₃

Un VDRE típico consiste en repeticiones directas compuesta por 6 pb, separadas por un espaciador de 3 nucleótidos (DR3). La secuencia consenso más aceptada es 5'PuGGTCANNPuPuGTTCA3' dada por Colnot S. y col., 1995 y Haussler MR. y col., 1998. La especificidad del VDRE es principalmente debida al espaciador pues si en lugar de estar formado por 3 nucleótidos lo estuviese por 4 o 5 nucleótidos sería un elemento respondedor a la hormona tiroidea y al ácido retinoico, respectivamente (Naar AM. y col., 1991; Umesono K. y col., 1991). El VDR* se une a la mitad del elemento 3' y el RXR a la mitad del elemento 5' del VDRE (Perlmann T. y col., 1993; Colnot S. y col., 1995; Haussler MR. y col., 1998). Se han hallado VDREs cuyo espaciador está formado por 6 nucleótidos (DR6) y que forman homodímeros VDR-VDR (Polly P. y col., 1996). Una vez se ha unido el heterodímero VDR*-RXR al VDRE en el promotor del gen regulado por la 1,25-(OH)₂D₃, se une la maquinaria transcripcional que dará lugar a la iniciación o represión de la trascrición del gen en cuestión. No obstante, son pocos los genes regulados por la 1,25-(OH)₂D₃ en cuyos promotores se han hallado VDREs (Haussler MR. y col., 1998; Aranda A. y col., 2001).

Hasta hace relativamente poco tiempo se creía que en el hombre existía un único VDR de localización nuclear, tanto cuando estaba unido a su ligando como cuando estaba desocupado (Berger U. y col., 1988; Clemens TL. y col., 1988; Milde P. y col., 1989; Zanello SB. y col., 1997). Recientemente se ha detectado un VDR que tiene una variante en su N-terminal por lo que el peso molecular es un poco mayor que el del VDR clásico, este receptor se ha localizado en células de riñón humano, osteoblastos, diferentes líneas celulares intestinales (Int-407, DLD-1, y COLO 206F) y epitelio de riñón (786). Este receptor se diferencia del clásico

en que tiene reducida la actividad transcripcional, además su localización es intracelular cuando no tiene unido el ligando y nuclear cuando esta ocupado (Sunn KL. y col., 2001). Parece ser que este receptor es el responsable de las respuestas biológicas rápidas de la $1,25-(OH)_2D_3$ que dependen de una vía de activación de tirosinas quinasas (Norman AW. y col., 2001) (Figura 4). En células musculares la $1,25-(OH)_2D_3$ rápidamente estimula la fosforilación de tirosina de la PLC- γ y de proteínas relacionadas con el crecimiento como son MAPK y c-myc (Boland R. y col., 2002). La activación de la MAPK por esta hormona parece estar mediada sólo en parte por el VDR y requiere además un incremento de PKC y de calcio intracelular. Después de ser fosforilada la MAPK se transloca al núcleo y regula la transcripción del c-myc (Boland R. y col., 2002). También se ha probado que el VDR interactúa con proteínas fosfatasas Ser/Thr (PP1c y PP2Ac) e induce la actividad enzimática de éstas de forma dependiente de ligando. La $1,25-(OH)_2D_3$ induce la asociación del VDR con la actividad fosfatasa de las enzimas PP1c y PP2Ac, esto hace que se desfosforile la enzima p70 S6 quinasa, la cual es esencial para la transición de las células de la fase G1 a la fase S y al estar bloqueada la enzima p70 S6, las células se retienen en la fase G1 con la consiguiente retención del crecimiento (Bettoun DJ. y col., 2002).

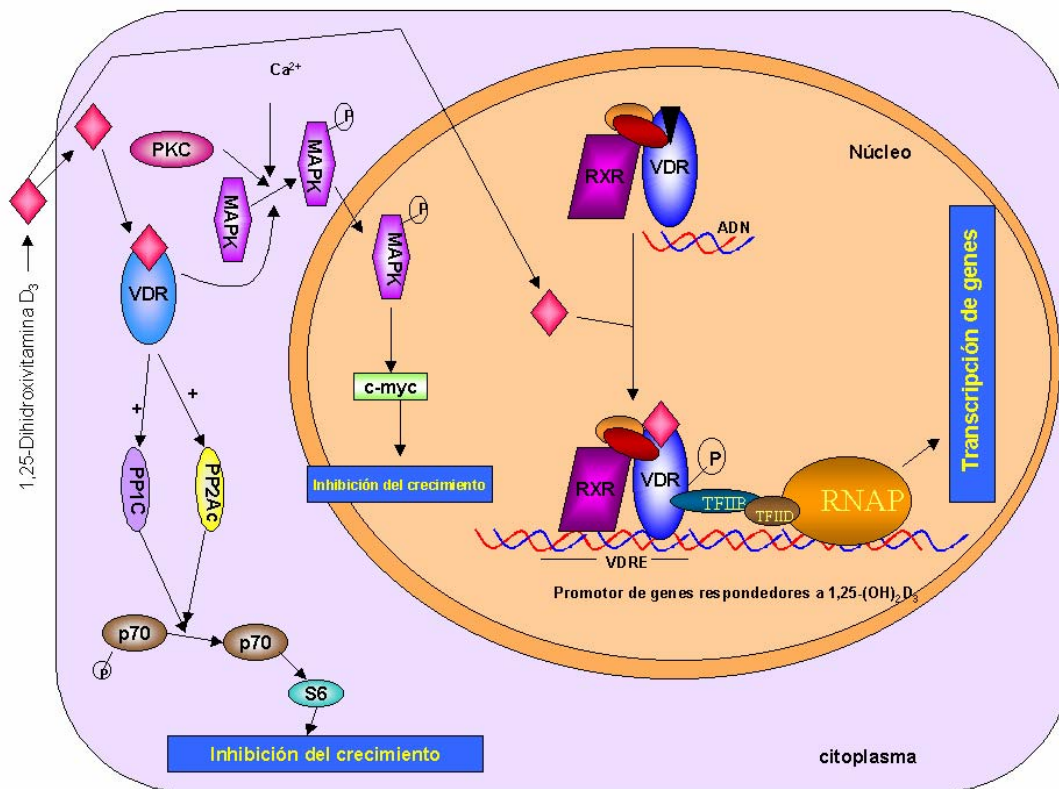


Figura 4: Mecanismo de acción de la 1,25-dihidroxitamina D_3

1.4. Distribución tisular del receptor de la 1,25-dihidroxitamina D_3 . **Autorregulación por los niveles de la 1,25-dihidroxitamina D_3**

El VDR fue inicialmente descubierto en la mucosa intestinal (Brumbaugh PF. y col.,1975; Kream BE. y col., 1977a), después fue hallado en otros órganos como son los riñones (Colston KW. y col.,1979), en huesos (Kream BE. y col.,1977b), en la glándula paratiroides (Hughes MR. y col., 1978), en otros órganos endocrinos como es el páncreas (Pike JW., 1982a), en la piel (Simpson RU. y col.,1980), en tejidos reproductores y neuronales (Stumpf WE. y col., 1982; Stumpf WE. y col., 1989), en el sistema hematopoyético (Kizaki M. y col., 1991),

en el cerebro (Somjen D. y col., 1986), en los pulmones (Sandgren ME. y col., 1991) y más recientemente en el músculo esquelético (Bischoff HA. y col., 2001).

También se ha demostrado la existencia de este receptor en diversas líneas celulares, entre otras las líneas celulares leucémicas como son la HL-60 (Inaba M. y col., 1989) y la U-937 (Mezzetti G. y col., 1984).

La respuesta de un tejido a la estimulación por la 1,25-(OH)₂D₃ depende tanto del número de VDRs presentes como de los niveles circulantes de la 1,25-(OH)₂D₃ (Goff JP. y col., 1990). Algunos autores han observado que la 1,25-(OH)₂D₃ regula positivamente la expresión de su propio receptor, tanto *in vitro* como *in vivo* (Costa EM. y col., 1985; Costa EM. y col., 1986). Aportando más datos en este sentido, otros autores han visto que en ratas deficientes en 1,25-(OH)₂D₃ hay una reducción del ARNm del VDR y además que este efecto no se revierte cuando a dichas ratas se les administra 1,25-(OH)₂D₃ o calcio (Zineb R. y col., 1998).

Pero no solo se ha demostrado que la 1,25-(OH)₂D₃ induce los niveles de ARNm del VDR *in vitro* sino también los de la proteína. Así, se ha observado que la 1,25-(OH)₂D₃ incrementa la proteína del VDR en células de riñón de cerdo (LLC-PK-1) (Costa EM. y col., 1985), en fibroblastos de ratón (3T6) (Mangelsdorf DJ. y col., 1987; McDonnell DP. y col., 1987), en células de osteosarcoma de ratas (Pan LC. y col., 1987) y en células promielocíticas humanas procedentes de leucemias (Lee Y. y col., 1989). En cuanto al mecanismo, algunos autores sugieren que el incremento en la proteína es debido a la estabilización de ésta por su ligando (Costa EM. y col., 1987), mientras que otros autores no han visto estabilización de la proteína por la 1,25-(OH)₂D₃ (Pan LC. y col., 1987).

2. LA INSULINA Y SU RECEPTOR

2.1. Regulación de los niveles plasmáticos de insulina por la 1,25-dihidroxitamina D₃. Antecedentes

Se ha demostrado que la 1,25-(OH)₂D₃ incrementa la secreción de insulina pancreática (Norman AW. y col., 1980; Clark SA. y col., 1981; Chertow BS. y col., 1983) y de hecho el páncreas fue el primer tejido no clásico de acción de la 1,25-(OH)₂D₃ que poseía VDRs (Christakos S. y col., 1979).

La insulina es una proteína de 51 aa y 5,7 kDa de peso molecular. Esta hormona está sintetizada por las células β pancreáticas y es considerada como la principal hormona anabólica en el hombre. La insulina entre otras funciones regula el metabolismo celular y estimula el crecimiento.

En animales deficientes en 1,25-(OH)₂D₃ se ha observado una disminución de la secreción de insulina junto a hipocalcemia, retraso del crecimiento y pérdida del apetito (Clark SA. y col., 1981; Tanaka Y. y col., 1986; Beaulieu C. y col., 1993). Esta disminución de la secreción de la insulina por el páncreas puede ser revertida por el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ (Billaudel S. y col., 1991). Otros autores también han observado que el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ mejora la tolerancia a la glucosa en estos animales (Gedik O. y col., 1986; Boucher BJ. y col., 1995 ; Rudnicki PM. y col., 1997). Así la 1,25-(OH)₂D₃ podría actuar sola o junto con el calcio en el control de la secreción de insulina por las células β pancreáticas.

Algunos autores han observado que ratas a las cuales se les ha inducido diabetes experimental con estreptozotocina tienen disminuidos los niveles de

1,25-(OH)₂D₃ (Schneider LE. y col., 1977; Hough S. y col., 1982; Wilson HD. y col., 1982; Nyomba BL. y col., 1985). Se ha observado que niños y adolescentes que padecen diabetes tipo 1 presentan los niveles de la 1,25-(OH)₂D₃ disminuidos (Frazer TE. y col., 1981; Rodland O. y col., 1985; Calisti L. y col., 1988). Mientras que en adultos que padecen diabetes tipo 2 tratados con insulina se mantiene la concentración de 1,25-(OH)₂D₃ dentro del rango de la normalidad (Storm TL. y col., 1983; Nyomba BL. y col., 1986; Auwerx J. y col., 1988; Gallacher SJ. y col., 1993).

Con estos antecedentes, uno de los objetivos de esta Tesis será investigar el efecto del tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ a ratas sin o con diabetes experimental inducida por estreptozotocina sobre distintos parámetros medidos en sangre y orina de estos animales.

2.2. El receptor de insulina. Características estructurales

Para que la insulina lleve a cabo sus acciones biológicas debe de unirse a su receptor localizado en la membrana plasmática de las células dianas.

El receptor de insulina (IR) es una glicoproteína tetramérica compuesta por dos subunidades α (135 kDa) y dos subunidades β (95 kDa) unidas entre sí por puentes disulfuro (Figura 5) (Kahn CR., 1994 y Kahn CR., 1995). Las subunidades α son completamente extracelulares, están compuestas por 719 o 731 aa, el distinto tamaño de estas subunidades depende del proceso postranscripcional alternativo en el exón 11 del gen del IR (Seino S. y col., 1989a). En las subunidades α están localizadas las zonas ricas en residuos de cisteína implicadas en la unión con la insulina. Las subunidades β están compuestas por 620 aa y presentan tres partes:

a) una extracelular donde se encuentran los puentes disulfuro responsables de la unión con las subunidades α , b) una zona transmembranal implicada en el enganche del receptor a la membrana, y c) una intracelular, la cual contiene residuos de serina, treonina y tirosina susceptibles de ser fosforilados y que lleva a cabo la actividad tirosina-quinasa característica de este receptor, relacionada con la transmisión de la señal biológica de la insulina.

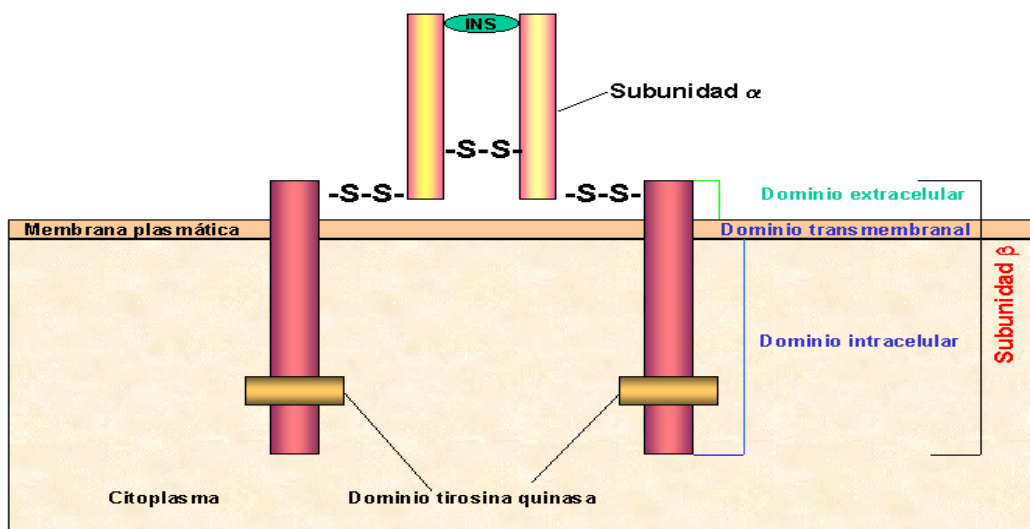


Figura 5: Esquema del receptor de insulina.

2.3. El receptor de insulina como mediador de las acciones biológicas de la insulina

La unión de la insulina a las subunidades α del receptor provoca la autofosforilación de residuos específicos de tirosina, localizados en la parte intracelular de las subunidades β , a través de un mecanismo de transfosforilación que produce la activación del dominio tirosina-quinasa de las subunidades β . Esto provoca que la actividad quinasa del IR fosforile una serie de proteínas (Figura 6) tales como el IRS-1, -2, -3 y -4 (véase el índice de abreviaturas) que hacen de

puentes para la fosforilación de otras proteínas con dominios SH2 o con dominios PH. Además de las proteínas IRS, hay otras proteínas fosforiladas directamente por el IR, éstas son SHC y GAB-1 (Kahn CR., 1994; Lienhard GE., 1994; Kahn CR., 1995; Myers MG Jr. y col., 1996; Proud CG. y col., 1997). Las proteínas SHC reclutan a continuación otras proteínas con dominios SH2 iniciándose así la cascada de fosforilaciones de las MAPK que finalmente modulan la síntesis de ADN. Las IRS fosforilan la PI3-K (Lamothe B. y col., 1998), iniciándose diferentes cascadas de fosforilaciones, entre las cuales destaca la de PI3-K/PKB (Holman GD. y col., 1997; Kellerer M. y col., 1999; Zhou L. y col., 1999) (Figura 6).

A través de estos mecanismos tiene lugar: a) la modificación de la localización subcelular de proteínas, b) la activación o inhibición de ciertas actividades enzimáticas, y c) la estimulación o represión de la transcripción de ciertos genes. Lo que da lugar a una serie de efectos biológicos de la insulina a nivel celular que están recogidos en la tabla 1 (Lamothe B. y col., 1998).

Tabla 1. Efectos biológicos de la insulina

Efecto Biológico	Tipo celular
Translocación del GLUT4 y estimulación de la captación y metabolismo de la glucosa	Músculo/Tejido adiposo
Estimulación de la transformación de glucosa en glucógeno	Músculo/Hígado
Inhibición de la salida de glucosa	Hígado
Estimulación de la lipogénesis	Tejido adiposo/Músculo
Inhibición de la lipólisis	Tejido adiposo
Activación de la bomba Na ⁺ /K ⁺	Tejido adiposo/Músculo
Estimulación de la captación de aminoácidos	Todos los tipos celulares
Estimulación de la síntesis de proteínas	Todos los tipos celulares
Estimulación de la síntesis de ADN y crecimiento celular	Todos los tipos celulares
Inhibición de la apoptosis	Todos los tipos celulares

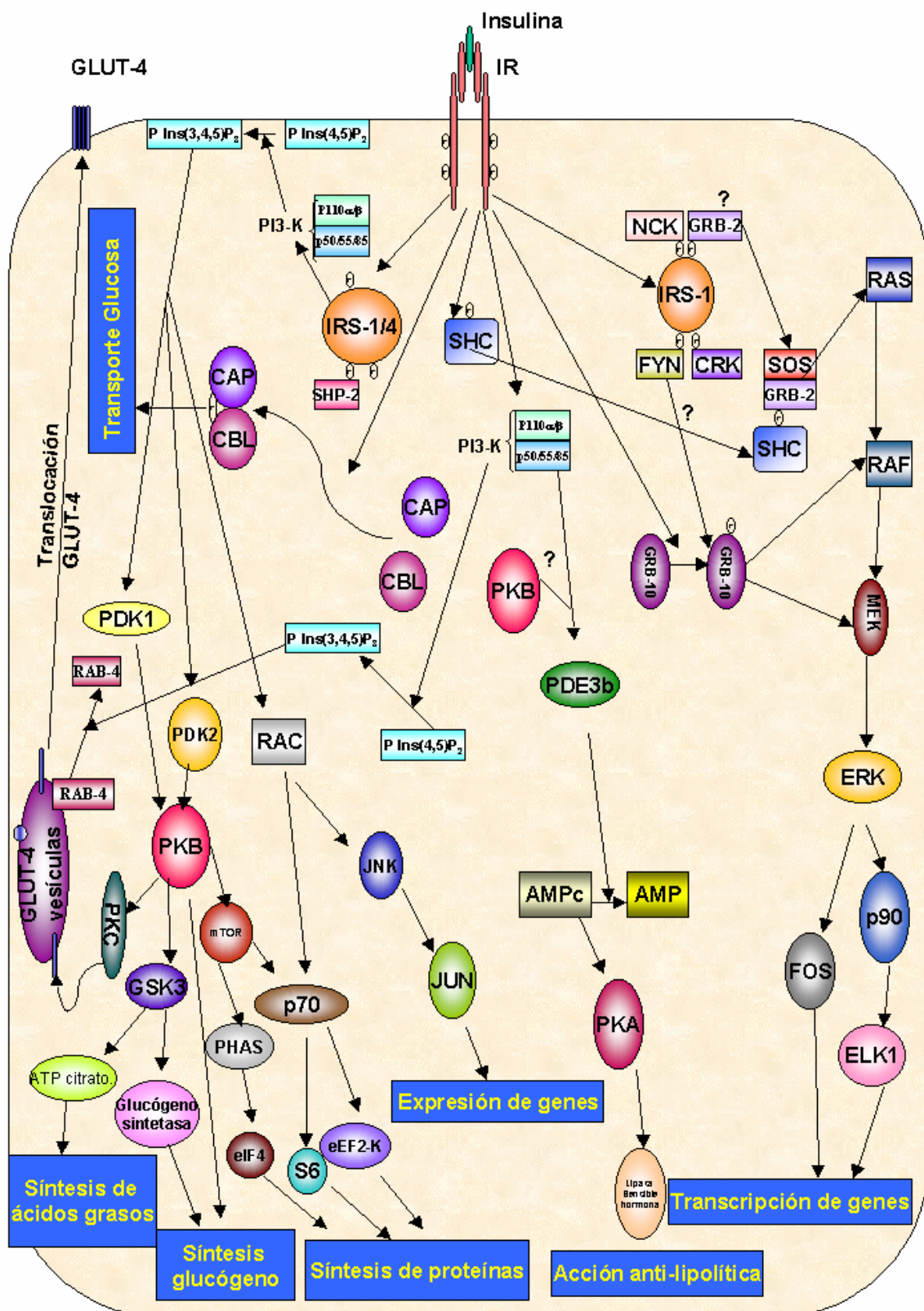


Figura 6: Esquema general de las vías de señalización de la insulina.

2.4. Regulación del receptor de insulina y de la actividad insulínica por la 1,25-dihidroxitamina D₃. Antecedentes

Inicialmente, el estudio del efecto de la 1,25-(OH)₂D₃ sobre el IR se relacionó con el papel que esta hormona tiene como inductora de la diferenciación en ciertas líneas celulares mieloides. Rouis M, y col., 1985 observaron un incremento en la unión de la insulina a su receptor en la línea celular promonocítica humana U-937, sin indicar si este incremento se debía a un incremento en el número o la afinidad del IR. Del mismo modo Chaplinski T.J. y col., 1986 observaron un incremento en la unión de la insulina a su receptor en células promonocíticas humanas HL-60 tratadas con la 1,25-(OH)₂D₃. En 1995, nuestro laboratorio demostró que la 1,25-(OH)₂D₃ incrementó el número de IRs sin alterar la afinidad de estos receptores por su ligando en células U-937 (Leal MA. y col., 1995) e indicó que este incremento no parecía ser un absoluto requerimiento de diferenciación dado que otros agentes que también actuaban como diferenciadores, el ácido retinoico (Abita J.P. y col., 1984; Rouis M, y col., 1985) y el amsacrino (Calle C. y col., 1994), producían el efecto contrario, es decir, una disminución en el número de IRs.

Como se ha indicado anteriormente, el IR es la llave control de la actividad biológica de la insulina y dado que no existían datos que indicaran regulación por parte de la 1,25-(OH)₂D₃ de las actividades insulínicas, otro de los objetivos de esta Tesis será estudiar como se ven afectados por el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ tanto el IR como distintas actividades biológicas de la insulina mediadas por este receptor.

2.5. El gen del receptor de insulina. Características estructurales

El gen del IR humano está situado en el cromosoma 19 p13.3-13.2 (Yang-Feng TL. y col., 1985) y consta de más de 150 kb, distribuidas en 22 exones y 21 intrones (Figura 7) (Seino S. y col., 1989b, Seino S. y col., 1990a y Seino S. y col., 1990b). Los 11 primeros exones, que abarcan más de 90 kb, codifican para la subunidad α , mientras que los exones 12 al 22, que ocupan unos 30 kb, codifican para la subunidad β . El tamaño de los exones oscila entre los 36 pb del exón 11 y los más de 2,5 kb del exón 22. El tamaño de los intrones varía entre 0,5 y 25 kb. La organización en exones del gen parece reflejar la organización estructural de la proteína, pues muchos de los exones codifican para módulos estructurales y funcionales, como se indica en la tabla 2. Esta organización estructural-funcional sugiere que el gen del IR es un mosaico constituido evolutivamente con exones reclutados de distintas fuentes (Seino S. y col., 1989b).

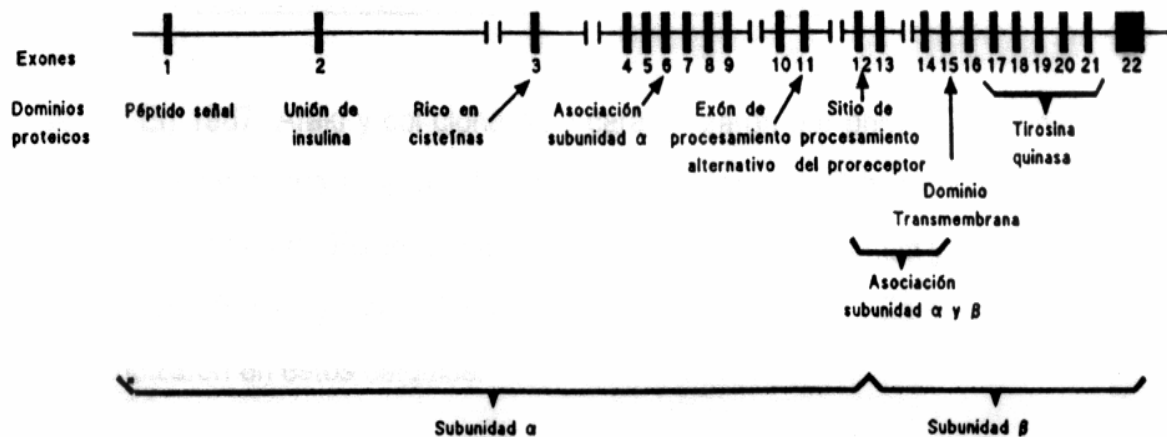


Figura 7: Mapa del gen del receptor de insulina humano. Se indican las localizaciones relativas a los exones (■) e intrones. Las zonas cortadas (+) indican regiones aún no conocidas de los intrones 2, 9, 11 y 13.

Tabla 2: Organización estructural y funcional de los exones del gen del receptor de la insulina

<u>Exón</u>	<u>Zona codificada</u>
Exón 1	Péptido señal
Exón 2	Zona de unión con la insulina
Exón 3	Dominio rico en residuos de cisteína
Exón 6	Residuos localizados en la interfase entre las regiones α adyacentes en la forma heterotetramérica del receptor, que contribuyen a las interacciones de unión cooperativa
Exón 11	Zona final de la subunidad α . Exón sometido a procesamiento alternativo, generador de isoformas.
Exón 12	Sitio de procesamiento del proreceptor.
Exón 15	Región transmembranal del receptor, perteneciente a la subunidad β
Exones 17-21	Región con actividad tirosina-quinasa

2.6. El promotor del gen del receptor de insulina. Presencia de elementos de respuesta a distintos factores transcripcionales

En 1987, Araki E. y col. clonaron y caracterizaron por primera vez una región de 573 pb anterior al extremo 5' del gen del IR humano, que presentaba actividad promotora. Posteriormente varios grupos más (Mamula PW. y col., 1988; Tewari DS. y col., 1989; Seino S. y col., 1989b; McKeon C. y col., 1990; Cameron KE. y col., 1992) profundizaron en estos estudios.

Actualmente el promotor activo del gen del IR humano se considera que tiene una extensión de aproximadamente 1,5 kb (Lee JK. y col., 1994). Pertenece al grupo de genes que se denominan *housekeeping* por no presentar ni cajas TATA ni CAAT. La máxima actividad de este promotor esta localizada dentro de la región desde -877 hasta -578 pb, aunque la zona mínima necesaria para que tenga lugar la transcripción de este gen es diferente según los distintos autores

que lo han estudiado (Araki E. y col., 1987; Mamula PW. y col., 1988; Tewari DS. y col., 1989; Seino S. y col., 1989b; McKeon C. y col., 1990; Lee JK. y col., 1992; Levy JR. y col., 1993). Contiene zonas ricas en GC situadas dentro de la zona proximal del promotor (Araki E. y col., 1987; Mamula PW. y col., 1988; Tewari DS. y col., 1989; McKeon C. y col., 1990; Levy JR. y col., 1995), estas zonas representan múltiples sitios de iniciación transcripcional, a las cuales se une el factor transcripcional SP1 (entre -618 pb y -578 pb). La zona alrededor de -600 pb, contiene cajas GA y cajas GC en situación de solapamiento, que parecen muy importantes para la expresión de este gen, ya que mutaciones dentro de ellas, reducen notablemente la posibilidad de transcripción (Cameron KE. y col., 1992; Lee JK. y col., 1992; Kim HS. y col., 1995). Además, hay tres secuencias TCCC que son posibles regiones reguladoras (Mamula PW. y col., 1988).

No se conoce con exactitud el sitio de iniciación transcripcional en el gen del IR pero según diversos autores (Mamula PW. y col., 1988; Tewari DS. y col., 1989; Seino S. y col., 1989b; Araki E. y col., 1991) podría haber múltiples sitios, cuyas situaciones exactas no parecen claras, ni siquiera dos de los grupos de investigación, que han clonado esta región promotora, están de acuerdo en las posiciones concretas.

El hecho de que los datos de actividad de este promotor varíen según la línea celular utilizada en los estudios, sugiere que la regulación constitutiva de la actividad transcripcional debe ser muy diferente según el tipo celular, por tanto, el grado final de expresión del IR humano en los distintos tipos celulares podría ser el debido a la presencia de distintos factores estimuladores e inhibitorios que actúen en cada uno de ellos.

Se han descrito hasta el momento una serie de sitios de unión de factores de transcripción que controlan la expresión del gen del IR, los cuales se comentarán a continuación y están recogidos en la figura 8.

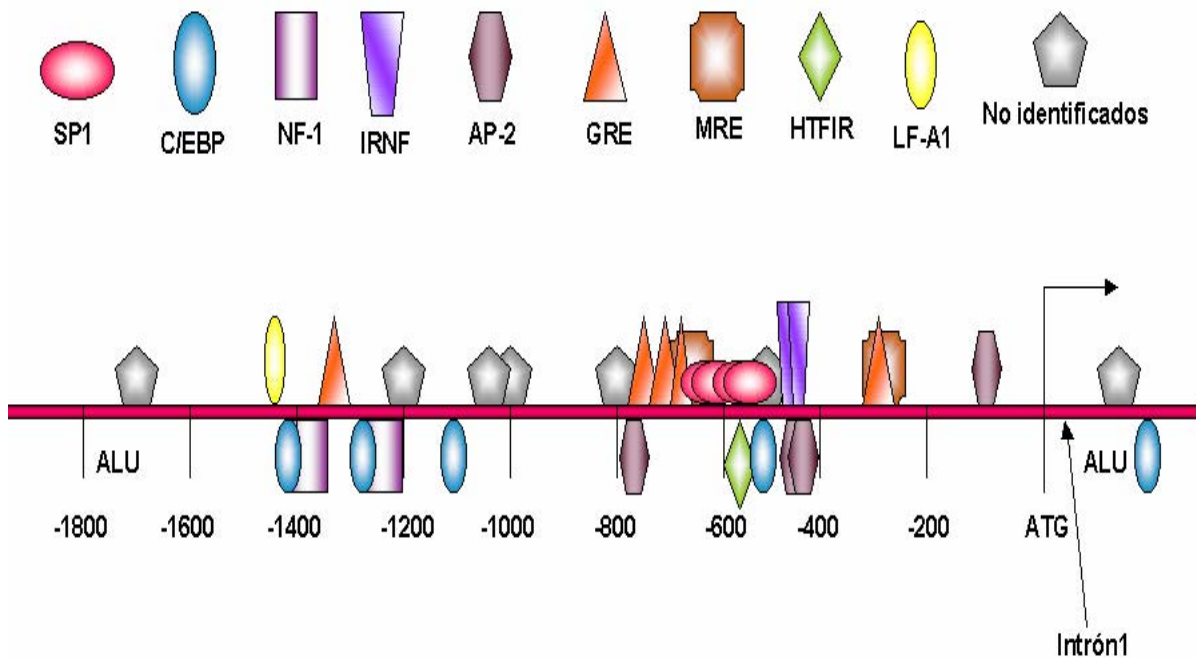


Figura 8: Elementos reguladores en la zona del promotor del gen del receptor de insulina. La numeración tiene como referencia el sitio +1 del ATG.

Factor SP1

Como ya se ha comentado el promotor del gen del IR contiene sitios de unión para el factor SP1 (McKeon C. y col., 1990; Araki E. y col., 1991; Levy JR. y col., 1991; Cameron KE. y col., 1992; Lee JK. y col., 1992; Levy JR. y col., 1993; Chen H. y col., 1994). En la zona de máxima actividad promotora (-618 pb y -578 pb) hay cuatro sitios, localizados en dos regiones. La eliminación de cualquiera de estos agrupamientos disminuye la actividad transcripcional. Otras cajas de GC situadas desde -473 hasta -401 pb parecen no ser funcionales, ya que no se une

el factor SP1 (Lee JK. y col., 1992), estas cajas hoy se consideran sitios de unión del factor AP-2.

Los sitios SP1 no parecen ser los mayores determinantes de la expresión tejido-específica del gen del IR, ya que los niveles de SP1 en hígado, tejido adiposo y músculo de ratas adultas son muy bajos (Saffer JD. y col., 1991). Además, otros factores distintos uniéndose a estos sitios ricos en GC de forma cooperativa o no, pueden dar lugar a la iniciación transcripcional aún en la presencia de bajos niveles de SP1 (Levy JR. y col., 1993).

Familia de factores C/EBP

McKeon C. y col., 1991 han identificado tres posibles sitios de unión del factor *CAAT/enhancer binding protein* (C/EBP), dos en el promotor, localizados uno a -1434 pb y el otro a -1305 pb y el tercero localizado en el primer intrón. Webster NJ. y col., 1994.

Se ha demostrado que ciertos factores de la familia C/EBP pueden transactivar el promotor del gen del IR en células adiposas de roedor NIH-3T3 y en células hepáticas humanas HepG2 (Webster NJ. y col., 1994). Estos datos sugieren que ciertos miembros de esta familia de factores C/EBP podrían controlar la especificidad tisular del gen del IR en estos tejidos.

Familia de factores NF-1

Se han descrito hasta el momento seis proteínas pertenecientes a la familia del factor nuclear 1 (NF-1), esta familia y su proporción relativa varía según el estado de crecimiento celular (Gil G. y col., 1988). Los sitios de unión a NF-1 no

son activos por sí solos, pero pueden estimular la transcripción cuando se asocian a un segundo sitio de unión (Gloss B. y col., 1989). En el promotor del gen del IR se han descrito sitios de unión para NF-1, concretamente en la proximidad de los sitios C/EBP (sitios -1434 y -1305 pb) (Webster NJ. y col., 1994). Dada la proximidad de ambos sitios, la especificidad tisular la daría el sitio C/EBP y esta actividad sería potenciada por los sitios NF-1 (Webster NJ. y col., 1994).

Factores IRNF

A partir de extractos nucleares de células hepáticas humanas se han identificado dos factores denominados factores nucleares del IR (IRNF): IRNF-1 e IRNF-2; que reconocen secuencias concretas en la posición -540 pb para IRNF-1 y en la posición -510 pb para IRNF-2 dentro del promotor del gen del IR (Lee JK. y col., 1992). Estas secuencias quedan entre los agrupamientos de los sitios SP1 y su significado funcional se desconoce.

IRNF-1 e IRNF-2 presentan una distribución de expresión diferente según los distintos tipos celulares, lo que sugiere que según el tipo celular estos factores de transcripción pueden tener diferentes funciones. Solo el IRNF-1 es capaz de potenciar la transcripción en células de hepatoma humano HepG2 (Lee JK. y col., 1992).

Elementos de Respuesta a Glucocorticoides

Se han descritos tres grupos de elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs) en este promotor. Un elemento distal (dGRE) en la posición -1333 pb, tres elementos centrales (cGREs) en las posiciones -754, -707 y -680 pb y un

elemento proximal (pGRE) situado en la posición -340 pb (Lee JK. y col., 1994). Parece que el pGRE juega un mayor papel en la inducción de la transcripción por glucocorticoides en condiciones fisiológicas, mientras que los cGREs que presentan menor afinidad por el receptor de glucocorticoides, requieren mayores concentraciones para funcionar como potenciadores de la transcripción.

Elementos de Respuesta a Mineralocorticoides

Nuestro laboratorio ha proporcionado una evidencia directa de la interacción del receptor de mineralocorticoides con algunos de los GREs localizados en este promotor. Uniéndose de forma homodimérica con el cGRE1 (localizado en la posición -754 pb) y el cGRE3 (en la posición -680 pb) y de forma heterodimérica con el receptor de glucocorticoides al pGRE (en la posición -363 pb) (Calle C. y col., 2002).

Secuencia rica en AT

Esta secuencia ha sido determinada estudiando la regulación del promotor del IR en el proceso de diferenciación de dos líneas celulares: la BC3H1 de células musculares de ratón y la 3T3-L1 de preadipocitos de ratón (Brunetti A. y col., 1993). Durante el proceso de diferenciación se induciría un factor que se uniría a una secuencia rica en AT (secuencia ALU) a una distancia aproximadamente de 1,7 kb del inicio de la transcripción.

Elementos de Respuesta a AMPc

Existe una serie de estudios sobre la presencia en el promotor del gen del IR de elementos respondedores a AMPc, sean del tipo AP-2 o del tipo CREB. Así, ha sido descrita una secuencia AP-2 *like* dentro del promotor en la posición -57 pb, por homología con la secuencia consenso mediante una búsqueda informatizada (Briata P. y col., 1990). Estos mismos autores no encontraron ninguna secuencia del tipo CREB dentro del promotor del gen del IR. Por otro lado, Cameron KE. y col., 1992 han descrito que utilizando un oligonucleótido consenso AP-2 en ensayos de retardo en gel con extractos nucleares de la línea celular hepática HepG2 se observó un complejo proteína-ADN que fue incapaz de ser desplazado con diferentes regiones del promotor del gen del IR. Nosotros hemos localizado posibles AP-2 *like* en las posiciones -436 pb, -444 pb y -745 pb, a través de una búsqueda informática empleando para ello la base de datos TRANSFAC (Wingender E. y col., 2001) y un programa de búsqueda, TFSEARCH, asociado a aquel (estos datos serán presentados como resultado de esta Tesis Doctoral).

Elemento de Respuesta al Factor Transcripcional Específico de Hepatocitos

Yoshizato K. y col., 2001 han localizado, en células HepG2 y en hepatocitos de ratas, un elemento de respuesta al factor transcripcional del IR específico de hepatocitos (HTFIR) en el promotor del IR entre -588 y -581 pb. Esta proteína nuclear debe jugar un papel importante en la expresión tejido-específica del gen del IR en el hígado.

Elemento de Respuesta al Factor Transcripcional Específico del Hígado

En la posición -1420 se ha identificado una secuencia TGGCCC, la cual se ha demostrado que une al factor transcripcional específico del hígado LF-A1 (Cameron KE, y col., 1992).

Otros factores no identificados

Han sido identificadas otras secuencias a las que se deben unir otros factores transcripcional que de momento no han sido identificados (Dyran WS. y col., 1983; Levy JR, y col., 1993; McKeon C, y col., 1997). Cameron KE, y col., 1992 describieron un posible elemento regulador negativo entre -1311 y -877 pb y un posible elemento regulador negativo en la región desde -1823 hasta -1311 pb.

2.7. Regulación de la expresión del gen del receptor de insulina por la 1,25-dihidroxitamina D₃. Antecedentes

Nuestro laboratorio ha demostrado previamente que la 1,25-(OH)₂D₃ es capaz de incrementar la expresión del gen que codifica para el IR (Leal MA. y col., 1995), sin alterar la estabilidad del ARNm del IR y sin depender de una biosíntesis de proteínas. Todo ello sugeriría que el efecto podría ser directo y posiblemente a nivel transcripcional.

Con estos antecedentes en esta Tesis se estudiará si el mecanismo por el cual la 1,25-(OH)₂D₃ incrementa el ARNm del IR es transcripcional y se intentará detectar posibles elementos de respuesta a 1,25-(OH)₂D₃ en el promotor del gen del IR.

OBJETIVOS

Los objetivos concretos del presente trabajo serán:

1. Estudiar en un modelo *in vivo*, en ratas sin o con diabetes experimental inducida por estreptozotocina, el efecto del tratamiento con la 1,25-dihidroxitamina D₃, a la dosis de 0,5 µg/kg/día durante 15 días, sobre distintos parámetros medidos en orina, otros medidos en sangre y las valoraciones del peso corporal. Valoraríamos también la posible modulación de la expresión del gen del receptor de insulina por análisis *Northern* en distintos tejidos de estos animales como el hígado, riñón, tejido adiposo perirrenal y tejido adiposo epididimal. En estos tejidos también mediríamos distintos parámetros tisulares como el contenido de ADN, ARN y proteínas, observando si hay modulación o no por esta hormona. Además, en adipocitos aislados del tejido adiposo epididimal de estos animales se valorará el efecto causado por la 1,25-dihidroxitamina D₃ en la unión de la insulina a su receptor y en ciertas actividades biológicas de la insulina como son el transporte y la oxidación de glucosa.
2. Estudiar en un modelo *in vitro*, la línea celular promonocítica humana U-937, el efecto del tratamiento con la 1,25-dihidroxitamina D₃, a la concentración de 10⁻⁸ M durante 24 h, sobre la expresión de su propio receptor y del gen que lo codifica. Valoraremos también la posible modulación sobre el receptor de insulina y el gen que lo codifica, así como sobre distintas actividades biológicas dependientes de la insulina como son el transporte y la oxidación de glucosa además de la incorporación de timidina. Asimismo, se profundizará en el estudio de la regulación del gen del receptor de insulina por la 1,25-dihidroxitamina D₃ analizando la posible implicación de mecanismos transcripcionales y en el caso de tener una respuesta positiva, analizaríamos la existencia de posibles elementos de respuesta a 1,25-dihidroxitamina D₃ en ese promotor.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. APARATOS

Los tejidos se homogeneizaron en un homogeneizador marca Polytron y se sometieron al proceso de sonicación utilizando un sonicador Branson Sonifier 450.

Para el mantenimiento de los cultivos celulares se dispuso de un incubador Heraeus modelo HeraCell. Las manipulaciones de las células se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar Telstar modelo BV-30/70.

Se utilizaron balanzas Sartorius tipo 1274 y Mettler modelo H80, un pHmetro Crison modelo MicropH 2001, y un baño termostatzado Selecta modelo Unitronic 320OR.

Las centrifugaciones hasta 6000 x g se realizaron en una centrifuga de mesa refrigerada Heraeus modelo Megafuge 1.0R. Las centrifugaciones a mayor velocidad se realizaron en una centrífuga refrigerada Sorvall modelo RC-5B, en una microcentrífuga Heraeus modelo Biofuge B y en una microcentrífuga Beckman modelo Microfuge B.

Las medidas espectrofotométricas se realizaron con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda Bio. Las medidas fluorimétricas del ADN se realizaron con un fluorímetro Hoefer TK100.

La radiactividad beta de los isótopos [α y $\gamma^{32}\text{P}$], [^3H] y [^{14}C] se midió en un contador de centelleo líquido Packard modelo 2500TR. Para la radiactividad [α y $\gamma^{32}\text{P}$] también se utilizó un minicontador de Bioscan modelo QC-2000. La radiactividad gamma de la insulina marcada con [^{125}I] se determinó en un contador Packard modelo Multi-Prias 1.

Las lecturas densitométricas se realizaron con el *Molecular Imager System* de BioRad modelo GS525.

Las fuentes de alimentación utilizadas para las electroforesis fueron de la marca BioRad modelo 200/2.0 y modelo Power Pack 1000. El ADN y el ARN se observaron en un transiluminador Spectroline modelo TVC-312A y en el documentador de geles GelDoc 1000 de BioRad. El aparato utilizado para fijar el ARN a la membrana de nylon fue un *Ultraviolet crosslinker* de Amersham Pharmacia Biothech. El horno de hibridación usado fue Techne modelo Hybridiser HB-1D.

El aparato empleado para las electroforesis y transferencias de los *Western blot* fueron de la marca BioRad modelo Mini-Protean II y Mini-Trans Blot, respectivamente.

Las transfecciones transitorias se realizaron con el electroporador modelo Gene Pulser II de BioRad.

Las medidas de luciferasa y β -galactosidasa se realizaron con el luminómetro modelo FB12 de Berthold Detection System.

Los geles de poliacrilamida se secaron en un secador de geles modelo 583 unido a una bomba de vacío Hydrotech, ambos de BioRad.

2. REACTIVOS

La 1,25-dihidroxitamina D₃, empleada en los estudios *in vivo*, fue el preparado comercial Calcijex de laboratorios Abbot. La 1,25-dihidroxitamina D₃, utilizada en los estudios *in vitro*, fue un regalo de la casa comercial Roche.

La estreptozotocina, utilizada en los estudios *in vivo*, se obtuvo de Sigma.

La wortmanina, utilizada en el transporte y la oxidación de glucosa en células U-937, fue de Sigma.

Las tiras reactivas Combur test, para la medición de distintos parámetros en orina de rata, procedieron de Roche.

Las tiras reactivas, para el test de glucosa-oxidasa, fueron de Boehringer Mannheim.

El medio de cultivo RPMI 1640, el suero fetal bovino y la penicilina-estreptomicina procedieron de Gibco BRL.

El isotiocianato de guanidina, la poliacrilamida, el N,N,N',N',-tetrametiletilenodiamina (TEMED) y el persulfato amónico fueron de ApplyChem.

La agarosa (D1 media electroendosmosis) fue proporcionada por Pronadisa.

Las membranas de nylon (Hybond-N) y nitrocelulosa (Hybond-C) fueron suministradas por Amersham Pharmacia Biotech. Las membranas de PVDF (Sequi-Blot PVDF Membrane) fueron suministradas por BioRad.

El método de extracción del ARN comercial fue el UltraSpecTM II de Biotecx Laboratories, Inc.

El plásmido pRIR/P16 que contenía el ADNc del IR de rata fue un regalo del Prof. Goldstein del Jefferson Medical College de Filadelfia. Los plásmidos pHIR/P12-1 y pH13 conteniendo el ADNc del IR humano y del VDR humano, respectivamente, se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC).

El plásmido reporter, que contenía el fragmento del promotor del IR humano desde -1819 hasta -271 pb, fue un regalo de los doctores S. Y. Tsai del Departamento de Biología Celular de la Universidad de California y G. Elberg del Colegio de Medicina *Baylor*, Texas. Los otros plásmidos reporter pGL2-basic y

PGL3-control fueron suministrados por Promega, el pCMV- β gal por Clontech, y el pBluescript II KS(+/-) por Phagemid.

El sistema comercial utilizado en la purificación del ADN plasmidial procedente de bacterias fue el Wizard Maxipreps de Promega para los plásmidos que contenían los ADNc de los diferentes receptores utilizados como sondas en los *Northern blot*, o el *kit* Maxiprep de Qiagen para los plásmidos utilizados en las transfecciones. Para la purificación y el aislamiento de fragmentos de ADN, tanto si eran sondas como si eran parte del promotor del gen del IR se utilizó el GeneClean II de Bio 101, Inc.

El marcaje radiactivo de las sondas de ADN se realizó mediante el sistema comercial *Multiprime DNA labelling system* de Amersham Pharmacia Biotech. Las columnas de cromatografía usadas en la purificación de la sonda de ADN marcada radiactivamente fueron del tipo Bio-Spin de BioRad.

Los productos radiactivos [α^{32} P], [γ^{32} P], [3 H], [14 C] y [125 I] procedieron de Amersham Pharmacia Biotech, American Radiolabeled Chemicals, Inc (ARC) y NEN Life Science Products, Inc.

Las enzimas de restricción, la T4 *DNA ligase* y la T4 polinucleótido quinasa procedieron de Promega. La enzima fosfatasa alcalina procedió de Boehringer Mannheim.

El ditioneitol, leupeptina, aprotinina, 4-(2-aminoetil)bencenosulfonil fluorídico (AEBSF) y ácido polideoxiinoscítico-deoxicidílico [Poli(dI-dC).poli(dI-dC)] procedieron de Sigma.

Los marcadores de peso molecular procedieron de Boehringer Mannheim y BioRad.

Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron el 9A7 contra el receptor VDR humano de Alexis Biochemical y el anticuerpo secundario anti IgG de rata conjugado con peroxidasa de Chemicon International.

El análisis de detección para *Western blot* (ECL) se compró a Amersham Pharmacia Biotech.

Para la determinación de las actividades enzimáticas de luciferasa y β -galactosidasa se utilizaron los *kit* comerciales *Luciferase Assay System* de Promega y *Galacto-Light Plus* de Tropix, respectivamente.

Los distintos oligonucleótidos empleados fueron sintetizados por Promega, Cruachem o Sigma.

Las películas de rayos X Curix RP2 y los líquidos de revelado fueron proporcionados por AGFA.

El resto de reactivos se obtuvieron de Sigma, Merck y Panreac.

3. MODELO EXPERIMENTAL IN VIVO

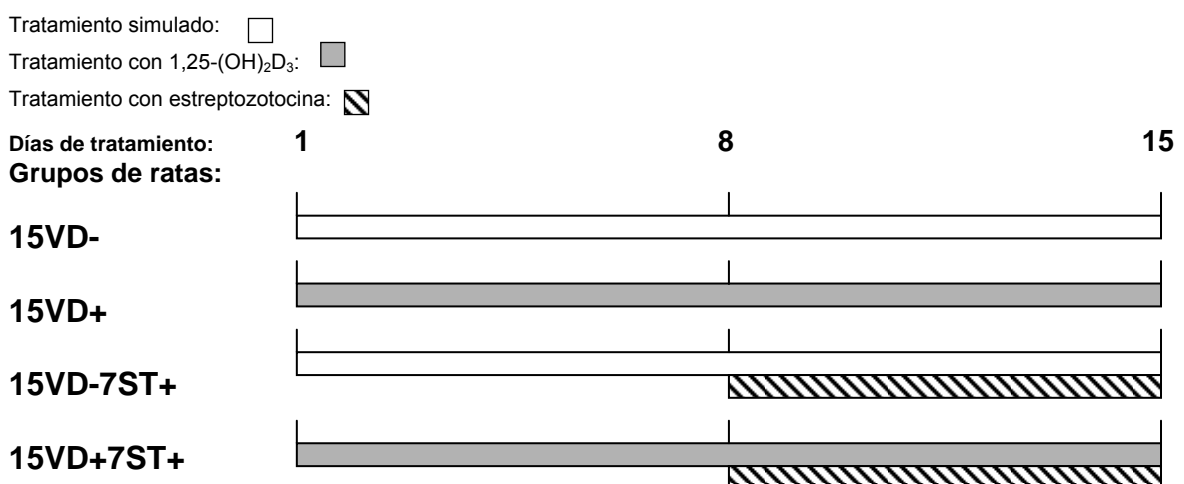
3.1. Animales

Los animales utilizados fueron ratas Wistar machos de alrededor de 220 g de peso, procedentes del animalario central de la UCM. Estos animales fueron alimentados *ad libitum* con pienso de rata (Sanders) y con libre acceso al agua de bebida. Además, estos animales fueron distribuidos dentro de jaulas, en cada una de ellas se pusieron 4 o 5 ratas. Estas ratas se expusieron a un ciclo estándar de luz/oscuridad de 12 h.

3.2. Tratamientos

En este protocolo experimental se consideraron 4 grupos de ratas, según se muestra en el esquema 1.

El primer grupo de ratas recibió exclusivamente tratamiento simulado con suero fisiológico durante 15 días y fue considerado como control (Ratas: 15VD-). El segundo grupo de ratas recibió tratamiento intraperitoneal con 1,25-(OH)₂D₃ a la dosis de 0,5 µg/kg/día, una vez al día, durante 15 días (Ratas: 15VD+). El tercer grupo de ratas recibió tratamiento simulado con suero fisiológico durante los 15 días de estudio, administrándosele además, al 8º día del tratamiento, una única inyección intracardiaca de esteptozotocina a la dosis de 65 mg/kg para la inducción de diabetes experimental en estos animales (Ratas:15VD-7ST+) (Mayor P, y col., 1987). El cuarto y último grupo de ratas recibió tratamiento durante 15 días con 1,25-(OH)₂D₃ y al 8º día también se le administró la inyección de esteptozotocina (Ratas: 15VD+7ST+).



Esquema 1: Representación esquemática de los tratamientos.

3.3. Obtención de las muestras de orina, sanguíneas y tisulares

Antes de los tratamientos y al finalizar éstos, a los animales se les tomó una muestra de orina y se les pesó. Tras ello, todos los animales se sacrificaron por decapitación sin anestesia, obteniéndose muestras de sangre del cuello para posteriores determinaciones. Asimismo, se extrajeron rápidamente los siguientes órganos o tejidos: el hígado, los riñones y los tejidos adiposos epididimales y perirrenales; todos fueron fragmentados y congelados inmediatamente en nitrógeno líquido hasta su posterior utilización para distintas valoraciones tisulares y ensayos *Northern*. Los tejidos adiposos epididimales, empleados en los estudios de unión de la insulina a su receptor y en los de actividades biológicas de la insulina, se extrajeron e inmediatamente fueron utilizados.

3.4. Valoraciones en orina

Se midieron los siguientes parámetros: densidad, pH, leucocitos, nitritos, proteínas, glucosa, urobilinógeno, bilirrubina y sangre con las tiras reactivas, ya indicadas en el apartado Reactivos.

3.5. Valoraciones en plasma

En los plasmas obtenidos tras centrifugación de la sangre total se analizaron los siguientes parámetros:

- Glucosa: por el test comercial ya indicado en el apartado Reactivos.
- Insulina: Utilizando la técnica de radioinmunoensayo de Herbert V. y col., 1965.

- Calcio, fósforo y 25-hidroxivitamina D₃. Estas valoraciones se realizaron en el Hospital Puerta de Hierro de Madrid.
- Proteínas plasmáticas: Se midieron mediante el método de Bradford MM., 1976.

3.6. Valoraciones en tejidos

Los fragmentos de tejidos se dispusieron en una solución de EDTA 2 mM, NaPO₄ 0,05 N y NaCl 2 N a pH 7,4 e inmediatamente fueron homogeneizados durante 1 min a media potencia, a continuación se sonicaron durante 20 seg también a media potencia.

3.6 a) ADN

El ADN se valoró mediante una variante del método de Labarca C. y col., 1980. Una alícuota del tejido (2 µl para el caso del hígado, 5 µl para el riñón y 10 µl para los tejidos adiposos) se puso en contacto con la solución de tinción [Solución de tinción: Hoechts 33258 0,1 µg/ml, TNE 1x (TNE 1x: NaCl 0,2 M, Tris-Cl 10 mM, EDTA 1mM, pH 7,4)]. Tras mezclar minuciosamente para favorecer la introducción del agente intercalante en el ADN de la muestra, se midió con un fluorímetro a una longitud de onda (λ) de excitación de 365 nm y una λ de emisión de 460 nm.

3.6 b) Proteínas

La valoración de proteínas se realizó con el método de Bradford MM., 1976. Una alícuota del tejido (10 µl para el hígado y los riñones y 40 µl para los

tejidos adiposos) se diluyó con 70 μ l de ClNa 0,9%. Se llevó a 3 ml con reactivo de Coomassie [Reactivo Coomassie: Azul de Coomassie 0,1 mg/ml, etanol 9,5% (v/v) y H₃PO₄ 9,5% (v/v)]. Tras esperar 5 min se midió la densidad óptica (DO) de los tubos a una λ de 595 nm en el espectrofotómetro.

4. MODELO EXPERIMENTAL IN VITRO

4.1. Línea celular U-937

El modelo de trabajo utilizado fue la línea celular mieloide de origen humano U-937. Esta línea celular, de carácter promonocítico, fue establecida por Sundstrom C. y col., 1976 a partir de células de un paciente con un linfoma histiocítico difuso. Estas células presentan varias propiedades de las células precursoras del linaje monocítico-macrofágico, como son la presencia de actividad enzimática α -naftil-acetato esterasa (Nilsson K. y col., 1981); capacidad de producir lisozima (Ralph P. y col., 1976); además poseen receptores para alguno de los componentes del sistema del complemento; así como para el extremo Fc de las inmunoglobulinas (Anderson CL., 1982; Guyre PM. y col., 1983), y capacidad para producir la interleukina 1 (Palacios R. y col., 1982).

Las células U-937 pueden diferenciarse hacia monocitos o macrófagos (Sundstrom C. y col., 1976; Harris P. y col., 1985; Minta JO. y col., 1985). Este proceso puede ser inducido por diversos agentes, entre los que destacan la 1,25-(OH)₂D₃ sola (Olsson I. y col., 1983 y Torres R. y col., 2000) o en combinación con el factor de necrosis tumoral (Trinchieri G. y col., 1987), el interferón γ (Testa U. y col., 1988), el ácido retinoico (Olsson IL. y col., 1982a; Olsson IL. y col., 1982b;

Ways DK. y col., 1988), el TPA (Minta JO. y col., 1985; Hass R. y col., 1989 y Rius C. y col., 1992) o el m-AMSA (Rius C. y col., 1991).

Estas células poseen, entre otros, receptores β -adrenérgicos tipo β_2 (Liggett SB., 1989; Maki T. y col., 1992), receptores de glucocorticoides (Hass R. y col., 1992), de mineralocorticoides (Campion J. y col., 1999), de estrógenos (Vegeto E, y col., 1999) y de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ (Mezzetti G, y col., 1984). También, poseen IRs (Robert A, y col., 1984; Leal MA. y col., 1992).

4.2. Condiciones de cultivo

Las células U-937 se cultivaron en medio RPMI 1640 al que se le añadió penicilina-estreptomicina (250 U/ml) y suero fetal bovino 10% (v/v) previamente descomplementarizado por calentamiento a 56°C durante 30 min. La línea celular se mantuvo en crecimiento exponencial continuo mediante subcultivos realizados cada 2 ó 3 días. Las células crecieron en un incubador a 37°C y con una atmósfera de CO_2 al 5%. Todas las manipulaciones de las células se realizaron en una cabina de flujo laminar.

4.3. Tratamientos

La $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ inicialmente se disolvió en etanol a la concentración de 10^{-5} M, posteriormente se aplicó a las células a concentraciones finales entre 10^{-9} M y 10^{-6} M y tiempos (8 ó 24 h) según los experimentos. A las células consideradas como control se les añadió exclusivamente el vehículo (0,1% etanol).

4.4. Análisis de viabilidad celular

Se realizaron estudios del número de células viables en función del tiempo de tratamiento. Las células viables se determinaron en una cámara de Neubauer, utilizando el test de viabilidad del azul tripán al 1%, para distinguir las células vivas de las muertas (Leal MA. y col., 1996). La viabilidad de las células tratadas fue de un 97% con respecto a células controles.

5. OBTENCIÓN DE SONDAS DE ADN

5.1. Sondas obtenidas

Se obtuvieron las siguientes sondas de ADNc:

- IR de rata: Se obtuvo a partir del plásmido pRIR/P16, que como ya ha sido mencionado fue un regalo del Prof. Goldstein. Bacterias *E. coli* (HB101) se transformaron con este plásmido, el cual contenía el vector pBS II sk(-) y la sonda de 2,3 kb del ADNc del IR de rata. Para la obtención de la sonda, el plásmido se cortó con la enzima de restricción EcoR I dando lugar a 3 fragmentos de 2,9, 1,3 y 0,98 kb. El fragmento utilizado como sonda fue el de 0,98 kb (Goldstein BJ. y col., 1990).
- IR humano: Se obtuvo a partir de una cepa comercial de bacterias *E. coli* transformada con el plásmido pHIR/P12-1. Este plásmido contenía el vector pUC12 y la sonda de 4,1 kb del ADNc del IR humano perteneciente a la isoforma A. Para la obtención de la sonda, el plásmido se cortó con la enzima de restricción EcoR I que dio lugar a 2

fragmentos de 4,1 y 2,7 kb. El fragmento utilizado como sonda fue el de 4,1 kb (Ullrich A. y col., 1985).

- VDR humano: Se obtuvo a partir del plásmido comercial pH13. La cepa de bacterias *E. Coli* HB101 se transformó con este plásmido formado por el vector pGEM3 y la sonda de 2,1 kb del ADNc del VDR humano. Para la obtención de la sonda, el plásmido se cortó con la enzima de restricción EcoR I produciéndose 2 fragmentos de ADN de 2,1 y 2,9 kb. El fragmento utilizado como sonda fue el de 2,1 kb (Baker AR. y col., 1988).

5.2. Métodos utilizados

5.2 a) Obtención de bacterias competentes

En primer lugar se prepararon placas de crecimiento para bacterias sin transformar, en placas de 90 mm de diámetro se distribuyó una mezcla de medio LB pH 7,5 [Medio LB: Bacto triptona 10 g/l, extracto de bacteria-levadura 5 g/l, NaCl 10g/l] y bacto agar (15 g/l). Para obtener placas de crecimiento con factor de selección al medio LB más el bacto agar se le añadió el antibiótico ampicilina (50 µg/ml); posteriormente este medio de cultivo se distribuyó en placas. Ambos tipos de placas sin o con antibiótico se guardaron a 4°C hasta su utilización.

Antes de comenzar con la obtención de bacterias competentes, la cepa bacteriana HB101 (que posteriormente será transformada con el plásmido pRIR/P16 o el pH13) y la cepa bacteriana DH5 α (que posteriormente será transformada con los plásmidos que se utilizaran en las transfecciones) se sembraron en placas sin ampicilina. Una colonia con la cepa de interés se inoculó

en 2,5 ml de medio LB y se incubó toda la noche a 37° C con agitación. Después de 18 h, este primer cultivo se amplió en 250 ml de medio LB con 20 mM de MgSO₄ y se incubó a 37°C hasta alcanzar una DO de 0,5 - 0,6 a una λ de 590 nm. Las bacterias se recogieron y centrifugaron a 4500 x g a 4°C durante 5 min. El sedimento se resuspendió en 0,4 volúmenes de TFB1 pH 5,8 [TFB1: Acetato potásico 30 mM, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 50 mM, RbCl 100 mM, Glicerol 15%]. Tras incubar 5 min a 0°C se centrifugó a 4500 x g durante 5 min a 4°C. El sedimento se resuspendió en 1/25 volúmenes de TFB2 pH 6,5 [TFB2: MOPS 10 mM, CaCl₂ 75 mM, RbCl 10 mM, Glicerol 15%]. Las células se incubaron a 0°C durante 15 min, después se hicieron alícuotas de 200 μ l que se guardaron a -80°C.

5.2 b) Transformación de las bacterias con los plásmidos

Las bacterias competentes se descongelaron en hielo durante 10 min. El plásmido (10 ng) se añadió en un volumen menor de 20 μ l. Tras mezclar suavemente las bacterias junto con el plásmido de interés, se realizaron las siguientes incubaciones consecutivas: primero a 0°C durante 20 min, después a 42°C durante 1 min y a continuación a 0°C durante 5 min. Tras las incubaciones, a la muestra se le añadió 4 volúmenes de medio LB, precalentado a 37°C, que se incubó durante 1 h a 37°C con agitación suave. Finalmente, se sembraron en placas con ampicilina que se incubaron a 37°C durante 15 - 18 horas.

5.2 c) Crecimiento de las bacterias transformadas

Una colonia de bacterias transformada con el plásmido de interés se incubó en medio LB al que se le añadió ampicilina 50 μ g/ml (las bacterias poseen

resistencia a este antibiótico conferida por el plásmido), la incubación se realizó a 37°C con agitación (190 rpm) durante aproximadamente 18 h.

5.2 d) Lisis bacteriana y purificación del ADN plasmidial

Como ya hemos indicado anteriormente en el apartado de reactivos el método comercial de extracción de ADN, *Wizard Maxipreps* de Promega se utilizó para la obtención de los plásmidos que contenían las sondas de los receptores de interés y el método comercial *Maxiprep* de Qiagen se utilizó para la obtención de plásmidos que posteriormente se emplearían para las transfecciones transitorias. Las bacterias transformadas se recogieron y se centrifugaron a 6000 x g. El sedimento resultante se disolvió con la primera solución de los *kit* comerciales, la cual incluía RNasas para la degradación del ARN y otros componentes que permitieron que la rotura celular fuese la adecuada. Seguidamente se adicionó la segunda solución que también contenía componentes para la rotura de las células, se mezcló suavemente por inversión para impedir la rotura del ADN genómico, posteriormente se agregó una solución de neutralización y se mezcló con suavidad por inversión. Esta mezcla se centrifugó a 20000 x g, recogándose el sobrenadante que contenía los plásmidos de interés.

La purificación del plásmido usando el preparado comercial *Wizard Maxipreps* se realizó por medio de una resina de purificación y una columna. Se mezcló el sobrenadante antes obtenido con la resina y a continuación se aplicó una solución de lavado para eliminar las impurezas. Posteriormente, a la mezcla de la resina más el ADN plasmidial se le adicionó TE pH 7,5 [TE: Tris-HCl 10 mM,

EDTA 1 mM], y se centrifugó a 10000 x g durante 5 min a 4°C, así el ADN fue liberado de la resina. El ADN disuelto en TE se guardó a -20°C.

Para la purificación de los plásmidos utilizando el preparado comercial *Maxiprep* de Qiagen también se utilizaron columnas comerciales. El sobrenadante con el plásmido que se deseaba purificar se pasó por una columna y se lavó varias veces con soluciones de lavado que también fueron proporcionadas por el *kit*. Una vez realizados los lavados, se añadió una solución de elución para liberar el ADN plásmidial de la columna. Se precipitó el plásmido con isopropanol, se lavó con etanol al 70% y finalmente, se resuspendió en agua Milli Q estéril.

5.2 e) Extracción y purificación de fragmentos de ADN contenidos en plásmidos

El método, que se describe a continuación, se utilizó para la extracción y purificación tanto de sondas como de fragmentos del promotor del gen del IR. El ADN plasmidial se digirió con una enzima de restricción. Los plásmidos que contenían las sondas se digirieron con la enzima EcoR I en el tampón H [Tampón H (1 x): Tris-HCl (pH 7,5) 90 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, NaCl 50 mM], la mezcla de reacción se incubó a 37°C durante toda la noche. Los plásmidos que llevaban inserto el promotor del gen del IR se sometieron a digestión con diferentes enzimas de restricción durante dos horas a las temperaturas que el fabricante recomendaba en cada caso. Finalizado el tiempo de incubación, se procedió a realizar un minigel de agarosa 1% en tampón TAE 1x [Tampón TAE 1x: Tris-acético 0,04 M, EDTA 1 mM] junto con bromuro de etidio 0,5 µg/ml, cargando con 1 µg de ADN en los pocillos del minigel. Las muestras se

sometieron a electroforesis con una diferencia de potencial de 80 V durante 2 h para comprobar si la digestión había tenido éxito. A continuación, se realizó otra electroforesis en gel de agarosa con toda la muestra de ADN. Observando el gel bajo luz ultravioleta, se cortó con un bisturí el trozo de agarosa que contenía la banda de ADN correspondiente al fragmento que se deseaba purificar, esta banda se identificó por su tamaño en comparación con un marcador de peso molecular (ADN del fago λ digerido con Hind III).

El fragmento de agarosa se introdujo en un tubo, y se procedió a la extracción del ADN que contenía, utilizando el sistema comercial, citado en el apartado Reactivos. Uno de sus componentes, el *glassmilk*, tiene capacidad para unirse al ADN en condiciones de temperatura ambiente o baja temperatura. El ADN se mantuvo retenido durante los lavados que se llevaron a cabo para eliminar los restos de impurezas. Terminados los lavados, la muestra se incubó con TE pH 8,0 a alta temperatura, fue entonces cuando el *glassmilk* liberó el ADN al tampón TE. Por último, el *glassmilk* se eliminó por centrifugación, conservándose el sobrenadante donde se encontraba el ADN de interés.

Para averiguar la concentración final de la sonda o el fragmento del promotor del IR, una alícuota de la solución que contenía el ADN se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TAE 1x, teñido con bromuro de etidio 0,5 $\mu\text{g/ml}$. En el mismo gel se cargaron también distintas diluciones del ADN patrón (ADN fago λ digerido con Hind III) de concentraciones conocidas. La concentración de la sonda se determinó comparando la intensidad de las distintas bandas.

6. MARCAJE RADIOACTIVO DE SONDAS DE ADN

6.1. Reacción de marcado

Las sondas de ADNc se marcaron con [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP utilizando el sistema comercial enunciado en el apartado Reactivos. Dicho sistema está basado en la técnica denominada *Primer extension* (Feinberg AP. y col., 1984). El ADNc (30 ng) utilizado como sonda se desnaturalizó por calentamiento a 100°C durante 5 min, inmediatamente después se introdujo en hielo para impedir la renaturalización del ADN. Tras esto, se añadió al ADNc la solución 1 [Solución 1: Tris-HCl (pH 7,8), MgCl_2 , β -mercaptoetanol, dATP, dGTP y dTTP] siempre en hielo y la solución 2 [Solución 2: Hexanucleótidos cebadores y albúmina bovina], se añadió también 30 - 50 mCi de [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (3000 Ci/mmol), y la solución enzimática [Solución enzimática: KPO_4 (pH 6,5) 50 mM, β -mercaptoetanol 10 mM y glicerol 50% (v/v) y el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I]. Todo ello se mezcló bien y se incubó a 22°C durante 5 h.

6.2. Purificación de la sonda marcada

La sonda de ADNc marcada radiactivamente se separó del isótopo, no incorporado, haciendo pasar la mezcla de reacción a través de una columna de cromatografía comercial y posteriormente centrifugando a 1100 x g durante 4 min y 4°C. El producto de la elución se almacenó a -20°C. Para calcular la actividad específica de la sonda marcada, se tomó una alícuota del eluido obtenido, y se midió la radiactividad en un contador de centelleo líquido. Una vez determinadas

las cpm, y teniendo en cuenta las diluciones realizadas, el volumen total del eluido obtenido y la cantidad de sonda marcada, se calculó la actividad específica de la sonda marcada, que siempre estuvo entre 1 - $1,5 \times 10^9$ cpm/mg de ADN.

7. PURIFICACIÓN DEL ARN

Todo el material de vidrio utilizado se trató previamente a 200°C durante 12 h, con objeto de eliminar las posibles ribonucleasas contaminantes. Con el mismo fin, el material de plástico se trató durante toda la noche con agua destilada tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC) 0,05%, y posteriormente se autoclavó a 125°C durante 30 min. Todas las soluciones se prepararon con agua destilada tratada con DEPC 0,15%.

7.1. Extracción del ARN de los tejidos

Para la purificación del ARN citoplasmático, a partir de los tejidos, se utilizó el método comercial citado en el apartado Reactivos. Este producto comercial es un método mejorado y más refinado que el método original de Chomczynski P. y col., 1987 basado en sales de guanidina 14 M y urea (Chaosolv), que actúan como agentes desnaturalizantes. La disolución Chaosolv en conjunción con el fenol y ciertos detergentes son agentes muy efectivos para el aislamiento de ARN total. La muestra de tejido se homogeneizó con el agente de extracción de ARN (1 ml por 100 mg de tejido) y después se mezcló con cloroformo (0,2 ml por ml de agente de extracción). A continuación se centrifugó a 12000 x g durante 15 min a 4°C. La fase acuosa que contenía el ARN se precipitó con isopropanol, se lavó 2

veces con etanol al 75% y finalmente se resuspendió en agua DEPC para su conservación. Las muestras se conservaron a -80°C hasta su utilización.

7.2. Extracción del ARN de las células U-937

Las células se recogieron centrifugando a 500 x g durante 7 min y 4°C, se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS) 1x [PBS 1x: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 2 mM], centrifugando cada vez en las mismas condiciones, antes referidas. Posteriormente, se congelaron los precipitados en etanol-nieve carbónica, y se almacenaron a -80°C. Para la purificación del ARN citoplasmático se utilizó el método de extracción de ARN original de Chomczynski P. y col., 1987. Las células se homogeneizaron en solución A [Solución A: isotiocianato de guanidina 4 M, citrato sódico 25 mM, sarcosil 0,5%, acetato sódico (pH 4,0) 2 M, y β-mercaptoetanol 2,9% (v/v)]. A continuación, las muestras se sometieron a una extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (125:49:1) y se centrifugaron a 8000 x g durante 40 min a 4°C. La fase acuosa resultante se sometió a dos precipitaciones sucesivas con isopropanol. Por último, el precipitado se lavó con etanol 75%, y se resuspendió en agua DEPC. Las muestras se conservaron a -80°C.

7.3. Valoración y comprobación de la integridad del ARN obtenido

La concentración final de ARN se valoró midiendo la DO a una λ de 260 nm, sabiendo que 1 unidad de DO (260 nm) corresponde a una concentración 40

$\mu\text{g/ml}$ de ARN. La pureza de la muestra se obtuvo de la relación DO (260 nm)/ DO (280 nm), que estuvo entre 1,7 y 2,0.

La integridad se valoró sometiendo a electroforesis 1 μg de ARN en un minigel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio 0,5 $\mu\text{g/ml}$, y comprobando la aparición nítida de dos bandas: una correspondiente al ARN ribosómico de 28 S que presentaba el doble de la intensidad que la otra banda correspondiente al ARN ribosómico de 18 S.

8. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DEL ARN

La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1,1% suplementado con formaldehído 6%, tampón MOPS 1x pH 7,0 [Tampón MOPS 1x: MOPS 40 mM, NaAc 10 mM, EDTA 2 mM] y bromuro de etidio 0,5 $\mu\text{g/ml}$. El tampón de desarrollo de la electroforesis fue MOPS 1x.

Las muestras de ARN (40 μg para tejidos y 30 μg para células) se prepararon para la electroforesis añadiéndoles los siguientes reactivos a las concentraciones finales indicadas: tampón MOPS 1x, formamida desionizada 50% y formaldehído 6%. La mezcla se incubó a 65°C durante 15 min para desnaturalizar el ARN y se puso inmediatamente en hielo para impedir la renaturalización. A continuación se añadió el tampón de carga [Tampón de carga: glicerol 50% (v/v), EDTA 1 mM y azul de bromofenol 0,4% (p/v)] a una concentración final del 10%. Finalmente, las muestras así preparadas se cargaron en el gel.

La electroforesis se realizó aplicando una diferencia de potencial de 20 - 25 voltios durante 18 - 22 h. Finalizada la electroforesis, el gel se lavó con agua Milli Ro y se fotografió a través de luz ultravioleta para comprobar que la cantidad de ARN total era la misma en todas las muestras (las bandas correspondientes a los ARNs ribosómicos deben ser equivalentes entre las distintas muestras).

9. TRANSFERENCIA A MEMBRANAS DEL ARN E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE ADN MARCADAS RADIATIVAMENTE (TÉCNICA NORTHERN)

Los ARNs, separados electroforéticamente, se transfirieron a membranas de nylon o nitrocelulosa siguiendo la técnica *Northern* (Thomas PS., 1980), con la única salvedad de que la transferencia se mantuvo durante 48 h para asegurar que ésta fuera completa, incluso a nivel de los ARNs de mayor peso molecular. Posteriormente, las membranas se secaron durante 10 min en una estufa a 80°C y se expusieron en un *Crosslinker*, en el caso de membranas de nylon, o se trataron en una estufa durante 2 h a 80°C, en el caso de las de nitrocelulosa. Finalizado el proceso, las membranas se almacenaron envueltas en papel de filtro a temperatura ambiente hasta su utilización.

Los ARNs inmovilizados sobre membrana de nylon o nitrocelulosa se hibridaron con la sonda de ADNc marcada radiactivamente de acuerdo con una modificación de una técnica descrita previamente por Hirschhorn RR. y col., 1984.

9.1. Prehibridación

Con el fin de evitar en lo posible la hibridación inespecífica de la sonda de ADNc marcada radiactivamente, las membranas previamente se prehibridaron en un horno de hibridación a 42°C durante 18 - 22 h con una solución que contenía las siguientes sustancias a las concentraciones finales indicadas: formamida desionizada 50%, SSC 5x, NaH₂PO₄ 50 mM pH 6,5, solución Denhardt 5x [Solución Denhardt 100x: Polivinilpirrolidona 2% (p/v), Ficoll 2% (p/v), albúmina sérica bovina 2% (p/v)], y ADN de esperma de salmón 250 µg/ml previamente sonificado y desnaturalizado por calentamiento a 100°C durante 10 min.

9.2. Hibridación

Finalizada la prehibridación, las membranas se hibridaron a 42°C durante 18 - 22 h con una solución que contenía las siguientes sustancias a las concentraciones finales indicadas: formamida desionizada 50%, SSC 5x, solución Denhardt 1x, NaH₂PO₄ 20 mM pH 6,5, ADN de esperma de salmón desnaturalizado 250 µg/ml, sulfato de dextrano 10% y la sonda de ADNc marcada radiactivamente desnaturalizada.

9.3. Lavados y autorradiografías

Las membranas hibridadas con las sondas del IR de rata o humano se lavaron tres veces con una solución de SSC 2x/SDS 0,1% a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se realizaron dos lavados más con una solución de SSC 0,1x/SDS 0,1% a 56°C de 1 h de duración cada uno de ellos.

Las membranas hibridadas con la sonda del VDR humano se lavaron cuatro veces con una solución de SSC 2x/SDS 0,1% a 25°C durante 15 min y otras cuatro veces con la solución de SSC 0,1x/SDS 0,1% a 56°C durante 15 min.

En todos los casos se monitorizaron los lavados con un *geiger* chequeando la cantidad de radiactividad inespecífica aún unida a la membrana. Para terminar, las membranas se envolvieron en hojas de PVC y se leyeron y densitometraron en un *Phosphorimager*. Tras su lectura se introdujeron en un *cassette* de exposición con una película fotográfica de rayos X. La exposición se realizó a -80°C durante el tiempo necesario, aproximadamente 4 días. Tras lo cual, la película se reveló, se fijó y se dejó secar.

9.4. Tratamiento cuantitativo de los datos

Los datos de densitometría obtenidos en las lecturas de las placas se normalizaron con sus respectivos controles de carga. Estos datos se expresaron en porcentaje con respecto al 100% de los controles.

Como controles de carga se utilizaron las lecturas por densitometría láser de los negativos de las fotografías de los ARNs ribosómicos, realizadas al finalizar las electroforesis correspondientes.

10. DETERMINACIÓN DE RECEPTORES DE INSULINA

10.1. Aislamiento de adipocitos del tejido adiposo epididimal de rata

El tejido adiposo epididimal recién extraído de las ratas en estudio, como se explica en el apartado 3.3 de esta sección, se troceó y se limpió en tampón Krebs [Tampón Krebs: NaCl 118 mM, NaHCO₃ 25 mM, KCl 5mM, KPO₄H₂ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2mM]. A continuación, el tejido se gaseó con carbógeno (95% O₂, 5% CO₂) y se incubó con la máxima agitación durante 30 min a 37°C en presencia de colagenasa (10 mg/ml) y de tampón Krebs siguiendo el método de Rodbell M., 1964. Tras la incubación se hicieron tres lavados con 20 ml de tampón Krebs para separar los adipocitos aislados del resto del tejido. Tras el tercer lavado, los adipocitos se resuspendieron en 10 ml de tampón Krebs. Se contó el número de adipocitos obtenidos en la muestra con una cámara de Neubauer, para posteriormente diluirlos con PBSA pH 7,4 [PBSA: PBS más albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos 2,5 mg/ml] y disponerlos a una concentración adecuada según los experimentos.

Además de esto, también se realizaron medidas del diámetro celular de los adipocitos (Di Girolamo M. y col., 1971).

10.2. Estudios de la unión de la insulina a su receptor en adipocitos de rata

La unión de la insulina a su receptor en adipocitos de rata se midió por la técnica de desplazamiento de la insulina marcada radiactivamente por cantidades crecientes de insulina no marcada. Alícuotas de 250 µl conteniendo 10⁵ adipocitos

en PBSA pH 7,6 se incubaron en un volumen final de 400 μ l ($2,5 \times 10^5$ adipocitos/ml) con el agente antidegradativo bacitracina pH 7,6 (1,42 mg/ml) y mono-[125 I]-insulina ($0,2 \times 10^{-9}$ M) en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de insulina no radiactiva (10^{-10} , 5×10^{-10} , 10^{-10} , $2,5 \times 10^{-9}$, 5×10^{-9} , 10^{-8} , $2,5 \times 10^{-8}$, 5×10^{-8} M) durante 30 min a 30°C (Mayor P. y col., 1987). Transcurrido este tiempo, se separó la hormona unida de la libre por centrifugación a través de dinonilo-ftalato (Gliemann J. y col., 1972). Para ello, la mezcla incubada se pasó a tubos que contenían 50 μ l de dinonilo-ftalato y se centrifugó durante 2 min a 8000 x g. Se observaron entonces tres fases en los tubos: una superior que contenía la hormona unida a sus receptores en los adipocitos, una capa intermedia con el aceite, y la inferior conteniendo la hormona libre. Los tubos se cortaron por la zona del aceite y la radiactividad asociada a la fase que contenía los adipocitos se midió en un contador gamma. La unión inespecífica de la insulina a su receptor se determinó en presencia de insulina no radiactiva (10^{-7} M). Los resultados de unión se expresaron como unión específica, es decir, sustrayendo la unión inespecífica y normalizando estos resultados para la concentración de 10^6 adipocitos.

10.3. Recogida de las células U-937

Las células U-937, tratadas o no, se recolectaron centrifugando a 500 x g durante 7 min a 4°C y se lavaron tres veces con PBS. Antes del último lavado se tomó una alícuota para contar las células viables. Finalmente, tras el último lavado, las células se resuspendieron en PBSA para obtener una concentración adecuada según los experimentos.

10.4. Estudios de la unión de la insulina a su receptor en células U-937

Los receptores de insulina en las células U-937 se midieron por la técnica de desplazamiento de la unión de la insulina marcada radiactivamente por cantidades crecientes de insulina no marcada. Alícuotas de 100 μl conteniendo 2×10^6 células en PBSA pH 7,6 se incubaron en un volumen final de 350 μl (6×10^6 células/ml) con mono-[^{125}I]-insulina ($0,5 \times 10^{-10}$ M) en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de insulina no radiactiva (5×10^{-11} , $1,25 \times 10^{-10}$, $2,5 \times 10^{-10}$, 5×10^{-10} , $1,25 \times 10^{-9}$, $2,5 \times 10^{-9}$, 5×10^{-9} , $1,25 \times 10^{-8}$ M) durante 1 h a 15°C (Leal MA. y col., 1992). Finalizada la incubación, se separó la hormona unida a los receptores de la libre por centrifugación a través de dibutilo-ftalato. Para ello, se añadió la muestra a tubos que contenían 75 μl de dibutilo-ftalato, y se centrifugó durante 2 min a $8000 \times g$. Se observaron tres fases en dichos tubos: una inferior con las células que contenía la hormona unida a sus receptores, una capa intermedia con el aceite, y una superior conteniendo la hormona libre. Se cortaron los tubos por la zona del aceite y la radiactividad asociada a la fase que contenía las células se midió en un contador gamma. La unión inespecífica de la insulina se determinó en presencia de insulina no radiactiva ($2,5 \times 10^{-7}$ ó 5×10^{-8} M). Los resultados de unión se expresaron en términos de unión específica, es decir, sustrayendo la unión inespecífica y normalizando después para la concentración de 10^7 células.

La determinación de la afinidad y del número de los receptores de insulina, en adipocitos de ratas, se llevó a cabo mediante el análisis de Scatchard G, 1949. De forma gráfica, se calculó la afinidad de los receptores mediante el cálculo geométrico de la concentración de insulina requerida para desplazar al 50% la máxima unión específica (ED_{50}). Este valor numérico corresponde al valor de la constante de

disociación (K_d) que es el inverso de la afinidad. El número de receptores totales se calculó con respecto al punto, obtenido en las curvas de *Scatchard*, representando la máxima hormona unida (Mayor P. y col., 1987; Leal MA.y col., 1992).

11. DETERMINACIÓN DE RECEPTORES DE 1,25-DIHIIDROXIVITAMINA D₃

11.1. Estudios de la unión de la 1,25-dihidroxitamina D₃ a su receptor en células U-937. Separación de fracciones nucleares

La recogida de células U-937 para estos ensayos fue semejante a lo descrito para receptores de insulina (apartado 10.3).

Para determinar VDRs en las células U-937 por estudios de unión se siguió el método de Jakob F. y col., 1992. Alícuotas de 125 μ l conteniendo 3×10^6 células en medio RPMI 1640 se incubaron con [³H]-1,25-(OH)₂D₃ ($0,5 \times 10^{-9}$ M) en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de 1,25-(OH)₂D₃ no radiactiva (10^{-9} , $2,5 \times 10^{-9}$, 5×10^{-9} M) en un volumen final de 500 μ l (6×10^6 células/ml), la incubación se realizó durante 1 h a 37°C. Transcurrido este tiempo, las células se trataron con Tritón X-100 al 1%, y se separó la fracción citosólica de la nuclear mediante una centrifugación a 800 x g durante 10 min a 4°C. El sedimento, que contenía las fracciones nucleares, se resuspendió con 100 μ l de tampón de resuspensión [Tampón de resuspensión: SDS al 0,5% y NaOH 0,1 N] y se pasó a tubos con líquido de centelleo, contándose la radiactividad asociada en un contador beta. La unión inespecífica de la 1,25-(OH)₂D₃ se determinó en presencia de 1,25-(OH)₂D₃ no radiactiva (5×10^{-8} M). Los resultados de unión se expresaron como unión

específica para lo cual se sustrajo la unión inespecífica y los resultados se normalizaron para la concentración de 2×10^7 células.

La determinación de la afinidad y del número de VDRs se llevó a cabo mediante el análisis de Scatchard G, 1949. De forma gráfica, se calculó la afinidad de los receptores mediante el cálculo de la pendiente de la recta formada por el desplazamiento de concentraciones crecientes de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. Este valor numérico corresponde al valor de la constante de disociación (Kd) que es el inverso de la afinidad. El número de receptores totales se calculó por el corte de la recta en el eje de abscisas.

11.2. Estudios de *Western blot*. Obtención de extractos nucleares de células U-937

Células U-937 ($1,6 \times 10^7$ células), tratadas o no, se recogieron y se lavaron dos veces con PBS realizando centrifugaciones a $500 \times g$ durante 5 min. El sedimento se resuspendió en tampón TBS pH 7,4 [Tampón TBS: NaCl 130 mM, KCl 2,7 mM, Tris 24 mM]. A partir de aquí, se trabajó en la cámara fría para evitar la degradación de los extractos. Siguiendo el método de Schreiber E. y col., 1988, la muestra se centrifugó a $12000 \times g$ durante 20 min. Se resuspendió en tampón A [Tampón A: Hepes 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, DTT 0,5 mM, Aprotinina 0,15 mM, Leupeptina 2,1 mM, AEBSF 1,2 mM]. Después, se incubó durante 15 min y a continuación se le añadió Noditet P-40 10% (v/v). Tras una agitación rigurosa se centrifugó durante 1 min a $12000 \times g$. Al sedimento se le añadió tampón C [Tampón C: Hepes 20 mM, Glicerol 25% (v/v), NaCl 400 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 0,5 mM, Aprotinina 0,15 mM, Leupeptina 2,1 mM,

AEBSF 1,2 mM] y se mantuvo en un agitador orbital durante 15 min. Seguidamente, se centrifugó a 12000 x g durante 5 min, recogiendo el sobrenadante que contenía los extractos nucleares. La muestra se guardó a -80°C hasta su utilización, no solo para esta técnica de *Western blot* sino también para la realización de la técnica de retardo en gel, como se verá mas adelante. La cantidad de proteínas totales de los extractos nucleares se midió por el método de Bradford MM., 1976.

Cantidades iguales (150 µg) de extractos nucleares de células controles y tratadas con 1,25-(OH)₂D₃ se sometieron a electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 10% [Mezcla de poliácridamida 30%, Tris (pH 8,8) 1,5 M, SDS 10%, APS 10%, TEMED 1%]. La electroforesis se realizó a 100 V, durante 1 h y 30 min a temperatura ambiente, el tampón de electroforesis fue Tris/borato pH 8,3 [Tris 65 mM, SDS 0,1%]. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF, para ello la membrana se preincubó durante 1 min en metanol, luego 5 min en agua Milli Q y se dejó en el tampón de transferencia [Tampón de transferencia: Tris 50 mM, Glicina 380 mM, SDS 0,1% (p/v), Metanol 20%] hasta que se realizó un *sandwich* con el gel y la membrana. La transferencia se realizó a 4°C y 35 V durante 2 h, utilizando el tampón de transferencia. La membrana se lavó tres veces con PBS luego se le añadió la solución bloqueante [Solución bloqueante: leche desnatada al 5% en PBST] [PBST: PBS, Tween 20 al 0,1%] se incubó con agitación durante 2 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se lavó una vez durante 15 min, y dos más durante 5 min. Posteriormente se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-VDR (9A7) a una concentración de 2 µg/ml en solución bloqueante. La incubación se

realizó con agitación a temperatura ambiente durante 2 h. La membrana se lavó como antes se ha mencionado. Terminados los lavados se incubó la membrana con el anticuerpo 2º, una inmunoglobulina de rata conjugada con peroxidasa, el anticuerpo 2º se diluyó 1:10000 en solución bloqueante. Posteriormente, se realizó un lavado de 3 min en PBST más tres lavados de 5 min de duración. Por último, se añadió 1,3 $\mu\text{l} \times \text{cm}^2$ de ECL, se introdujo en un *cassette* de exposición con una película fotográfica de rayos X. La exposición se realizó a temperatura ambiente durante 15 min. A su término, la película se reveló, se fijó y se dejó secar.

12. ESTUDIOS DE VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA INSULINA

12.1. Transporte de glucosa basal e inducido por insulina

12.1 a) En los adipocitos aislados del tejido adiposo epididimal de rata

Para los estudios de transporte de glucosa en adipocitos, el aislamiento de estas células se llevó a cabo como se explica en el apartado 10.1. A continuación, 250 μl conteniendo 10^5 adipocitos se incubaron a 37°C durante 1 h en presencia de adenosina deaminasa (1 U/ml) (Reaven GM. y col., 1989), PBSA pH 7,4 y D-[$^{14}\text{C}(\text{U})$]-glucosa ($0,5 \times 10^{-3}$ M), en ausencia o presencia de insulina a la concentración 10^{-7} M en un volumen final de 400 μl ($2,5 \times 10^5$ adipocitos/ml). Tras la incubación, las muestras se transfirieron a tubos que contenían 50 μl de dinonilo-ftalato centrifugándose a 8000 x g durante 2 min. En los tubos se observaron tres fases: una suspensión celular superior que contenía la D-[$^{14}\text{C}(\text{U})$]-

glucosa captada por las células, una capa intermedia con el aceite y una capa inferior conteniendo la D-[¹⁴C(U)]-glucosa no captada. Se cortaron los tubos por la zona del aceite y la parte correspondiente a la suspensión celular se transfirió a tubos con líquido de centelleo. La radiactividad asociada a esta suspensión celular se midió en un contador de centelleo líquido.

12.1 b) En las células U-937

Para los estudios de transporte de glucosa se recogieron las células en cultivo como se explica en el apartado 10.3. A continuación, se incubaron alícuotas de 200 µl conteniendo 10⁶ células, a 37°C durante 1 h en presencia de PBSA pH 7,4, D-[¹⁴C(U)]-glucosa (0,5 x 10⁻⁶ M) y concentraciones crecientes de insulina (10⁻¹¹, 10⁻¹⁰, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷ M) en un volumen final de 1 ml (10⁶ células/ml). El ensayo fue parado mediante tres lavados con PBS frío centrifugando durante 3 min a 3000 x g. Después, el sedimento procedente de la última centrifugación se solubilizó con SDS al 0,5% y NaOH 0,1 N y se pasó a tubos con líquido de centelleo. La radiactividad presente fue medida en un contador de centelleo líquido.

Para investigar el efecto de la wortmanina sobre el transporte de glucosa en células U-937, este inhibidor de la PI3-K fue adicionado a las células a dos concentraciones finales de 0,4 x 10⁻⁶ y 10⁻⁶ M en ausencia o presencia de insulina a la concentración de 10⁻⁸ M.

12.2. Oxidación de glucosa basal e inducida por insulina

12.2 a) En adipocitos aislados del tejido adiposo epididimal de rata

Para los estudios de oxidación de glucosa en adipocitos, éstos fueron aislados del tejido adiposo epididimal de ratas como se explica en el apartado 10.1. A continuación, alícuotas de 250 μl conteniendo 10^5 adipocitos se incubaron a 37°C durante 2 h en presencia de adenosina deaminasa pH 7,4 (1 U/ml) (Reaven GM, y col., 1989), PBSA pH 7,4 y D-[^{14}C (U)]-glucosa ($0,5 \times 10^{-3}$ M) en un volumen final de 400 μl ($2,5 \times 10^5$ adipocitos/ml), en ausencia o presencia de insulina a la concentración de 10^{-7} M. La incubación se realizó en tubos *ependorf* dentro de viales de centelleo, que contenían 1 ml de NaOH al 2%. Finalizado el periodo de incubación, a las muestras se les adicionó 0,5 ml de H_2SO_4 8 N y se incubaron durante 2 h más a 37°C , para que el $^{14}\text{CO}_2$ producido en la reacción pudiera ser atrapado por el NaOH, según una modificación del método de MacLennan. y col., 1978. Finalizada la incubación, los tubos *ependorf* se retiraron y se añadió líquido de centelleo para contar la radiactividad atrapada mediante un contador beta.

12.2 b) En las células U-937

Para los estudios de oxidación de glucosa se recogieron las células en cultivo como se explica en el apartado 10.3, con la diferencia de que, tras el último lavado, las células se resuspendieron en PBS. Seguidamente, una alícuota de 200 μl conteniendo 10^6 células en PBS se incubó, durante 2 h a 37°C , con D-[^{14}C (U)]-glucosa ($0,5 \times 10^{-3}$ M) en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de insulina (10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} M) en un volumen final de 500 μl

(2×10^6 células/ml). La incubación se realizó en tubos *ependorf* dentro de viales de centelleo, que contenían 1 ml de NaOH al 2%. Finalizado el periodo de incubación se adicionó a los tubos donde se encontraban las células 0,5 ml de H_2SO_4 8 N, incubándose durante 2 h más a $37^\circ C$ para que el $^{14}CO_2$ producido en la reacción fuera atrapado por el NaOH. Pasado este tiempo, se retiraron los tubos *ependorf* y se añadió líquido de centelleo a los viales para ser medidos posteriormente en el contador de radiactividad.

Para investigar el efecto de la wortmanina sobre la oxidación de glucosa en células U-937, este inhibidor de la PI3-K fue adicionado a las células a dos concentraciones finales de $0,4 \times 10^{-6}$ y 10^{-6} M en ausencia o presencia de insulina a la concentración de 10^{-7} M.

12.3. Incorporación de timidina basal e inducida por insulina en las células U-937

Las células, tratadas o no, se recogieron y se lavaron con PBS mediante centrifugación a $500 \times g$. Alícuotas de 10^6 células se dispusieron en un volumen de 5 ml de medio RPMI 1640 en placas de 60/15 mm de diámetro (2×10^5 células/ml) y se incubaron durante 23 h en presencia de concentraciones crecientes de insulina (10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} M) a $37^\circ C$ y en una atmósfera de CO_2 al 5%. Una hora antes de acabar la incubación se añadió [3H]-timidina ($0,5 \mu Ci$) a las placas.

Al acabar la incubación se recogieron alícuotas de las células (200.000 células) que fueron lavadas tres veces con PBS frío centrifugando a $1800 \times g$ durante 3 min a $4^\circ C$. A continuación, las células se incubaron con TCA al 10% durante 15 min a $4^\circ C$ y se centrifugó a $1800 \times g$ durante 5 min a $4^\circ C$. El

sedimento fue resuspendido con NaOH 1 N y se mantuvo 45 min a temperatura ambiente. Para finalizar se neutralizó con HCl 1 N y se transfirió en su totalidad a líquido de centelleo para su posterior medida en un contador de centelleo líquido.

12.4. Determinación de la respuesta y sensibilidad a la insulina

En adipocitos de ratas el transporte y la oxidación de glucosa se midieron en condiciones basales y en presencia de la concentración de insulina capaz de dar la máxima respuesta (10^{-7} M). Las unidades fueron fmol/min x 10^6 adipocitos o teniendo en cuenta el diámetro celular en fmol/min x μm^2 .

Tanto en adipocitos de ratas como en células U-937, el transporte de glucosa estimulado por insulina, se calculó sustrayendo los correspondientes valores basales. La alteración de la respuesta celular a la insulina fue medida por la variación de la máxima respuesta y la alteración de la sensibilidad celular se midió mediante el cálculo geométrico de la concentración de insulina requerida para disminuir al 50% la máxima respuesta (ED_{50}).

13. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS POR ELECTROPORACIÓN EN CÉLULAS U-937

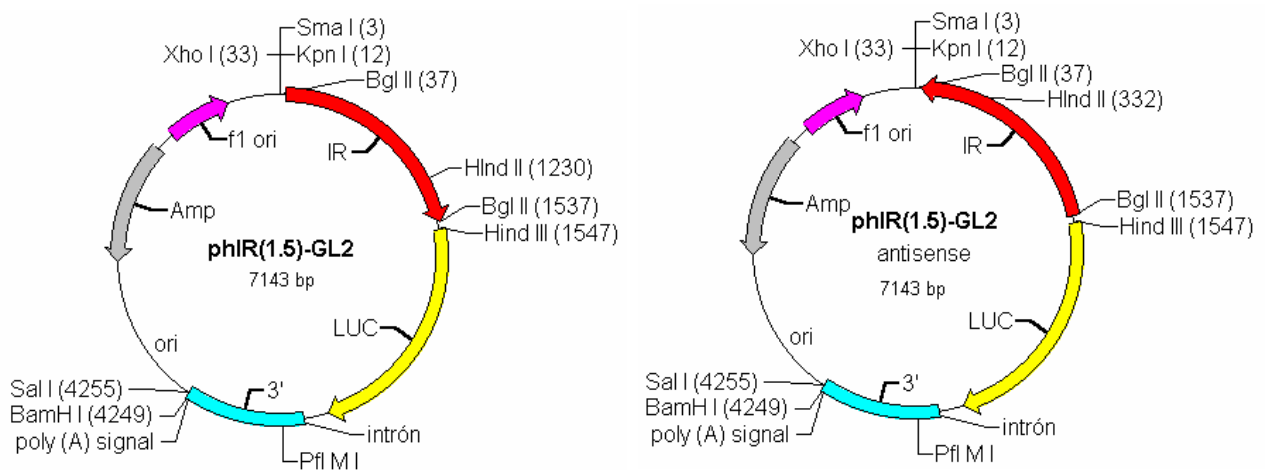
13.1. Construcción de plásmidos *reporter* por la técnica de subclonaje o delección

Para la construcción de los plásmidos que describiremos a continuación se empleó como vector el pGL2-basic, es un vector comercial que carece de cualquier tipo de promotor o *enhancer*. En este vector está insertada la región que

codifica la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*), la cual será utilizada para monitorizar la actividad transcripcional en las transfecciones transitorias que se realicen en las células U-937.

Plásmido phIR(1.5)-GL2: En primer lugar se aisló el promotor del gen del IR entero (desde -1819 hasta -271 pb) que se encontraba insertado en el vector pCAT3M. Este proceso se realizó como se describe en el apartado 5.2 e), con la enzima de restricción Bgl II junto con el tampón D [Tampón D (1 x): Tris-HCl (pH 7,9) 6 mM, MgCl₂ 6 mM, DTT 1 mM, NaCl 150 mM]. El fragmento del promotor aislado y purificado se unió al vector pGL2-basic en el sitio de corte para la enzima de restricción Bgl II, utilizando para ello la enzima T4 *DNA ligase*. Previamente, el vector pGL2-basic se defosforiló en su extremo 5' para que no se recircularizase, este proceso se llevo a cabo por la enzima alcalino desfosforilasa junto con el tampón de defosforilación [Tampón de defosforilación (1 x): Tris-Cl 0,05 M y EDTA pH 8,5 0,1 M]. Una proporción de tres veces más de promotor que de vector linealizado se incubó con la enzima T4 *DNA ligase* junto con el tampón de reacción [Tampón de reacción (1 x): Tris-HCl (pH 7,8) 30 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM]. La mezcla de reacción se incubó a 20°C durante 18 h, tras lo cual, las bacterias DH5 α se transformaron con dicha mezcla como se describe en el apartado 5.2 b). Las colonias resultantes se analizaron observándose dos tipos de colonias, unas transformadas con el plásmido que tenía insertado el promotor del gen del IR entero en la orientación adecuada (5' \rightarrow 3'), denominado phIR(1.5)-GL2 y otro tipo de colonias transformadas con el plásmido que tenía insertado el promotor con la orientación invertida (3' \rightarrow 5'),

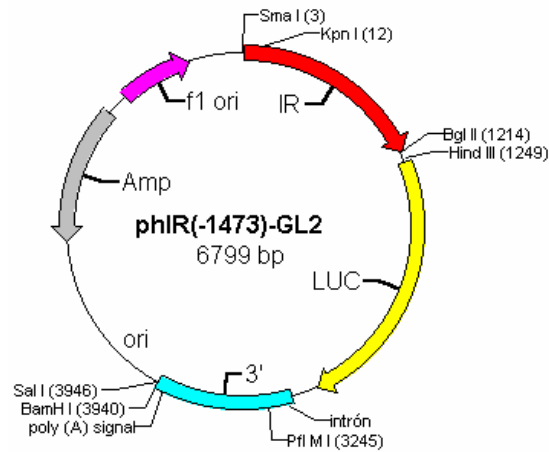
denominado *phIR(1.5)-GL2 antisense* (Esquema 2). Para diferenciar ambas formas se utilizó la enzima de restricción *Hind III*, la cual da lugar a patrones de bandas de ADN diferentes para cada uno de los plásmidos y, por tanto, perfectamente distinguibles.



Esquema 2: Diseño gráfico de los plásmidos *phIR(1.5)-GL2* y *phIR(1.5)-GL2 antisense*. En color rojo está representado el promotor del gen del receptor de insulina (IR).

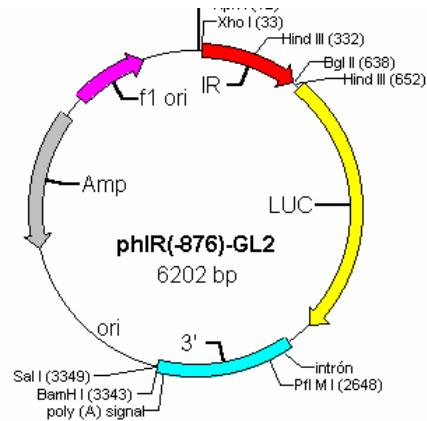
Plásmido *phIR(-1473)-GL2*: Este plásmido se formó por una delección en el extremo 5' del plásmido *phIR(1.5)-GL2*. La delección se realizó con la enzima de restricción *Kpn I*. Esta enzima tiene capacidad de cortar al plásmido en dos sitios, uno en la zona del *polylinker* del vector y el otro en la posición -1473 pb del promotor del IR. La digestión del plásmido *phIR(1.5)-GL2* con la enzima *Kpn I* en el tampón C [Tampón C (1 x): Tris-HCl (pH 7,9) 10 mM, $MgCl_2$ 10 mM, DTT 1 mM, NaCl 50 mM] se efectuó a $37^\circ C$ durante 2 h dando lugar a dos fragmentos de ADN de tamaños muy diferentes (382 kb y 6799 kb, aproximadamente) que se observaron en un gel de agarosa. Finalmente, como se describe en el apartado 5.2 e) se purificó el fragmento de 6799 pb, que contenía el promotor del gen del IR desde la posición -1473 hasta la -271 pb, situado en la zona *upstream* de la

secuencia codificadora para la luciferasa del vector. Por último, se recircularizó dando lugar al plásmido **phIR(-1473)-GL2** (Esquema 3).



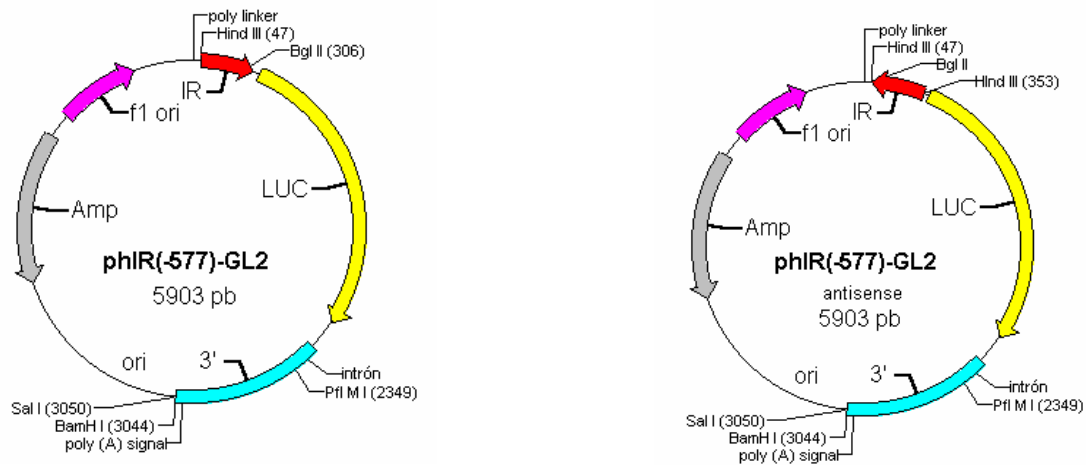
Esquema 3: Diseño gráfico del plásmido **phIR(-1473)-GL2**. En color rojo está representado el promotor del gen del receptor de insulina (IR).

El procedimiento de construcción del plásmido **phIR(-876)-GL2** fue idéntico al descrito arriba, salvo que la enzima de restricción empleada fue la Xho I con el tampón D [Tampón D (1 x): Tris-HCl (pH 7,9) 6 mM, MgCl₂ 6 mM, DTT 1 mM, NaCl 150 mM]. Esta enzima tiene capacidad para generar dos cortes en el plásmido **phIR(1.5)-GL2**, uno en el *polylinker* del vector y otro en la posición -876 pb del promotor del IR. Tras la digestión con esta enzima se purificó el fragmento de 6202 pb que contenía el promotor del gen del IR desde la posición -876 hasta la -271 pb, situado en la zona *upstream* de la secuencia codificadora para la luciferasa del vector. Por último, se recircularizó dando lugar al plásmido **phIR(-876)-GL2** (Esquema 4).



Esquema 4: Diseño gráfico del plásmido phIR(-876)-GL2. En color rojo está representado el promotor del gen del receptor de insulina (IR).

Para la construcción del plásmido phIR(-577)-GL2, el plásmido phIR(1.5)-GL2 se cortó con la enzima de restricción Hind III en el tampón E [Tampón E (1 x): Tris-HCl (pH 7,5) 6 mM, MgCl₂ 6 mM, DTT 1 mM, NaCl 100 mM]. Esta enzima tiene capacidad para producir dos cortes uno en el *polylinker* del vector y otro en la posición -577 pb del promotor. Como consecuencia de esta digestión, se obtuvieron dos fragmentos uno de 6855 kb y otro de 315 kb que era el promotor desde la posición -577 hasta la -271 pb. Este último fragmento se purificó como se describe en el apartado 5.2 e). Posteriormente se subclonó en el vector pGL2-basic, igual que se hizo para la construcción del plásmido phIR(1.5)-GL2. Se obtuvieron dos tipos de plásmidos uno con la orientación adecuada del fragmento del promotor del gen del IR, que incluye desde la posición -577 hasta la -271 pb, que se denominó phIR-GL2-577, y otro con la orientación del fragmento del promotor invertida (Esquema 5). Para diferenciar ambas formas se utilizó la enzima de restricción Bgl II, la cual dio lugar a patrones de bandas de ADN diferentes para cada uno de los plásmidos, y por tanto, perfectamente distinguibles.



Esquema 5: Diseño gráfico de los plásmidos phIR(-577)-GL2 y phIR(-577)-GL2 *antisense*. En color rojo está representado el promotor del gen del receptor de insulina (IR).

13.2. Transfecciones transitorias

Células U-937 se recogieron y se lavaron con PBS, centrifugándose a 500 x g durante 7 min a 4°C. Antes del último lavado se tomó una alícuota para contar las células viables. Finalmente, tras el último lavado, las células se resuspendieron en un volumen adecuado en medio RPMI 1640 para obtener una concentración final de $26,7 \times 10^6$ células/ml. Se cogió una alícuota de 750 μ l de estas células y se dispuso en una cubeta de electroporación de 0,4 cm, añadiéndosele NaCl a una concentración final de 18,75 mM, más 50 μ g del plásmido *reporter* correspondiente, junto con 50 μ g de un plásmido *carrier* [pBluescript II KS(+/-)] y 12 μ g del plásmido pCMV- β gal que posee actividad *reporter* β -galactosidasa. Los plásmidos *reporter* utilizados fueron los ya conocidos pGL2-basic, phIR(1.5)-GL2, phIR(-1473)-GL2, phIR(-876)-GL2, phIR(-577)-GL2, phIR(1.5)-GL2 *antisense*, pGL3-control. Este último plásmido era comercial, contenía el promotor y un *enhancer* del SV40 en la zona *upstream* de la región codificadora de luciferasa,

características que hicieron que fuese el plásmido utilizado para monitorizar la eficiencia de las transfecciones transitorias.

Las células junto con los plásmidos en las cubeta de electroporación se incubaron a 4°C durante 10 min, luego recibieron un pulso eléctrico de 960 μ F y 250 V. Las células transfectadas se dispusieron en placas de 60 mm de diámetro con un volumen final de 10 ml. Trascorridas 24 h, las células recibieron los tratamientos adecuados.

13.3. Cuantificación de la actividad transcripcional

Los valores de actividad transcripcional se midieron relativos a la actividad luciferasa. Para llevar a cabo esta cuantificación, se utilizó el *kit Luciferase Assay System*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, una vez finalizado el tratamiento, las células transfectadas transitoriamente se recogieron y se lavaron tres veces con PBS mediante centrifugaciones a 500 x g durante 6 min a 4°C. El sedimento resultante se resuspendió con 350 μ l del *reporter lysis buffer* 1x. Acto seguido, se sometió a un ciclo de congelación-descongelación rápido y se agitó 15 seg en vortex. Después, se centrifugó a 12.000 x g durante 2 min a 4°C y se recogió el sobrenadante para medir la actividad luciferasa.

Tanto para la cuantificación de la actividad luciferasa como la de β -galactosidasa, utilizada esta última para corregir la primera, se realizaron medidas de luminiscencia. Para la cuantificación de la actividad luciferasa se emplearon las condiciones de 2 seg de estabilización del luminómetro antes de empezar a contar durante 10 seg la luminiscencia producida por 20 μ l de muestra a la que se le adicionó 100 μ l de *Luciferase Assay Reagent* y tras haber transcurrido 10 seg

desde la adición mencionada. Para la cuantificación de la actividad β -galactosidasa se usó el *kit Galacto-Light Plus* en los siguientes términos a 10 μ l de muestra se le adicionó 200 μ l de *Reaction Buffer* y se incubó a temperatura ambiente durante 40 min. Transcurrido este tiempo se añadió 100 μ l de *Light Emission Accelerator*, y se midió en el luminómetro durante 5 seg.

Los valores resultantes de la cuantificación de la actividad luciferasa se corrigieron con los de la actividad β -galactosidasa, y se normalizaron por los mg de proteína de las células transfectadas.

14. BÚSQUEDA Y ANÁLISIS COMPUTERIZADO DE SECUENCIAS DE ADN

Potenciales secuencias VDREs fueron identificadas en el promotor del gen del IR a través de una búsqueda computerizada utilizando como plantilla una secuencia VDRE consenso elaborada por nosotros a partir de una serie de VDREs funcionales identificados por otros autores en varios promotores de genes respondedores a 1,25-(OH)₂D₃ (Ozono K. y col., 1990; Demay MB. y col., 1992; Colnot S. y col., 1995; Christakos S. y col., 1996; Ohyama Y. y col., 1996; Zou A. y col., 1997; Haussler MR. y col., 1998; Koszewski NJ. y col., 2000). Para ello, se utilizó un programa propio, soportado bajo Visual Basic 4.1 de Microsoft que se denominó SEQFIND (Mas A. y col., 1998). Este programa, basándose en una búsqueda secuencial, realiza un reconocimiento y alineación de secuencias dentro de un ADN conocido a partir de la base de datos *GenBank* o de una secuencia introducida por nosotros. También, se buscaron secuencias para otros factores transcripcionales que estuvieran franqueando o solapando a los

hipotéticos VDREs utilizando, para ello, el programa TFSEARCH asociado a una base de datos de factores transcripcionales denominada TRANSFAC (Wingender E. y col., 2001).

15 TÉCNICA DE RETARDO EN GEL UTILIZANDO EXTRACTOS NUCLEARES DE CÉLULAS U-937

15.1. Oligonucleótidos utilizados

Para los ensayos de retardo en gel se utilizaron los tres oligonucleótidos sintetizados comercialmente que se describen a continuación:

1. hOC: Este oligonucleótido comprende la secuencia del VDRE localizada entre -512 y -483 pb del promotor del gen de la osteocalcina humana: (5'TTGGTGA^{CT}CACCGGGTGAACGGGGGCATT3') (Ozono K. y col., 1990; Schule R. y col., 1990).
2. Un oligonucleótido que comprende las secuencias de dos potenciales VDREs solapados y localizados por nosotros entre -633 y -604 pb del promotor del gen del IR humano: (5'GAGGCGGGGAGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGG3').
3. Un oligonucleótido que comprende la secuencia de un potencial VDRE localizado por nosotros entre -761 y -732 pb del promotor del gen del IR humano: (5'CGTCGGGCCTGTGGGGCGCCTCCGGGGGTC3').

Estos oligonucleótidos estaban defosforilados *per se* al ser de síntesis comercial. Se anillaron en parejas complementarias, utilizando 15 ng/μl de cada

uno de ellos en presencia de CNa 0,1 N, la muestra se calentó a 70°C y se dejó enfriar durante toda la noche. Al día siguiente se hicieron alícuotas y se guardaron a -20°C. Para comprobar el anillado, los oligonucleótidos se dispusieron en un gel no desnaturizante de poliacrilamida al 20% y tampón TBE 1x pH 8,3 [Tampón TBE 10x: Tris 900 mM, H₃BO₃ 890 mM, EDTA 20mM] y se desarrolló una electroforesis a 100 V durante 3 h a temperatura ambiente. El gel se tiñó posteriormente con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se observaron los tamaños moleculares del ADN en un transiluminador.

15.2. Marcaje de oligonucleótidos por la T4 polinucleótido quinasa

Una muestra de 3,5 pmol de oligonucleótido de doble hebra se marcó en su extremo 5' utilizando 50 pmol de [γ -³²P]-ATP (3000 Ci/mmol) en una incubación de 1 h a 37°C con la enzima T4 polinucleótido quinasa y el tampón T4PNK [Tampón T4PNK: Tris-HCl (pH 7,6) 700 mM, MgCl₂ 100 mM, DTT 50 mM]. Al acabar el tiempo se paró la reacción adicionando EDTA 0,01 M. El oligonucleótido marcado se separó del isótopo no incorporado mediante una columna de cromatografía de Sephadex G-25 centrifugando a 1100 x g durante 4 min y a 4°C. El producto de la elución se almacenó a -20°C.

15.3. Reacciones de competición

10 µg de extractos nucleares, obtenidos según se indicó en el apartado 11.2, se incubaron en hielo durante 10 min con el tampón de unión 1x [Tampón de unión 5x: Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 2,5 mM, NaCl 250 mM,

Glicerol 20%, DTT 2,5 mM, poli (dl-dC).poli (dl-dC) 250 µg/ml] (Ausubel FM y col.,1989) en un volumen total de 20 µl. A continuación, 0,1 – 1 ng, aproximadamente 100.000 cpm, de cada uno de los oligonucleótidos marcados fueron añadidos a la reacción y seguidamente se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min. Como competidores específicos se utilizaron los respectivos oligonucleótidos fríos en exceso (50x, 100x ó 200x) y como competidor inespecífico se utilizó un oligonucleótido que englobaba el elemento respondedor a glucocorticoides del promotor del gen de la tirosina aminotransferasa de rata. En ciertos experimentos se utilizó como competidor parcialmente relacionado el hOC en exceso (50x). Para determinar la especificidad de la competición más estrictamente, se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-VDR (9A7) que se une con alta afinidad al extremo C-terminal del dominio de unión al ADN del VDR, también se utilizó suero no-inmune como control, tanto el anticuerpo como el suero no-inmune se añadieron en hielo una hora antes de comenzar la reacción de incubación con la sonda. Los complejos ADN-proteína fueron resueltos por electroforesis (185 V) a temperatura ambiente en tampón TBE 0,25 x, en un gel no desnaturizante de poliacrilamida al 4%. El gel se secó con un secador de geles aplicado a una bomba de vacío. A continuación se analizó en el *Phosphorimager* y se autorradiografió.

16. REPRESENTACIÓN Y ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los valores se representaron como la media \pm el error estándar (SEM) de los resultados obtenidos. La significación estadística de las diferencias entre los

distintos valores se determinó mediante el test t de Student y se expresó con el valor de p , las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de p fue menor de 0,05.

Se utilizó un PC con el software Origin, Excel y Power Point 2000 de Microsoft para el estudio estadístico y el tratamiento gráfico.

RESULTADOS

1. ESTUDIOS IN VIVO

1.1. Efecto de altos niveles de 1,25-dihidroxitamina D₃ en ratas sin o con diabetes experimental inducida por estreptozotocina

Como ya se indicó en Materiales y Métodos, el protocolo de este modelo experimental (Esquema 1) consistía en cuatro grupos de ratas: animales controles con tratamiento simulado durante 15 días (15VD-), animales tratados con 1,25-(OH)₂D₃ a la dosis de 0,5 µg/kg/día durante 15 días (15VD+), animales con tratamiento simulado y con diabetes experimental inducida por estreptozotocina a partir del 8º día del tratamiento (15VD-7ST+) y por último animales tratados con 1,25-(OH)₂D₃ durante 15 días y con diabetes experimental inducida por estreptozotocina a partir del 8º día del (15VD+7ST+).

1.1 a) Medidas de peso de los animales

Los pesos iniciales y finales de los cuatro grupos de animales en estudio están recogidos en la tabla 3. Todos los grupos aumentaron de peso significativamente durante los 15 días de duración del experimento: un 30% el grupo 15VD-, un 32% el grupo 15VD+, 11% el grupo 15VD-7ST+ y un 14% el grupo 15VD+7ST+. Hemos de indicar que la subida de peso en los grupos de ratas no diabéticas fue claramente mayor que en los grupos que presentaban diabetes.

Comparando exclusivamente los pesos finales se observó que el tratamiento con 1,25-(OH)₂D₃ a ratas no diabéticas incrementó significativamente el peso de los animales, las ratas con diabetes manifestaron una disminución

significativa del peso con respecto a controles y el tratamiento con $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ a ratas diabéticas revirtió la bajada de peso inducida por la diabetes.

Tabla 3. Medidas de peso de los cuatro grupos de ratas en estudio.

	<u>15VD-</u> (n=11)	<u>15VD+</u> (n=12)	<u>15VD-7ST+</u> (n=12)	<u>15VD+7ST+</u> (n=11)
Peso inicial (g)	217 ± 1,3	219 ± 1,6	219 ± 1,7	223 ± 1,5
Peso final (g)	283 ± 1,9*	290 ± 2,9 ^a	242 ± 6,9 ^a	254 ± 3,6 ^{ab}

Los valores son las medias ± SEM del número de animales indicado entre paréntesis. Solo están representadas las diferencias estadísticas que siguen: * $p < 0,05$ pesos finales vs. pesos iniciales entre cada uno de los grupos. Además, exclusivamente sobre pesos finales, están representadas las diferencias estadísticas:

^a $p < 0,05$ (Cada uno de los grupos) vs. (15VD-)

^b $p < 0,05$ (15VD+7ST+) vs. (15VD-7ST+)

1.1 b) Valoraciones en orina

Las valoraciones en orina de distintos parámetros, al inicio y al final del tratamiento en los cuatro grupos de animales en estudio, están reunidas en la tabla 4. Como se puede observar tras los 15 días de duración del experimento sólo se vieron modificados algunos parámetros en los grupos de animales diabéticos. Así, las ratas con diabetes presentaron alterados los siguientes parámetros: incremento de la densidad y la glucosa, se acidificó el pH, y se detectó presencia de leucocitos, cuerpos cetónicos y sangre. El tratamiento con la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ a ratas diabéticas acidificó algo más la orina, contrarrestó en parte la presencia de leucocitos y no modificó el resto de los parámetros.

Tabla 4: Valoraciones en orina de los cuatros grupos de ratas en estudio.

		15VD- (n=4)	15VD+ (n=4)	15VD-7ST+ (n=4)	15VD+7ST+ (n=4)
Densidad	Inicial	1010	1015	1020	1020
	Final	1015	1010	1020	1020
PH	Inicial	7	7	7	7
	Final	7	7	6	5
Leucocitos/μl	Inicial	Neg	Neg	Neg	Neg
	Final	Neg	Neg	10-25	5-10
Nitritos (mg/dl)	Inicial	Neg	Neg	Neg	Neg
	Final	Neg	Neg	Neg	Neg
Proteínas (mg/dl)	Inicial	Neg	Neg	Neg	Neg
	Final	Neg	Neg	Neg	Neg
Glucosa (mg/dl)	Inicial	Normal	Normal	Normal	Normal
	Final	Normal	Normal	1000	1000
C. Cetónicos (mg/dl)	Inicial	Neg	Neg	Neg	Neg
	Final	Neg	Neg	+	+
Urobilinógeno (mg/dl)	Inicial	Normal	Normal	Normal	Normal
	Final	Normal	Normal	Normal	Normal
Bilirrubina (mg/dl)	Inicial	Neg	Neg	Neg	Neg
	Final	Neg	Neg	Neg	Neg
Sangre (eritrocitos/μl)	Inicial	Neg	Neg	Neg	Neg
	Final	Neg	Neg	5-10	5-10

Las valoraciones numéricas son la media de las realizadas en el número de animales indicado entre paréntesis.

1.1 c) Valoraciones plasmáticas

Las valoraciones plasmáticas realizadas al final de los días de tratamiento están recopiladas en la tabla 5. Como se puede apreciar el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ a ratas no diabéticas no alteró los niveles de glucosa ni los de insulina. La diabetes experimental indujo hiperglucemia e hipoinsulinemia, el

tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ a ratas diabéticas no varió la hiperglucemia ni la hipoinsulinemia de estos animales.

También se midieron parámetros relacionados con la síntesis y actividad biológica de la 1,25-(OH)₂D₃ como la concentración de la 25-hidroxivitamina D₃ que no resultó alterada en ninguno de los grupos y las concentraciones de calcio y de fósforo resultando esta última incrementada en las ratas del grupo 15VD+7ST+.

Además, se midió el contenido de proteínas que tampoco resultó alterado en ninguno de los grupos de ratas en estudio.

Tabla 5: Valoraciones plasmáticas de los cuatros grupos de ratas en estudio.

	15VD-	15VD+	15VD-7ST+	15VD+7ST+
Glucosa	125 ± 7,7	130 ± 2,8	420 ± 36 ^a	459 ± 16 ^a
(mg/dl)	(n=9)	(n=10)	(n=7)	(n=12)
Insulina	1,6 ± 0,3	1,5 ± 0,2	0,7 ± 0,3 ^a	0,5 ± 0,1 ^a
(ng/ml)	(n=9)	(n=10)	(n=6)	(n=11)
25-hidroxivitamina D₃	19 ± 1,8	15 ± 1,8	15 ± 3,8	17 ± 3,5
(ng/ml)	(n=4)	(n=4)	(n=3)	(n=4)
Calcio	7,5 ± 1,5	10 ± 1,1	10 ± 0,4	11 ± 1,0 ^a
(mg/dl)	(n=4)	(n=4)	(n=3)	(n=4)
Fósforo	6,8 ± 1,0	8,7 ± 1,2	7,2 ± 0,5	11 ± 0,7 ^{ab}
(mg/dl)	(n=4)	(n=4)	(n=3)	(n=4)
Proteínas	65 ± 1,6	66 ± 1,0	63 ± 0,9	64 ± 1,6
(mg/ml)	(n=9)	(n=10)	(n=6)	(n=11)

Los valores son las medias ± SEM del número de animales indicado entre paréntesis. Están representadas las diferencias estadísticas que siguen:

^a p<0,05 (Cada uno de los grupos) vs. (15VD-)

^b p<0,05 (15VD+7ST+) vs. (15VD-7ST+)

1.1 d) Características tisulares de los distintos tejidos en estudio

Tras las valoraciones de distintos parámetros en plasma y orina de los animales en estudio, se procedió a valorar el efecto del tratamiento con 1,25-(OH)₂D₃ sobre ciertos parámetros tisulares como son el contenido de ADN, proteína y ARN, y el indicador del tamaño celular medido como la relación entre proteína/ADN en cuatro diferentes tejidos diana para la insulina que además están relacionados con la biosíntesis o la actividad biológica de la 1,25-(OH)₂D₃ (Tabla 6).

Las valoraciones en el hígado revelaron que los animales no diabéticos tratados con la 1,25-(OH)₂D₃ no tenían alterado el contenido de ADN, proteínas ni ARN, pero sí tenían incrementado el indicador del tamaño celular. La diabetes experimental indujo un incremento en la cantidad de ADN y proteínas, sólo significativo en el primer caso, mientras el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ a ratas diabéticas no revirtió el incremento de estos parámetros inducidos por la diabetes.

Las valoraciones en el riñón mostraron un incremento significativo en el contenido de proteínas y en el indicador del tamaño celular cuando a las ratas no diabéticas se les trató con la 1,25-(OH)₂D₃. En los animales que padecieron diabetes experimental también se produjo un incremento en ambos parámetros, que el tratamiento con 1,25-(OH)₂D₃ a ratas diabéticas no revirtió.

Tabla 6: Características tisulares de los distintos tejidos en estudio.

	15VD- (n=4)	15VD+ (n=4)	15VD-7ST+ (n=3)	15VD+7ST+ (n=4)
Hígado				
ADN (mg/g)	1,9 ± 0,2	1,5 ± 0,2	2,9 ± 0,6 ^a	2,4 ± 0,2 ^a
Proteína (mg/g)	105 ± 19	146 ± 27	203 ± 57	182 ± 15 ^a
Proteína/ADN (mg/g)	52 ± 9,9	99 ± 11 ^a	67 ± 5,7	76 ± 3,5 ^a
ARN (mg/g)	3,9 ± 0,3	3,2 ± 0,4	3,5 ± 0,4	3,8 ± 0,2
Riñón				
ADN (mg/g)	3,0 ± 0,1	2,8 ± 0,2	3,3 ± 0,5	3,4 ± 0,1 ^a
Proteína (mg/g)	69 ± 2,8	120 ± 5,5 ^a	134 ± 33 ^a	153 ± 29 ^a
Proteína/ADN (mg/g)	18 ± 5,0	43 ± 2,1 ^a	41 ± 10 ^a	45 ± 10 ^a
ARN (mg/g)	1,3 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,3 ± 0,3	2,0 ± 0,1 ^a
Adiposo perirrenal				
ADN (mg/g)	0,2 ± 0,03	0,1 ± 0,01 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,1
Proteína (mg/g)	4,0 ± 0,6	3,1 ± 0,5	12 ± 1,0 ^a	6,5 ± 1,5 ^b
Proteína/ADN (mg/g)	23 ± 4,0	31 ± 3,4	29 ± 5,0	25 ± 2,5
ARN (mg/g)	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01
Adiposo epididimal				
ADN (mg/g)	0,2 ± 0,06	0,2 ± 0,02	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,04
Proteína (mg/g)	5,1 ± 1,0	8,2 ± 2,7	7,9 ± 0,5 ^a	6,1 ± 1,8
Proteína/ADN (mg/g)	24 ± 5,2	47 ± 12	25 ± 0,8	20 ± 3,4
ARN (mg/g)	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,003	0,1 ± 0,04

Los valores son las medias ± SEM del número de experimentos indicado entre paréntesis. Están representadas las diferencias estadísticas que siguen:

^a p<0,05 (Cada uno de los grupos) vs (15VD-)

^b p<0,05 (15VD+7ST+) vs (15VD-7ST+)

Valorando el tejido adiposo perirrenal observamos que el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ a ratas no diabéticas provocó una disminución significativa en el contenido de ADN. La diabetes experimental incrementó los niveles de ADN y proteínas, mientras el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ a ratas diabéticas sí que revirtió significativamente el incremento en el contenido en proteínas.

Cuando se analizó el tejido adiposo epididimal se vio que el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ a ratas no diabéticas no alteró ninguno de los parámetros en estudio. La diabetes experimental incrementó significativamente el contenido en proteínas, que el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ a estos animales no revirtió.

En este mismo tejido también se estudiaron otras características tisulares recogidas en la tabla 7. Como puede observarse en dicha tabla, el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ a ratas no diabéticas no modificó ninguno de los parámetros en estudio. La diabetes experimental provocó una disminución tanto en el peso del tejido adiposo como en el diámetro de los adipocitos, mientras que el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ a ratas diabéticas no alteró los cambios inducidos por la diabetes.

Tabla 7: Otras características tisulares del tejido adiposo epididimal.

	15VD- (n=7)	15VD+ (n=7)	15VD-7ST+ (n=7)	15VD+7ST+ (n=9)
Peso del tejido adiposo (g)	3,2 ± 0,2	3,0 ± 0,3	1,6 ± 0,2 ^a	2,0 ± 0,2 ^a
Nº de adipocitos/g (x 10⁶)	2,1 ± 0,4	2,3 ± 0,2	2,8 ± 0,2	2,7 ± 0,2
Diámetro de los adipocitos (µm)	50 ± 1,5	51 ± 1,2	39 ± 2,7 ^a	40 ± 1,3 ^a

Los valores son las medias ± SEM del número de experimentos indicado entre paréntesis. Están representadas las diferencias estadísticas que siguen: ^a p<0,05 (Cada uno de los grupos) vs (15VD-)

1.1 e) Regulación de la expresión del gen del receptor de insulina en los distintos tejidos en estudio

A continuación se realizaron ensayos *Northern* para determinar el efecto del tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ sobre los niveles de expresión del ARNm del IR en los tejidos en estudio, utilizando como sonda la homóloga del ARNm del IR de rata.

En el análisis *Northern* del hígado (Figura 9), al igual que en los tejidos que se estudiarán después, se pueden observar dos especies del ARNm del IR con tamaños de 9,5 kb y 7,5 kb, en concordancia con previos datos de nuestro laboratorio (Camió J. y col., 1997; Camiό J. y col., 1998). La proporci3n relativa de ambas especies (9,5 kb/7,5 kb) en animales controles no diab3ticos fue de $1,2 \pm 0,2$. En ratas no diab3ticas, el tratamiento con 1,25-(OH)₂D₃ no modific3 la expresi3n de ninguna de las dos especies. La diabetes experimental indujo un incremento significativo de ambas (78% en la de 9,5 kb y 69% en la de 7,5 kb), mientras el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ a ratas diab3ticas no alter3 el incremento inducido por la diabetes.

El an3lisis *Northern* del riñ3n revel3 que la proporci3n relativa de ambas especies (9,5 kb/7,5 kb) en animales controles no diab3ticos fue de $2,0 \pm 0,2$. En la figura 10 se puede observar que los niveles de expresi3n de las dos especies del ARNm del IR no resultaron afectados por los distintos tratamientos.

Como se puede observar en el an3lisis *Northern* del tejido adiposo perirrenal (Figura 11), el cociente 9,5 kb/7,5 kb en animales controles no diab3ticos fue de $1,2 \pm 0,1$. Tras el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ a ratas no diab3ticas los niveles de expresi3n de las dos especies del ARNm del IR

decrecieron (9% en la de 9,5 kb y 12% en la de 7,5 kb), siendo estadísticamente significativo el efecto causado sobre la especie de 7,5 kb. La diabetes experimental causó una reducción significativa de la expresión de las dos especies del ARNm del IR (26% en la 9,5 kb y 8% en la de 7,5 kb). El tratamiento con $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ a ratas diabéticas revirtió la bajada en la expresión de los niveles de ambas especies inducida por la diabetes.

En el análisis *Northern* del tejido adiposo epididimal (Figura 12) se obtuvo un cociente 9,5 kb/7,5 kb en animales controles no diabéticos de $1,1 \pm 0,03$. El tratamiento con la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ a ratas no diabéticas no alteró significativamente la expresión de ambas especies del ARNm del IR. La diabetes experimental indujo incremento de ambas especies (58% en 9,5 kb y 92% en 7,5 kb), siendo significativo el incremento causado sobre la especie de 7,5 kb. El tratamiento con $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ a ratas diabéticas revirtió el incremento de la expresión inducido por la diabetes, siendo significativa la reversión causada en la especie de 7,5 kb.

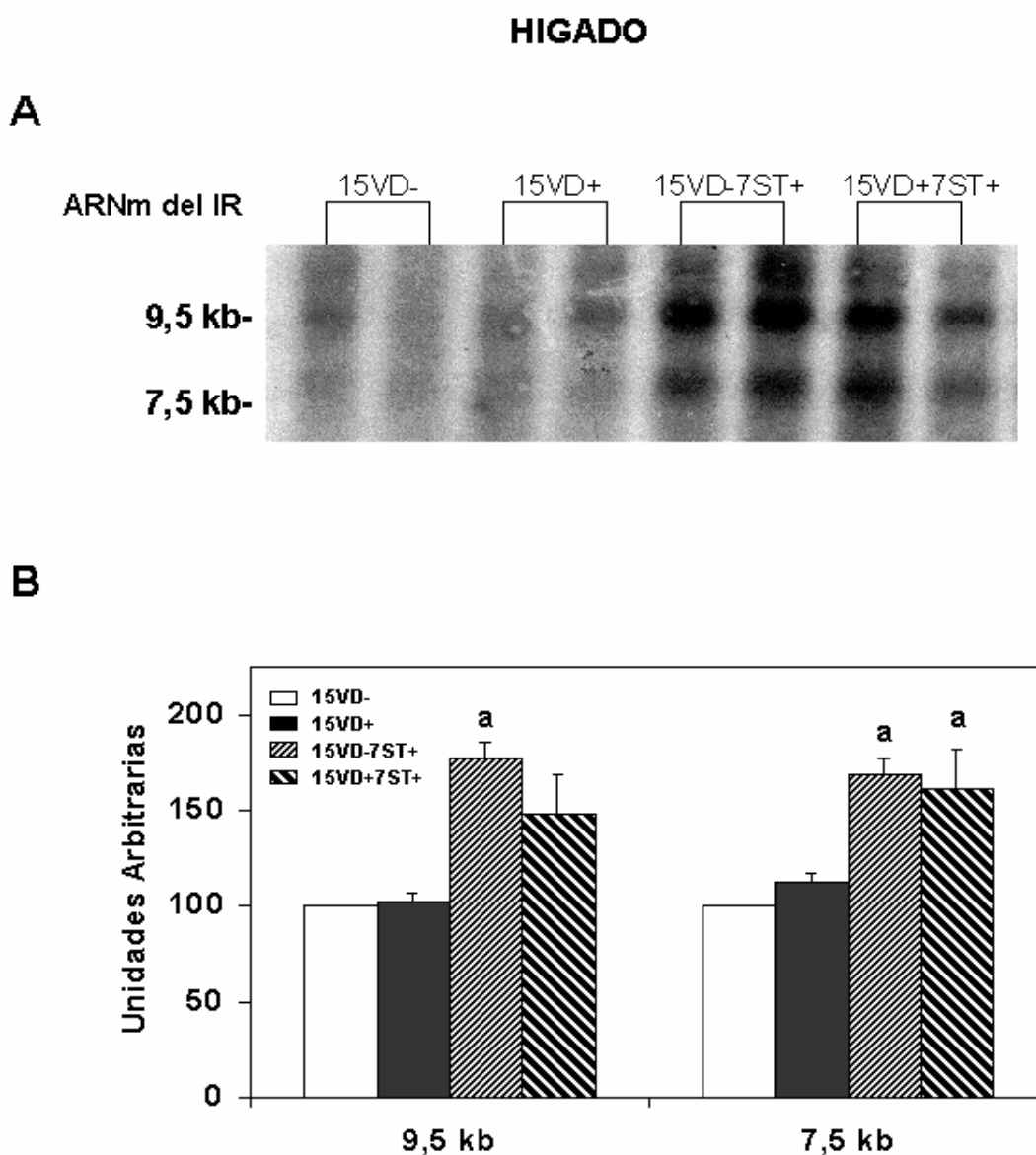


Figura 9. Efecto del tratamiento con la 1,25-dihidroxitamina D₃ sobre los niveles de ARNm del receptor de insulina en el hígado de ratas sin o con diabetes experimental inducida por estreptozotocina. A) Análisis *Northern* de muestras de 40 µg de ARN total extraído de animales controles con tratamiento simulado durante 15 días (15VD-), animales tratados con 1,25-(OH)₂D₃ a la dosis de 0,5 µg/kg/día durante 15 días (15VD+), animales con tratamiento simulado y con diabetes experimental inducida por estreptozotocina a partir del 8º día de tratamiento (15VD-7ST+) y por último, de animales tratados con 1,25-(OH)₂D₃ durante 15 días y con diabetes experimental inducida por estreptozotocina a partir del 8º día del tratamiento (15VD+7ST+). En la autorradiografía se muestra las dos principales especies de ARNm del IR con sus tamaños al margen. **B)** Lecturas densitométricas normalizadas con los respectivos valores de ARNr 28 S y expresadas en unidades arbitrarias relativas al valor 100 dado a cada una de las especies del ARNm del IR en el grupo 15VD- [Medias ± SEM, ^a p<0,05(Cada uno de los grupos) vs. (15VD-)]

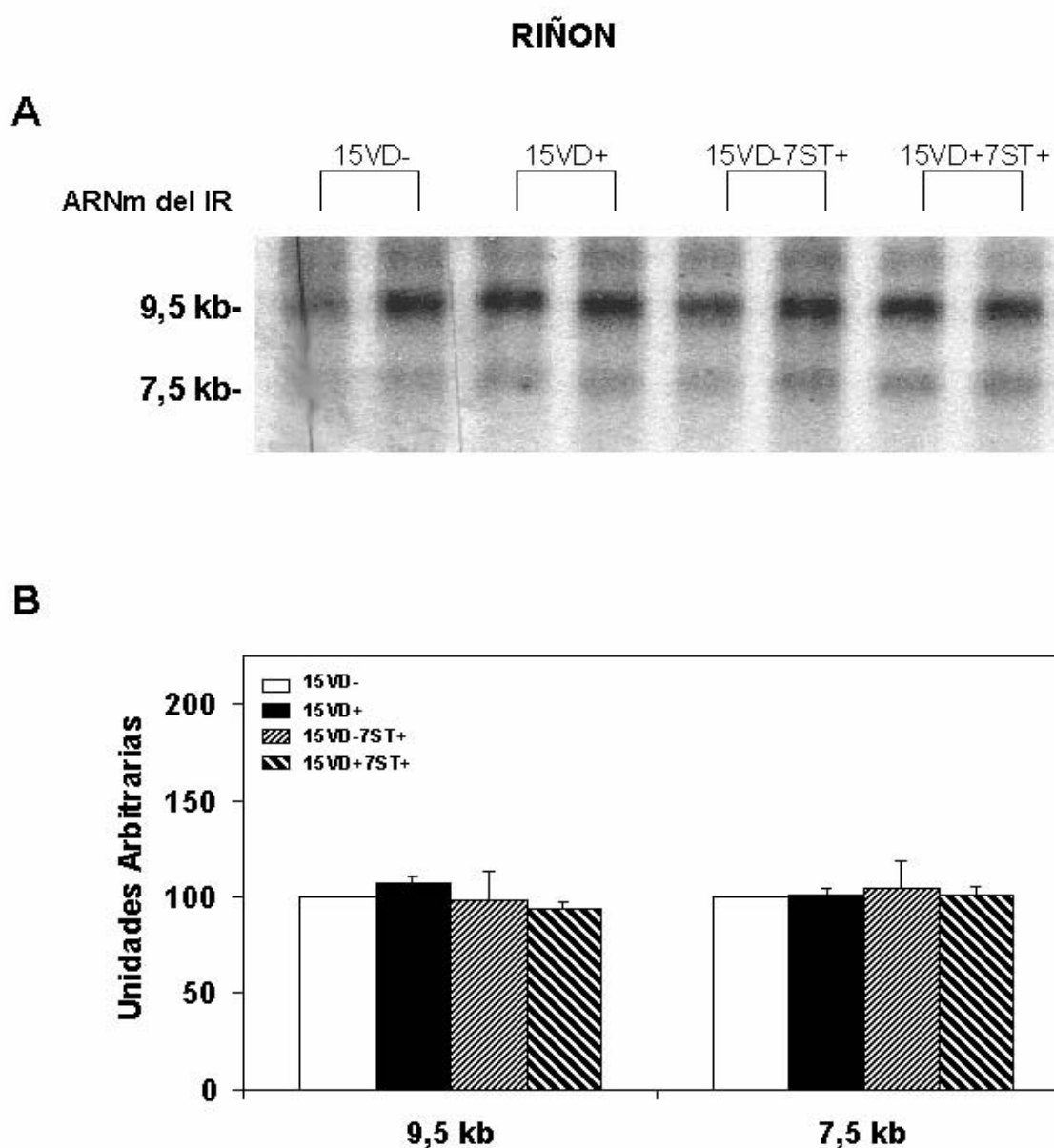


Figura 10. Efecto del tratamiento con la 1,25-dihidroxitamina D_3 sobre los niveles de ARNm del receptor de insulina en el riñón de ratas sin o con diabetes experimental inducida por la estreptozotocina. A) Análisis *Northern* de muestras de 40 μ g de ARN total extraído de animales controles con tratamiento simulado durante 15 días (15VD-), animales tratados con 1,25-(OH) $_2D_3$ a la dosis de 0,5 μ g/kg/día durante 15 días (15VD+), animales con tratamiento simulado y con diabetes experimental inducida por estreptozotocina a partir del 8º día del tratamiento (15VD-7ST+) y por último, de animales tratados con 1,25-(OH) $_2D_3$ durante 15 días y con diabetes experimental inducida por estreptozotocina a partir del 8º día del tratamiento (15VD+7ST+). En la autorradiografía se muestra las dos principales especies de ARNm del IR, representando los tamaños al margen. **B)** Lecturas desintométricas normalizadas con los respectivos valores de ARNr 28 S y expresadas en unidades arbitrarias relativas al valor 100 dado a cada una de las especies del ARNm del IR en el grupo 15 VD- (Medias \pm SEM).

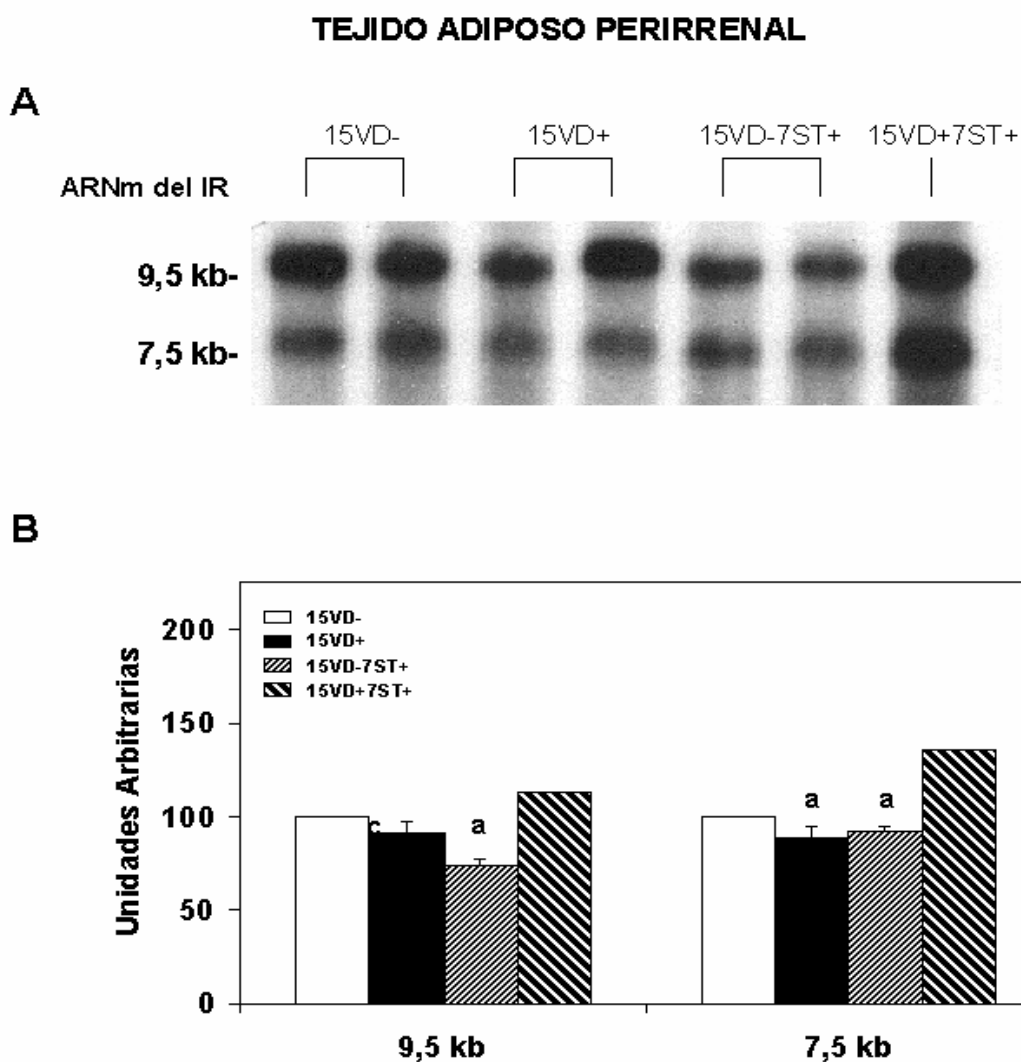
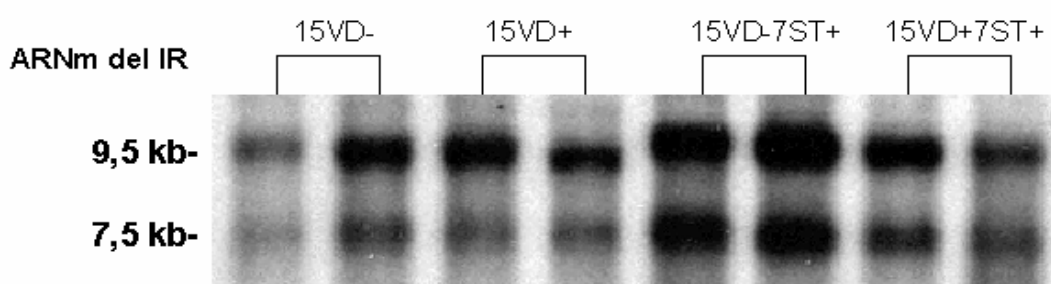


Figura 11. Efecto del tratamiento con la 1,25-dihidroxitamina D_3 sobre los niveles de ARNm del receptor de insulina en el tejido adiposo perirrenal de ratas sin o con diabetes experimental inducida por la estreptozotocina. A) Análisis *Northern* de muestras de 40 μg de ARN total extraído de animales controles con tratamiento simulado durante 15 días (15VD-), animales tratados con la 1,25-(OH) $_2D_3$ a la dosis de 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, durante 15 días (15VD+), animales con tratamiento simulado y con diabetes experimental inducida por estreptozotocina a partir del 8 $^\circ$ día del tratamiento (15VD-7ST+) y por último, de animales tratados con 1,25-(OH) $_2D_3$ durante 15 días y con diabetes experimental inducida por estreptozotocina a partir del 8 $^\circ$ día del tratamiento (15VD+7ST+). En la autorradiografía se muestran las dos principales especies de ARNm del IR con sus tamaños al margen. **B)** Lecturas desintométricas normalizadas con los respectivos valores de ARNr 28 S y expresadas en unidades arbitrarias relativas al valor 100 dado a cada una de las especies del ARNm del IR en el grupo 15VD- [Medias \pm SEM, ^a $p < 0,05$ (Cada uno de los grupos) vs. (15VD-)]

TEJIDO ADIPOSO EPIDIDIMAL

A



B

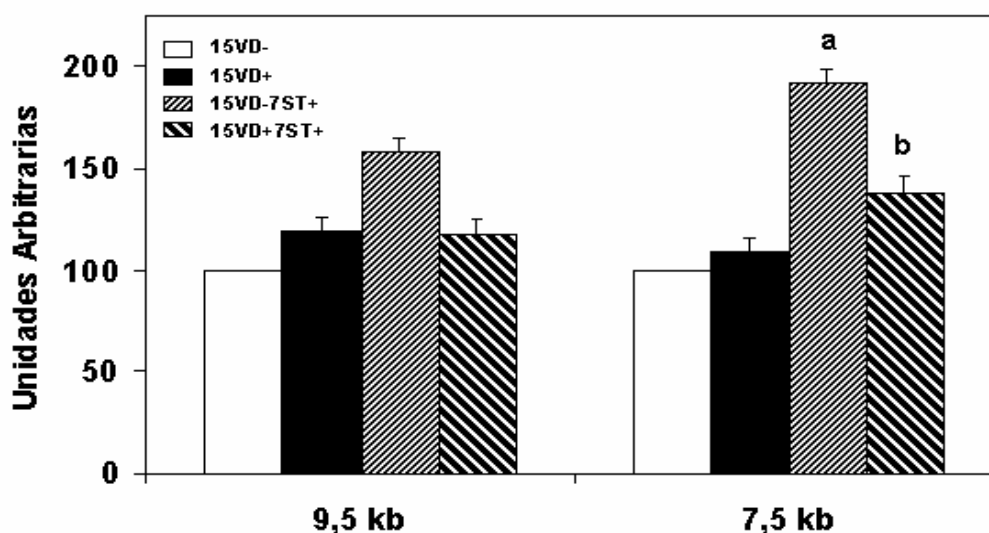


Figura 12. Efecto del tratamiento con la 1,25-dihidroxitamina D_3 sobre los niveles de ARNm del receptor de insulina en el tejido adiposo epididimal de ratas sin o con diabetes experimental inducida por la estreptozotocina. **A)** Análisis *Northern* con 40 μ g de muestras de ARN total extraído de animales controles con tratamiento simulado durante 15 días (15VD-), animales tratados con 1,25-(OH) $_2D_3$ a la dosis de 0,5 μ g/kg/día durante 15 días (15VD+), animales con tratamiento simulado y con diabetes experimental inducida por estreptozotocina a partir del 8º día del tratamiento (15VD-7ST+) y por último, de animales tratados con 1,25-(OH) $_2D_3$ durante 15 días y con diabetes experimental inducida por estreptozotocina a partir del 8º día de tratamiento (15VD+7ST+). En la autorradiografía se muestran las dos especies de ARNm del IR con sus tamaños al margen. **B)** Lecturas desintométricas normalizadas con los respectivos valores de ARNr 28 S y expresadas en unidades arbitrarias relativas al valor 100 dado a cada una de las especies en el grupo 15VD- [Media \pm SEM, están representadas las diferencias estadísticas ^a $p < 0,05$ (Cada uno de los grupos) vs. (15VD-), ^b $p < 0,05$ (15VD+7ST+) vs. (15VD-7ST+)]

1.1 f) Regulación de la unión de la insulina a su receptor en adipocitos aislados del tejido adiposo epididimal

Dado que el tejido adiposo epididimal de ratas diabéticas parecía afectado por la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ y que nuestro laboratorio tenía experiencia previa en el aislamiento y manejo de estas células, para los estudios de receptores de insulina y sus actividades biológicas procedimos a utilizar este tejido.

El análisis de *Scatchard* (Figura 13A) indicó que el tratamiento con la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ a ratas no diabéticas indujo un incremento en la unión de la insulina a su receptor en la zona de baja afinidad de la curva. El número total de receptores resultó incrementado en un 39% (15VD+ (n=4): 153118 ± 39354 receptores/célula vs. 15VD- (n=3): 109941 ± 31193 receptores/célula) pero la diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa. En cuanto a la afinidad del receptor reflejada por el valor de la ED_{50} de las curvas de desplazamiento (Figura 13B) no resultó afectada por el tratamiento [ED_{50} (10^{-9} M) (15VD+ (n=4): $4,2 \pm 1,4$ vs. 15VD- (n=3): $3,4 \pm 0,5$)]. La diabetes experimental inhibió la unión de la insulina a su receptor reflejada en la zona de baja afinidad de la curva (Figura 13A). El número total de receptores resultó decrecido en un 60% (15VD-7ST+ (n=4): 44475 ± 6348 receptores/célula vs. 15VD- (n=3): 109941 ± 31193 receptores/célula). En cuanto a la afinidad del IR obtenida por el valor de la ED_{50} de las curvas de desplazamiento (Figura 13B) no se vio modificada por la diabetes [ED_{50} (10^{-9} M) (15VD-7ST+ (n=4): $3,7 \pm 1,4$ vs. 15VD- (n=3): $3,4 \pm 0,5$)]. El tratamiento con la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ a ratas diabéticas revirtió la disminución en la unión de la insulina a su receptor provocada por la diabetes, incrementando el número de receptores totales en un 159% (15VD+7ST+ (n=5): 115048 ± 42679 receptores/célula vs.

15VD-7ST+ (n=4): 44475 ± 6348 receptores/célula), aunque de nuevo la diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa. La afinidad de los IRs de este grupo de ratas (15VD+7ST+) con respecto a ratas diabéticas (15VD-7ST+) tampoco fue alterada por el tratamiento con la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ [ED_{50} (10^{-9} M) (15VD+7ST+ (n=5): $4,8 \pm 0,9$ vs. 15VD-7ST+ (n=4): $3,7 \pm 1,4$)].

Dado que, como se indicó en el apartado 1.1 d) de características tisulares, en nuestro estudio detectamos una disminución tanto en el peso del tejido adiposo epididimal como en el tamaño de los adipocitos de ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina, quisimos corregir el número de IRs antes indicados por célula, ahora por unidad de superficie (μm^2), teniendo así en cuenta el diámetro de los adipocitos. De esta forma obtuvimos que el tratamiento con la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ a ratas no diabéticas incrementó el número de receptores por superficie en un 36% (15VD+ (n=4): $19 \pm 4,8$ receptores/ μm^2 vs 15VD- (n=3): $14 \pm 3,9$ receptores/ μm^2). La diabetes experimental disminuyó el número de receptores/ μm^2 en un 21% (15VD-7ST+ (n=4): $11 \pm 1,5$ receptores/ μm^2 vs 15VD- (n=3): $14 \pm 3,9$ receptores/ μm^2) pero la diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa, mientras que el tratamiento con la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ a ratas diabéticas revirtió la disminución del número de receptores/ μm^2 causada por la diabetes incrementándolos en un 109% (15VD+7ST+ (n=5): $23 \pm 8,4$ receptores/ μm^2 vs. 15VD-7ST+ (n=5): $11 \pm 1,5$ receptores/ μm^2), aunque ninguna de las diferencias fueron estadísticamente significativas.

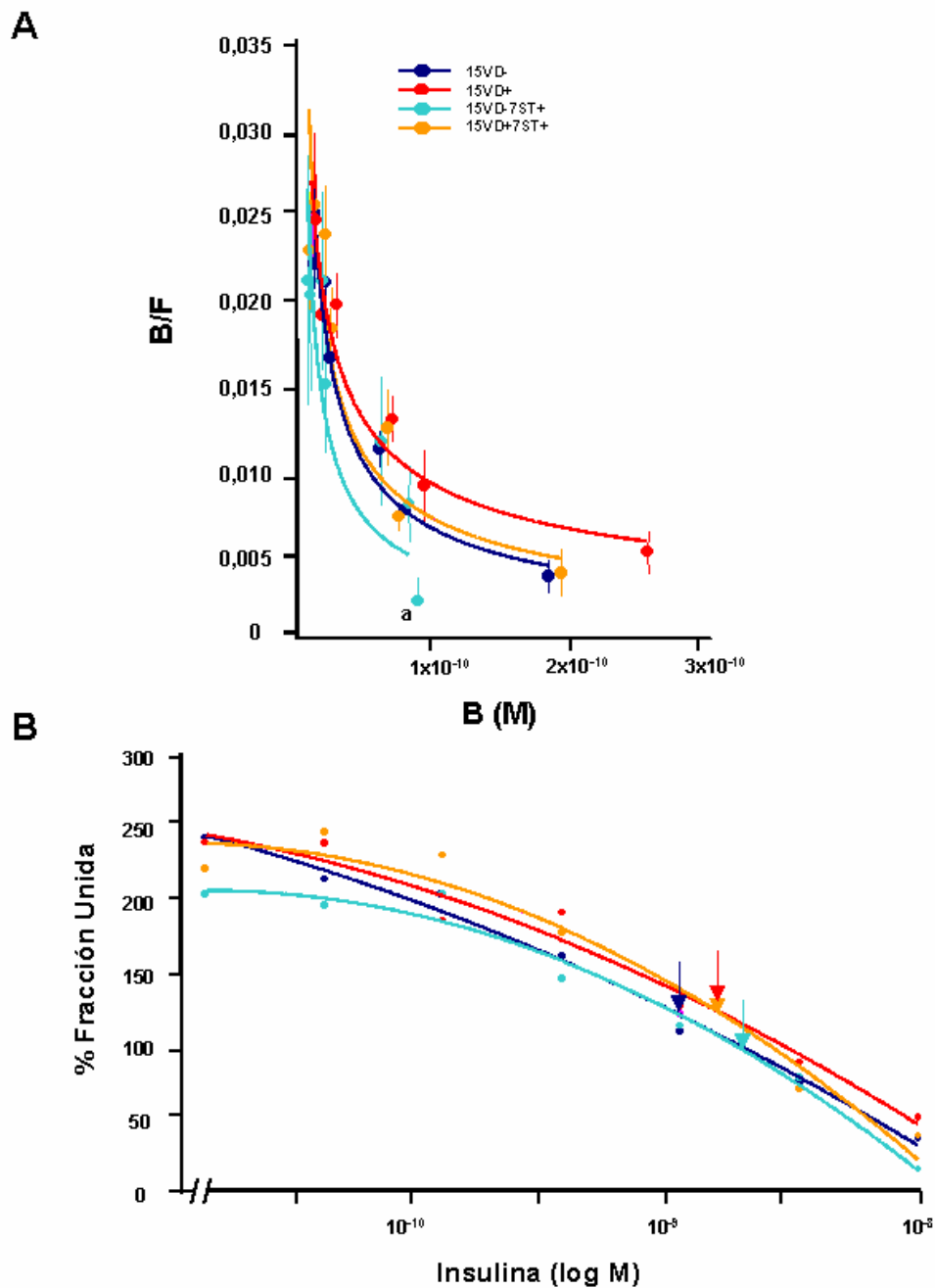


Figura 13. Efecto del tratamiento con la 1,25-dihidroxitamina D₃ sobre la unión de la insulina a sus receptores en ratas sin o con diabetes experimental inducida por la estreptozotocina. **A)** Análisis de *Scatchard* del desplazamiento de la unión de la insulina a sus receptores por concentraciones crecientes de la hormona fría en los cuatro grupos de ratas en estudio. **B)** Curvas de desplazamiento de la unión de la insulina a su receptor, indicando mediante flechas las correspondientes cantidades de insulina fría requeridas para disminuir al 50% la máxima unión específica (ED₅₀) en cada uno de los grupos de ratas [Media ± SEM, ^a p<0,05 (Cada uno de los grupos) vs. (15VD-)].

1.1 g) Regulación del transporte de glucosa basal e inducido por insulina en adipocitos aislados del tejido adiposo epididimal

Una vez estudiado el efecto del tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ a nivel de ARN y de proteína procedimos a analizar si este tratamiento pudiese afectar a alguna actividad biológica de la insulina. Los valores del transporte de glucosa basal y estimulado por insulina en adipocitos, provenientes de cada uno de los cuatro grupos de ratas en estudio, están indicados en la Tabla 8. Según nuestros datos previos, la concentración de insulina 10⁻⁷ M es la idónea para conseguir la máxima respuesta en el transporte de glucosa. Nuestros resultados indicaron que el transporte basal de glucosa en ausencia de insulina no se vio modificado en ratas no diabéticas tratadas con 1,25-(OH)₂D₃. En ratas diabéticas, el transporte de glucosa basal disminuyó significativamente en un 59% y esta disminución no fue revertida cuando las ratas diabéticas fueron tratadas con 1,25-(OH)₂D₃ (Tabla 8).

En lo referente al transporte de glucosa estimulado por insulina, se observó que en ratas no diabéticas el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ no alteró esta actividad, mientras que en ratas diabéticas se observó un decremento significativo (87%) que no fue alterado cuando a las ratas diabéticas se les trató con la 1,25-(OH)₂D₃.

Debido a la reducción del diámetro de adipocitos causado por la diabetes corregimos el transporte de glucosa por unidad de superficie (Tabla 8). Pudiendo comprobar que el transporte basal no se vio modificado ni por los tratamientos con la 1,25-(OH)₂D₃ ni por la diabetes, mientras que el transporte de glucosa

estimulado por la insulina a la concentración de 10^{-7} M sí que fue significativamente disminuido por la diabetes.

Tabla 8: Transporte de glucosa basal y estimulado por insulina a la concentración de 10^{-7} M en adipocitos aislados del tejido adiposo epididimal de las ratas de los cuatro grupos en estudio.

	15VD- (n=7)	15VD+ (n=7)	15VD-7ST+ (n=7)	15VD+7ST+ (n=8)
Transporte basal (fmol/min x 10^6 células)	91 ± 13	91 ± 14	37 ± 10 ^a	45 ± 10 ^a
Transporte estimulado (fmol/min x 10^6 células)	555 ± 71	479 ± 81	70 ± 21 ^a	78 ± 18 ^a
Transporte basal/superficie (fmol/min x μm^2) ($\times 10^{-9}$)	11 ± 1,6	11 ± 1,7	9,0 ± 2,2	8,8 ± 2,0
Transporte estimulado/superficie (fmol/min x μm^2) ($\times 10^{-9}$)	70 ± 8,9	58 ± 9,8	15 ± 4,4 ^a	15 ± 3,5 ^a

Los valores son las medias \pm SEM del número de experimentos indicado entre paréntesis. Están representadas las diferencias estadísticas que siguen: ^a $p < 0,05$ (Cada uno de los grupos) vs. (15VD-)

1.1 h) Regulación de la oxidación de glucosa basal e inducida por insulina en adipocitos aislados del tejido adiposo epididimal

Continuamos con el estudio de otra actividad biológica de nuestro interés, la oxidación de glucosa basal y estimulada por insulina a la concentración de 10^{-7} M en los cuatro grupos de ratas. Según está indicado en la tabla 9, el tratamiento con 1,25-(OH)₂D₃ a ratas no diabéticas no alteró la oxidación de glucosa basal. La diabetes experimental indujo un significativo descenso del 96% en esta actividad basal, cuando a las ratas diabéticas se les trató con 1,25-(OH)₂D₃ no revirtió el descenso de la oxidación de glucosa basal provocado por la diabetes.

Con relación a la oxidación de glucosa estimulada por insulina (Tabla 9), el tratamiento con 1,25-(OH)₂D₃ a ratas no diabéticas indujo un incremento de la oxidación de glucosa, que no llegó a ser estadísticamente significativo. La diabetes experimental provocó una significativa inhibición en esta actividad y el tratamiento con 1,25-(OH)₂D₃ a ratas diabéticas no alteró esta inhibición.

Al igual que en los anteriores análisis, quisimos corregir esta actividad teniendo en cuenta la superficie de los adipocitos. En estas condiciones los resultados obtenidos en los distintos grupos fueron similares a los relatados anteriormente (Tabla 9).

Tabla 9: Oxidación de glucosa basal y estimulada por insulina 10⁻⁷ M en adipocitos aislados del tejido adiposo epididimal de las ratas de los cuatro grupos en estudio.

	15VD- (n=2)	15VD+ (n=2)	15VD-7ST+ (n=4)	15VD+7ST+ (n=6)
Oxidación basal (fmol/min x 10 ⁶ células)	430 ± 126	408 ± 89	19 ± 3,8 ^a	30 ± 6,2 ^a
Oxidación estimulada (fmol/min x 10 ⁶ células)	1700 ± 528	2894 ± 414	34 ± 7,4 ^a	44 ± 8,1 ^a
Oxidación basal/superficie (fmol/min x μm ²) (x 10 ⁻⁹)	54 ± 16	50 ± 11	4,4 ± 0,9 ^a	6,0 ± 1,2 ^a
Oxidación estimulada/superficie (fmol/min x μm ²) (x 10 ⁻⁹)	213 ± 66	352 ± 50	8,1 ± 1,8 ^a	8,8 ± 1,6 ^a

Los valores son las medias ± SEM del número de experimentos indicado entre paréntesis. Solo están representadas las diferencias estadísticas que siguen: ^a p<0,05 (Cada uno de los grupos) vs. (15VD-)

2. ESTUDIOS IN VITRO

2.1. Regulación por la 1,25-dihidroxitamina D₃ de la expresión del gen de su propio receptor

En primer lugar se procedió a determinar la posible modulación de la expresión del gen del VDR por su propio ligando tratando a las células U-937 con 1,25-(OH)₂D₃ a la concentración de 10⁻⁸ M durante 24 h o a la concentración de 10⁻⁶ M durante 8 h. Los ensayos *Northern* con una sonda específica del ARNm del VDR humano indicaron la presencia en estas células de una sola especie de ARNm con un tamaño de 4,6 kb (Figura 14). Ambos tratamientos incrementaron la expresión del gen del VDR con relación a controles, en el orden de un 40% cuando el tratamiento fue durante 24 h a la concentración de 10⁻⁸ M y del 30% cuando el tratamiento fue durante 8 h a la concentración de 10⁻⁶ M. A partir de estos resultados, para los siguientes estudios elegimos la concentración mas baja (10⁻⁸ M) y el tiempo más largo (24 h).

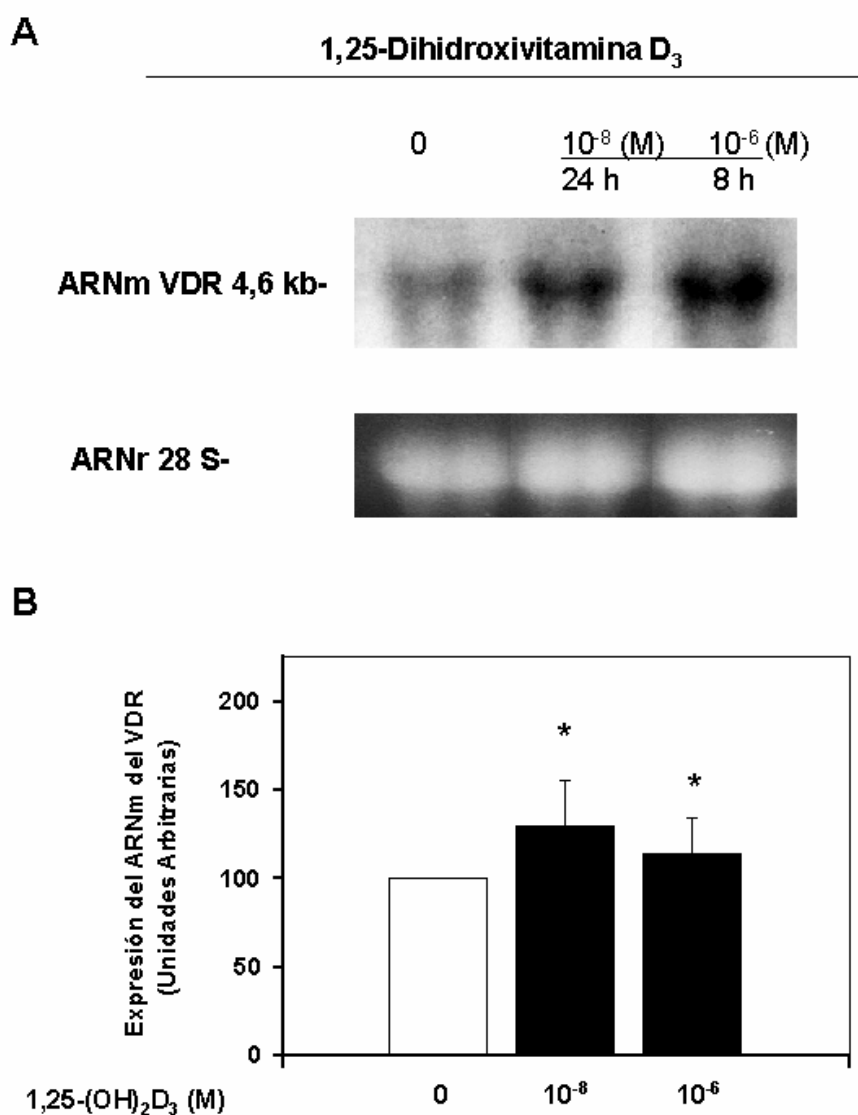


Figura 14. Expresión del gen del receptor de la 1,25-dihidroxitamina D₃ en las células U-937 tratadas con 1,25-dihidroxitamina D₃ a 10^{-8} M durante 24 h o a 10^{-6} M durante 8 h con respecto a ratas controles. A) Autorradiografía de un ensayo *Northern* representativo indicando el tamaño en kb del ARNm del VDR. Como control de carga se muestran los correspondientes ARNr de 28 S revelados por bromuro de etidio. **B)** Lecturas densitométricas de tres experimentos *Northern* realizados independientemente y normalizados con sus respectivos valores ARNr de 28 S. Los ARNm fueron expresados en unidades arbitrarias al valor 100 de las células controles (Media \pm SEM, * $p < 0,05$)

2.2. Regulación por la 1,25-dihidroxitamina D₃ de la proteína de su propio receptor

2.2 a) Por estudios de unión

Dado que la expresión del gen del VDR por la 1,25-(OH)₂D₃ resultó ser positiva, se prosiguió en el estudio realizando ensayos de unión de la 1,25-(OH)₂D₃ a su receptor para ver si esta hormona también incrementaba los niveles de esta proteína receptora.

El análisis de *Scatchard* (Figura 15) indicó la presencia de una única clase de VDR de alta afinidad (Kd: 3×10^{-9} M) y con una capacidad de 13000 sitios por célula. El tratamiento con 1,25-(OH)₂D₃, a la concentración de 10^{-8} M durante 24 h disminuyó la unión de la hormona al VDR de forma drástica, tanto que fue imposible la realización de los análisis de desplazamiento y sólo se pudo valorar la máxima unión específica (Figura 15B). Esta disminución en la unión de la 1,25-(OH)₂D₃ a su receptor no parece ser consecuencia de un decremento de los sitios de unión por célula, sino más bien de una masiva ocupación de los receptores por la 1,25-(OH)₂D₃ exógena, introducida por el tratamiento, y por tanto al estar el receptor ocupado no puede unirse la hormona marcada. Esta dificultad técnica, también sufrida por otros autores (Olsson I, y col., 1983) es la que nos hizo utilizar la técnica que sigue en la determinación de la proteína del VDR y su regulación por la 1,25-(OH)₂D₃.

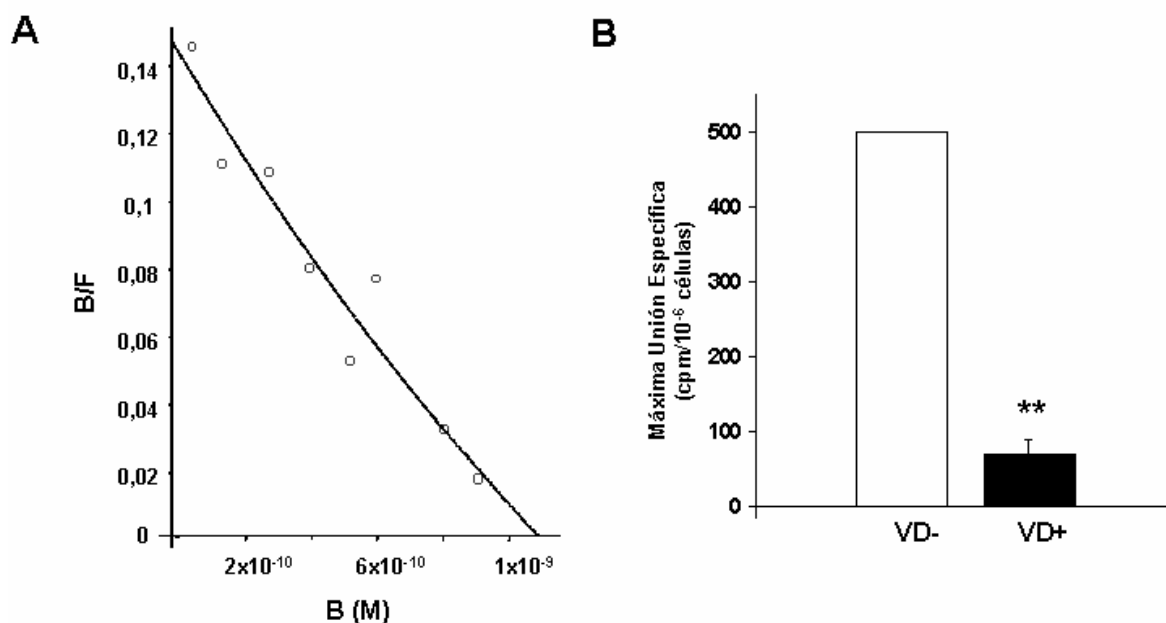


Figura 15. Unión de la 1,25-dihidroxitamina D₃ a sus receptores en las células U-937. A) Análisis *Scatchard* del desplazamiento de la unión de la 1,25-(OH)₂D₃ a sus receptores por concentraciones crecientes de la hormona fría en fracciones nucleares de células controles (n=4). **B)** Máxima unión específica de la 1,25-(OH)₂D₃ a sus receptores en fracciones nucleares de células controles (VD-) (n=6) y de células tratadas con la 1,25-(OH)₂D₃ a la concentración de 10⁻⁸ M durante 24 h (VD+) (n=3) (Media ± SEM, ** p<0,01).

2.2 b) Por *Western blot*

Mediante ensayos *Western blot* utilizando un anticuerpo monoclonal frente al VDR humano (9A7) (Pike JW, y col., 1982), se detectó la proteína del VDR con una masa molecular aproximada de 50 kDa (Figura 16A). Tras el tratamiento con 1,25-(OH)₂D₃ a la concentración de 10⁻⁸ M durante 24 h observamos un incremento del 40% en los niveles de esta proteína respecto a células controles (Figura 16B).

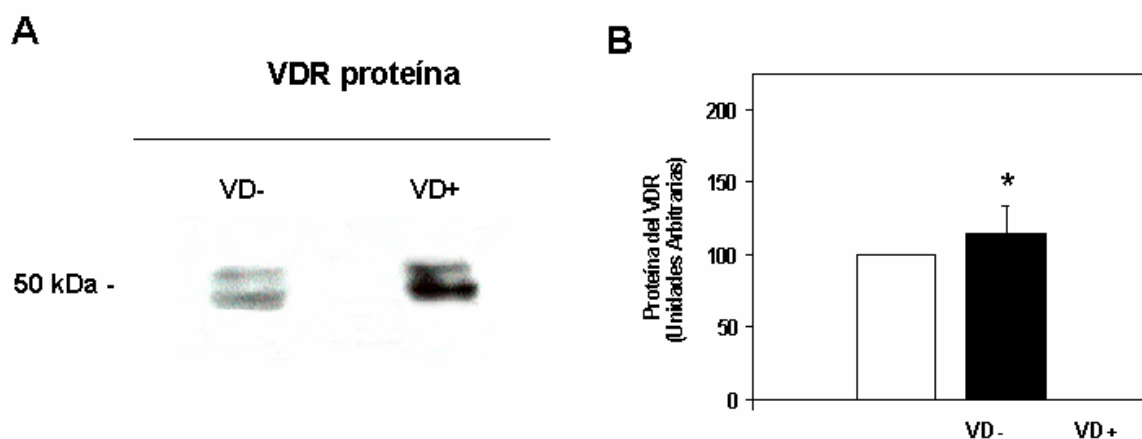


Figura 16. Análisis por *Western blot* de la expresión de la proteína del receptor de la 1,25-dihidroxitamina D₃ en las células U-937 tratadas con esta hormona. Extractos nucleares de células controles (VD-) y células tratadas (VD+) se sometieron a análisis por *Western blot* **A)** Autorradiografía de un experimento representativo, indicando en el margen el peso aproximado de la proteína del VDR en kDa. **B)** Lecturas desintométricas de tres experimentos. Los niveles de proteínas se expresan en unidades arbitrarias relativas al valor 100 dado a las células controles (Media \pm SEM, * $p < 0,05$).

2.3. Regulación de la expresión del gen del receptor de insulina por la 1,25-dihidroxitamina D₃

Para determinar si los efectos inducidos por 1,25-(OH)₂D₃ en su receptor, tanto al nivel de ARNm como al nivel de proteína, podrían asociarse con una posible modulación del IR por esta hormona se realizaron ensayos *Northern*, empleando una sonda específica del ARNm del IR.

Como se aprecia en la Figura 17A, esta línea celular presentó las dos especies de ARNm predominantes con tamaños de 11 y 8,5 kb en concordancia con previos datos de nuestro laboratorio (Leal MA, y col., 1992; Leal MA, y col., 1996; Campión J, y col., 1999; Campión J, y col., 2002). La cantidad relativa entre las dos especies, expresadas como el cociente 11 kb/8,5 kb, fue de $1,13 \pm 0,03$. El tratamiento con concentraciones crecientes de 1,25-(OH)₂D₃ (desde 10^{-9} M

hasta 10^{-7} M) durante 24 h incrementó los niveles de ambas especies de ARNm del IR, alcanzando los máximos valores a la concentración de 10^{-8} M (80% la especie de 11 kb y 40% la especie de 8,5 kb) (Figura 17B). Por todo ello, en todos los experimentos que siguen a continuación a las células U-937 se les trató con 1,25-(OH)₂D₃ a la concentración de 10^{-8} M y durante 24 h.

2.4. Regulación de la unión de la insulina a su receptor por la 1,25-dihidroxitamina D₃

A continuación, se procedió a investigar si el incremento en los niveles del ARNm del IR producidos por el tratamiento con 1,25-(OH)₂D₃ pudiera estar acompañado de un aumento del IR a nivel de proteína. Para ello, se analizó si el tratamiento con 1,25-(OH)₂D₃ a 10^{-8} M durante 24 h alteró la unión de la insulina al IR.

El análisis de *Scatchard* (Figura 18A) indicó que el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ derivó en un incremento significativo del 80% en el número total de receptores de insulina (VD+ (n=5): 13400 ± 1600 sitios por células vs VD- (n=13): 25200 ± 5300 sitios por células). La afinidad del IR reflejada por el valor ED₅₀ de las curvas de desplazamiento (Figura 18B) no resultó modificada por el tratamiento [ED₅₀ (10^{-9} M) VD+ (n=5): $1,6 \pm 0,1$ vs VD- (n=13): $1,7 \pm 0,1$], Indicando que el incremento en la unión no se relacionaba con alteraciones en la afinidad de receptor.

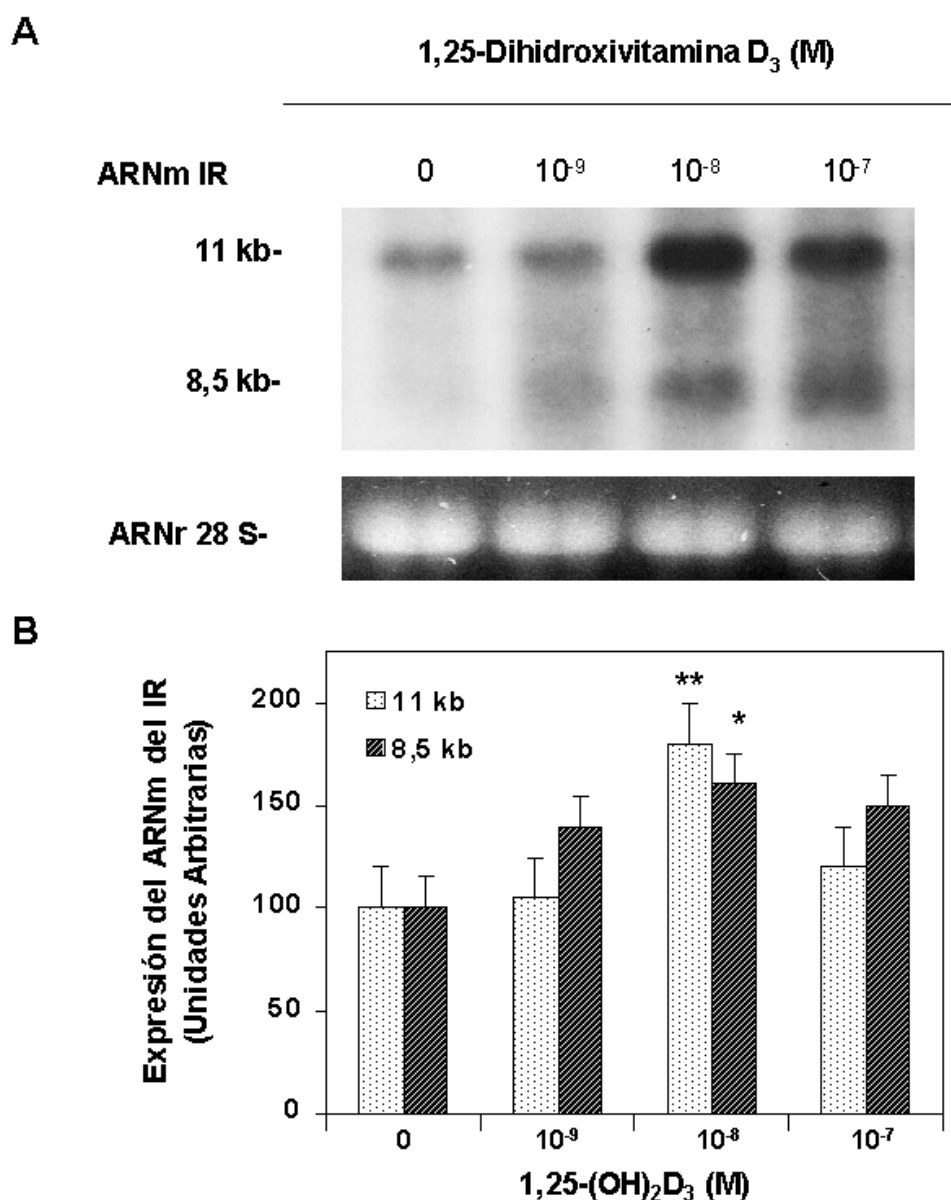


Figura 17. Efecto dosis-dependiente de la 1,25-dihidroxitamina D₃ sobre los niveles de ARNm del receptor de insulina en la línea U-937. Muestras de 30 µg de ARN total extraído de células controles (0) y de células tratadas durante 24 h con concentraciones crecientes de 1,25-(OH)₂D₃ fueron utilizadas en análisis *Northern*. **A)** Autorradiografía de un experimento dosis-dependiente en el que se muestra las dos principales especies de ARNm del IR, cuyo tamaño dado en kb está representado al margen. Como control de carga se muestra el ARNr 28 S teñido con bromuro de etidio. **B)** Lecturas desintométricas de tres experimentos realizados independientemente y normalizados con sus respectivos valores de ARNr 28 S. Los ARNm fueron expresados en unidades arbitrarias relativas al valor 100 de las células controles (Media ± SEM, * p<0,05, ** p<0,01).

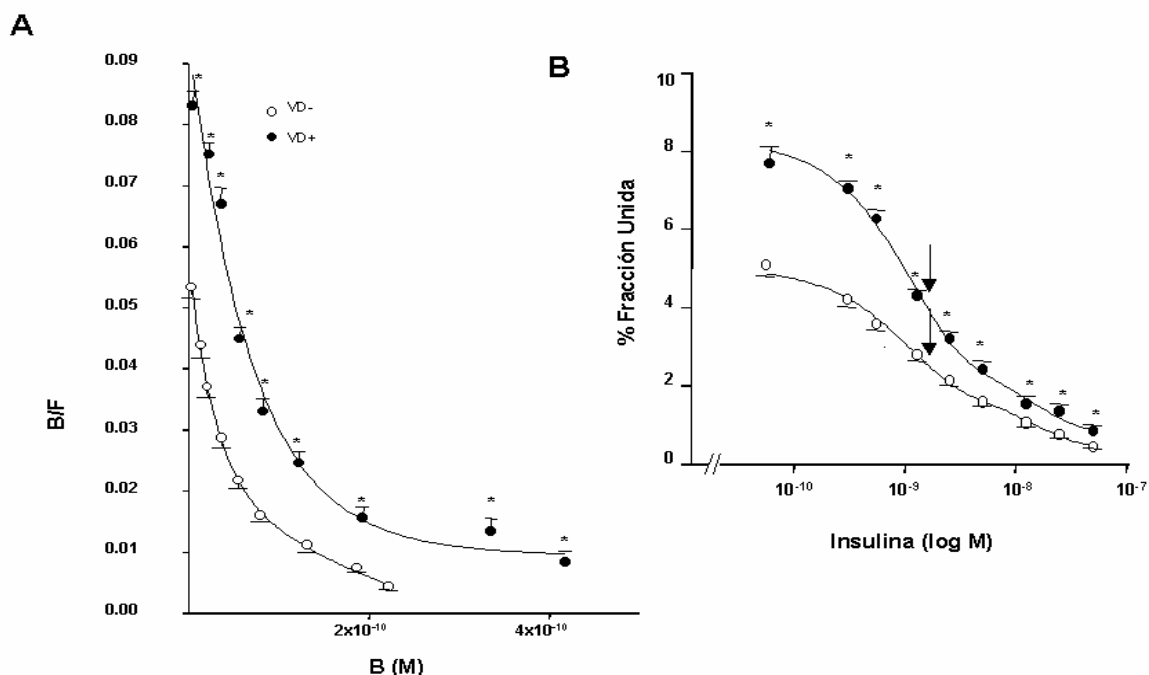


Figura 18. Unión de la insulina a su receptor en las células U-937 tratadas con la 1,25-dihidroxitamina D_3 a la concentración de 10^{-8} M durante 24 h (VD+) (n=5) con relación a controles (VD-) (n=13). **A**) Análisis de *Scatchard* del desplazamiento de la unión de la insulina a su receptor por concentraciones crecientes de la hormona fría en ambos grupos de células. **B**) Curvas de desplazamiento de la unión de la insulina a su receptor indicando mediante flechas las correspondientes cantidades de insulina fría requeridas para disminuir al 50% la máxima unión específica (ED_{50}) en cada grupo de células (Media \pm SEM, * $p < 0,05$).

2.5. Regulación de las respuestas biológicas de la insulina por la 1,25-dihidroxitamina D_3

2.5 a) Sobre el transporte de glucosa basal e inducido por insulina

Una vez demostrado que el tratamiento con 1,25-(OH) $_2D_3$ en la línea celular U-937 fue capaz de estimular al IR tanto a nivel del ARN como a nivel de proteína, procedimos a investigar si este efecto se viese acompañado por alteraciones en actividades biológicas de la insulina mediadas a través de este receptor. En primer lugar, se estudió el transporte de glucosa comparando la capacidad de la insulina por promover esta respuesta en células controles y tratadas con 1,25-(OH) $_2D_3$.

Nuestros resultados indicaron que el transporte basal de glucosa, en ausencia de insulina, no se vio alterado en células tratadas respecto a controles

(VD+ (n=11): 669 ± 26 fmol/min $\times 10^6$ células vs VD- (n=16): 599 ± 40 fmol/min $\times 10^6$ células) (Figura 19A). En la parte B de la figura 19 se encuentra recogido el transporte de glucosa estimulado por concentraciones crecientes de insulina en células controles y tratadas, sustraídos en todos los puntos los correspondientes valores basales. Se puede observar que concentraciones crecientes de insulina (de 10^{-11} a 10^{-7} M) estimularon el transporte de glucosa de forma dosis-dependiente, en ambos grupos de células. El tratamiento con la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ causó un claro incremento en esta respuesta a todas las concentraciones de insulina utilizadas y de forma estadísticamente significativa a partir de la concentración de 10^{-9} M. La máxima respuesta se obtuvo a la concentración de 10^{-8} M de insulina en ambos grupos, a esta concentración, el transporte de glucosa estimulado por insulina fue un 29% mayor en células tratadas que en células controles. La ausencia de alteración del valor ED_{50} [ED_{50} (10^{-9} M) VD+ (n=11): $0,07 \pm 0,01$ vs VD- (n=16): $0,06 \pm 0,01$] indicó que la sensibilidad de éstas células a la insulina no se vio modificada por el tratamiento con la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$.

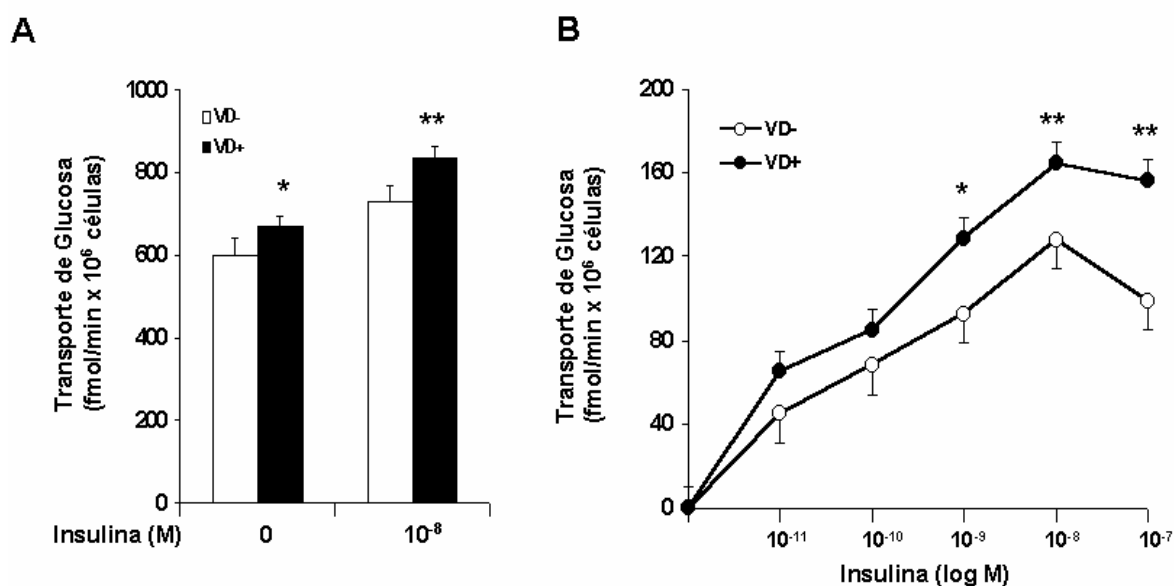


Figura 19. Regulación por la 1,25-dihidroxitamina D₃ del transporte de glucosa basal y estimulado por insulina en células U-937. A) Transporte de glucosa basal y estimulado por insulina a 10⁻⁸ M en células controles (VD-) (n=16) o tratadas con 1,25-(OH)₂D₃ a 10⁻⁸ M durante 24 h (VD+) (n=11). **B)** Curvas de respuestas a la insulina en células controles (VD-) y en células tratadas (VD+), se les ha sustraído el correspondiente valor basal (Media ± SEM, *p<0,05, **p<0,01)

También se examinó si la potenciación por la 1,25-(OH)₂D₃ del transporte de glucosa inducido por insulina pudiera estar asociada con la activación de la vía de señalización de la insulina al nivel de la enzima PI3-K (Carrascosa JM. y col., 1991; Kanai F, y col., 1993). Estos estudios se llevaron a cabo tanto en células tratadas como en células controles, en ausencia o presencia de wortmanina (un inhibidor de la PI3-K) (Skouteris GG, y col., 1996). Como se observa en la pequeña tabla 10 que sigue a continuación, la wortmanina a las concentraciones de 0,4 x 10⁻⁶ M ó 1 x 10⁻⁶ M no afectó a los niveles basales del transporte de glucosa en células tratadas ni en células controles.

Tabla 10: Transporte de glucosa basal (fmol/min x 10⁶ células)

WORTMANINA	VD-	VD+
0	599 ± 40 (n=16)	669 ± 26 (n=11)
0,4 x 10 ⁻⁶ M	550 ± 31 (n=6)	618 ± 22 (n=6)
1 x 10 ⁻⁶ M	596 ± 35 (n=6)	671 ± 28 (n=6)

Los valores son las medias ± SEM del número de experimentos indicado entre paréntesis.

Sin embargo, las dos concentraciones de wortmanina (0,4 y 1 x 10⁻⁶ M) inhibieron significativamente la respuesta máxima de transporte de glucosa a la concentración 10⁻⁸ M de insulina, en un 59% y un 57%, respectivamente en células controles y en un 57% y un 53% en tratadas (Figura 20).

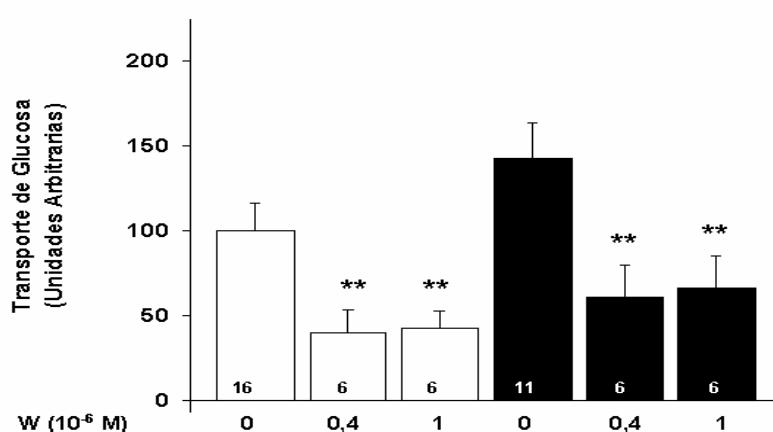


Figura 20. Efecto de la wortmanina (W) en el transporte de glucosa inducido por insulina a la concentración 10⁻⁸ M en células U-937. Células controles (VD-) o tratadas con 1,25-(OH)₂D₃ a 10⁻⁸ M durante 24 h (VD+), en ausencia (0) o presencia de W (0,4 x 10⁻⁶ y 1 x 10⁻⁶ M). A los valores del transporte de glucosa se les ha sustraído en cada caso el correspondiente valor basal. Los datos están expresados en unidades arbitrarias relativas al valor 100 dado al transporte de glucosa en ausencia de W en células controles. El número de experimentos está indicado en cada barra (Media ± SEM, ** p<0,01)

2.5 b) Sobre la oxidación de glucosa basal e inducida por insulina

Seguidamente, se procedió a analizar otra actividad biológica de la insulina como es la oxidación de glucosa. Nuestros resultados indicaron que la oxidación de glucosa en ausencia de insulina se vio incrementada en células tratadas (VD+

(n=11): $19 \pm 1,2$ fmol/min $\times 10^{-6}$ células vs VD- (n=16): $12 \pm 1,4$ fmol/min $\times 10^{-6}$ células) (Figura 21A). Concentraciones crecientes de insulina (desde 10^{-11} a 10^{-7} M) estimularon la oxidación de glucosa de forma dosis-dependiente (Figura 21B). La máxima respuesta se observó a la concentración de 10^{-7} M de insulina, siendo la respuesta un 60% mayor en células tratadas que en células controles (Figura 21B). El tratamiento no afectó al valor de la ED_{50} [ED_{50} (10^{-9} M) VD+ (n=11): $0,2 \pm 0,06$ vs VD- (n=16): $0,3 \pm 0,04$], lo que indicó que la sensibilidad de la célula a esta actividad biológica no se vio modificada por el tratamiento con la $1,25-(OH)_2D_3$.

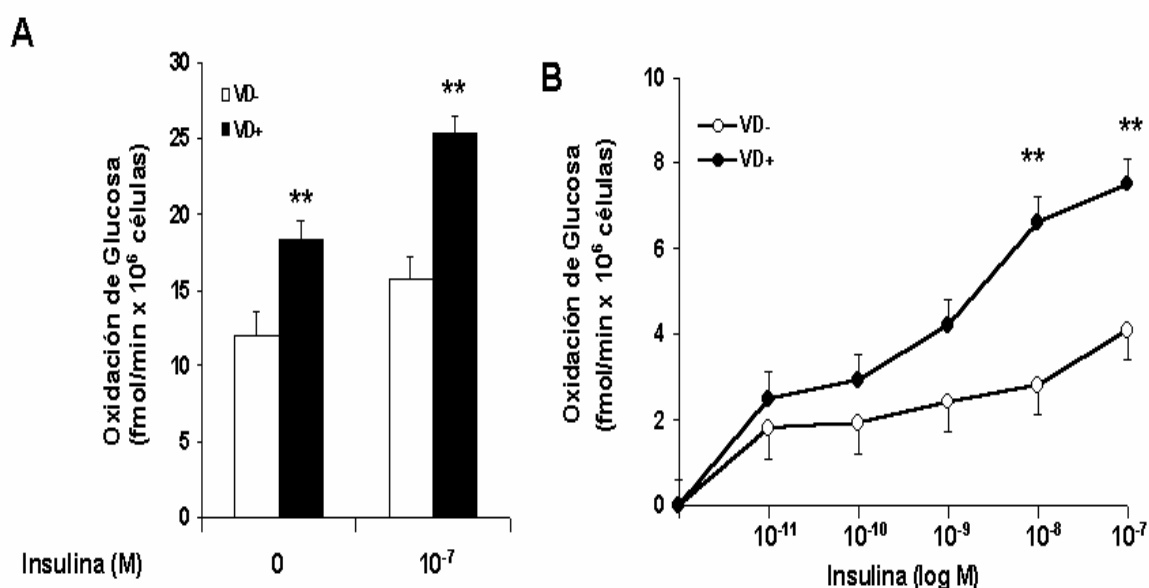


Figura 21. Regulación por la 1,25-dihidroxitamina D_3 de la oxidación de glucosa basal y estimulada por insulina en células U-937. A) Oxidación de glucosa basal y estimulada por insulina a 10^{-7} M en células controles (VD-) (n=16) y células tratadas con $1,25-(OH)_2D_3$ a la concentración de 10^{-8} M durante 24 h (VD+) (n=11). **B)** Curvas de respuesta a la insulina en células controles (VD-) o tratadas (VD+), se les ha sustraído el correspondiente valor basal (Media \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

También examinamos si la potenciación por la $1,25-(OH)_2D_3$ de la oxidación de glucosa en la línea celular U-937 pudiera estar asociada con la activación de la vía de señalización de la insulina al nivel de la enzima PI3-K (Kanai F, y col., 1993). Estos estudios se llevaron a cabo por mediciones de la oxidación de glucosa, tanto en células tratadas como en células controles, en ausencia o presencia de

wortmanina (Skouteris GG, y col., 1996). Estos estudios mostraron que la wortmanina a las concentraciones de $0,4 \times 10^{-6}$ M ó 1×10^{-6} M no afectó los niveles basales de oxidación de glucosa ni en células tratadas ni en controles, como se muestra en la tabla 11.

Tabla 11: Oxidación de glucosa basal (fmol/min x 10^6 células)

WORTMANINA	VD-	VD+
0	$12 \pm 1,4$ (n=16)	$19 \pm 1,2$ (n=11)
$0,4 \times 10^{-6}$ M	$11,3 \pm 0,1$ (n=6)	$17,5 \pm 0,8$ (n=6)
1×10^{-6} M	$11,6 \pm 0,2$ (n=6)	$18,1 \pm 2,0$ (n=6)

Los valores son las medias \pm SEM del número de experimentos indicado en paréntesis.

Sin embargo, las dos concentraciones de wortmanina, ($0,4$ y 1×10^{-6} M) inhibieron la respuesta máxima de oxidación de glucosa a la concentración 10^{-7} M de insulina en un 20% y un 40% respectivamente, en células controles y en un 30% y un 60% respectivamente, en tratadas (Figura 22).

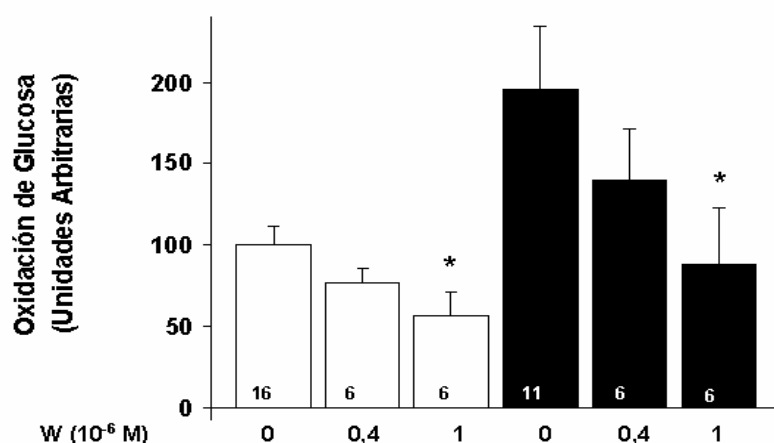


Figura 22. Efecto de la wortmanina en la oxidación de glucosa inducida por insulina a la concentración de 10^{-7} M en células U-937. Células controles (VD-) o tratadas con $1,25-(OH)_2D_3$ a 10^{-8} M durante 24 h (VD+), en ausencia (0) o presencia de W ($0,4 \times 10^{-6}$ y 1×10^{-6} M). A los valores de la oxidación de glucosa se les ha sustraído en cada caso el correspondiente valor basal, están representados como unidades arbitrarias relativas al valor 100 dado a la oxidación de glucosa en ausencia de W en células controles. El número de experimentos está indicado en cada

barra (Media \pm SEM, * $p < 0,05$). **2.5 c) Sobre la incorporación de timidina basal e inducida por insulina**

A continuación, procedimos a analizar el efecto de la 1,25-(OH)₂D₃ sobre la incorporación de timidina basal y estimulada por concentraciones crecientes de insulina en la línea celular U-937. El tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ redujo la incorporación de timidina a nivel basal (VD+ (n=13): 2372 \pm 184 cpm/min \times 10⁻⁶ células vs VD- (n=10): 2916 \pm 261 cpm/min \times 10⁻⁶ células) (Figura 23A). Concentraciones crecientes de insulina (desde 10⁻¹¹ hasta 10⁻⁷ M) ejercieron un efecto mitogénico dependiente de la dosis, tanto en células tratadas como en células controles. La máxima respuesta se obtuvo a la concentración de 10⁻⁷ M y fue un 60% menor en células tratadas que en células controles (Figura 23B). El valor de la ED₅₀ de células tratadas disminuyó significativamente, con respecto a las células controles [ED₅₀ (10⁻¹⁰ M) VD+ (n=13): 3,4 \pm 1,0 vs VD- (n=10): 9,3 \pm 3,2], lo que indicó una clara pérdida de sensibilidad de la célula al efecto mitogénico de la insulina provocada por el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃.

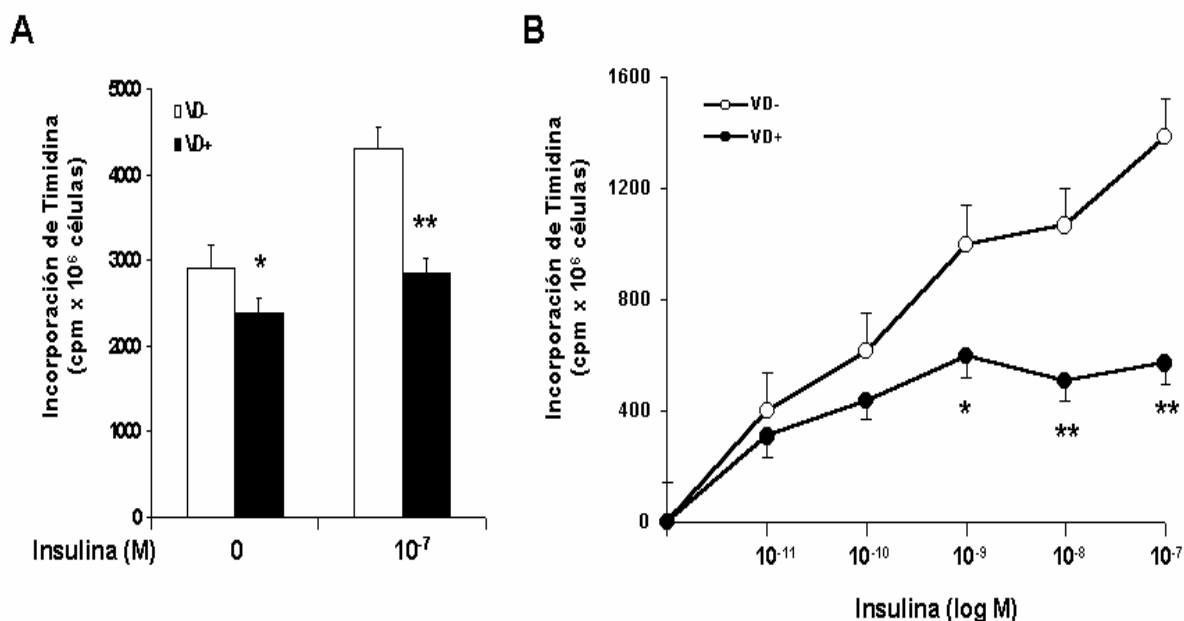


Figura 23. Regulación por la 1,25-dihidroxitamina D₃ de la incorporación de timidina basal y estimulada por insulina en células U-937. A) Incorporación de timidina basal y estimulada por insulina a la concentración de 10⁻⁷ M en células controles (VD-) (n=10) y células tratadas con 1,25-(OH)₂D₃ a 10⁻⁸ M durante 24 h (VD+) (n=13). **B)** Curvas de respuestas de la insulina sobre la incorporación de timidina en el ADN de células controles (VD-) o tratadas (VD+). A los valores de la incorporación se les ha sustraído el correspondiente valor basal (Media ± SEM, *p<0,05, **p<0,01).

2.6. Regulación de la actividad transcripcional del promotor del gen del receptor de insulina por la 1,25-dihidroxitamina D₃

Una vez investigado que la 1,25-(OH)₂D₃ a través de su propio receptor (VDR) fue capaz de modular positivamente la expresión del ARNm del IR, el número de IRs y estimular ciertas actividades biológicas de la insulina, quisimos profundizar más en el mecanismo por el cual la 1,25-(OH)₂D₃ fue capaz de inducir la expresión del gen del IR, intentando determinar si estos efectos tendrían lugar incrementando la actividad transcripcional del promotor del gen del IR. Para ello, se realizaron transfecciones transitorias en las células U-937 con plásmidos *reporter* que contenían el promotor del gen del IR.

Para monitorizar las transfecciones transitorias en estas células, inicialmente se transfectaron con el plásmido *reporter* pGL3-control, que como ya se describió en el apartado 13.1 de Materiales y Métodos, contenía un promotor y un *enhancer* del SV40 que le conferían una alta expresión de luciferasa en células transfectadas. Observamos que la actividad transcripcional de este plásmido medida en términos de luciferasa era aproximadamente 100 veces mayor que la actividad obtenida tras transfectar estas células con el plásmido pGL2-basic (carente de cualquier tipo de promotor o *enhancer*).

Se realizaron a continuación ensayos de transfección transitoria con el plásmido *reporter* pIR(1.5)-GL2 que tenía inserto el promotor del gen del IR desde -1819 hasta -271 pb, que de facto es considerado como el promotor entero (Lee JK, y col., 1994), dichos ensayos revelaron que la actividad transcripcional del promotor del IR fue alrededor de 400 % mayor que la del vector pGL2-basic. Cuando a las células transfectadas con el plásmido pIR(1.5)-GL2 se les trató con la 1,25-(OH)₂D₃ se indujo un incremento del 80% en la actividad transcripcional del promotor del IR (Figura 24). Además, para comprobar que el promotor del gen del IR poseía por si mismo actividad transcripcional constitutiva transfectamos las células con el plásmido pIR(1.5)-GL2 *antisense*, el cual llevaba inserto el promotor del IR en la orientación invertida. Como se esperaba, mediciones de luciferasa revelaron que este plásmido carecía de actividad transcripcional ya que sus valores fueron similares a los obtenidos en células transfectadas con el vector pGL2-basic.

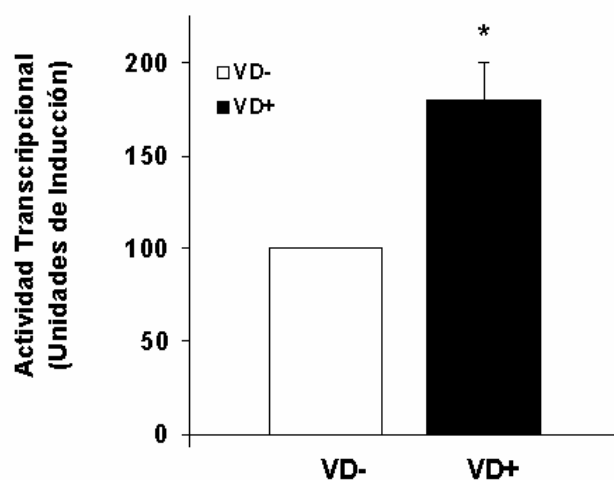


Figura 24. Efecto de la 1,25-dihidroxitamina D₃ sobre la actividad del promotor del gen del receptor de insulina humano en la línea celular U-937. Determinaciones de luciferasa en células controles (VD-) (n=7) y células tratadas con la 1,25-(OH)₂D₃ a 10⁻⁸ M durante 24 h (VD+) (n=5). Las células fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido pHIR(1.5)-GL2 que contenía el promotor del gen del IR entero. Los valores fueron expresados como unidades arbitrarias, dando el valor 100 a las células controles (Media ± SEM, *p<0,05).

Una vez demostrado que la 1,25-(OH)₂D₃ fue capaz de inducir la actividad transcripcional del promotor del gen del IR, nos propusimos localizar que parte de este promotor podía ser suficiente para llevar a cabo dicho efecto. Para ello, se realizaron diversas deleciones en el extremo 5' del promotor, según se indicó anteriormente en el apartado 13.1 de Materiales y Métodos, obteniéndose los siguientes plásmidos *reporter*:

- Plásmido: pHIR (-1473)-GL2: promotor desde -1473 hasta -271 pb.
- Plásmido: pHIR(-876)-GL2: promotor desde -876 hasta -271 pb.
- Plásmido: pHIR(-577)-GL2: promotor desde -577 hasta -271 pb.

Estos plásmidos fueron transfectados transitoriamente en células U-937, analizándose la capacidad de transcripción basal de cada una de las regiones

promotoras insertadas en ellos. Determinaciones por luciferasa revelaron que las actividades transcripcionales basales de estas regiones del promotor del gen del IR, arriba mencionadas, fueron de un 94%, 67% y 17% respectivamente, considerando el 100% la actividad transcripcional basal del promotor entero. El valor de la actividad transcripcional de la región mas pequeña tenía un valor similar al obtenido en transfecciones con el vector pGL2-basic, posiblemente por la eliminación en esta región de algunas de las cajas GC importantes para la transcripción del gen del IR, mencionadas en la Introducción. Por ello, el plásmido pIR(-577)-GL2 fue descartado para realizar los siguientes estudios de modulación de la actividad transcripcional por el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃.

A continuación, se realizaron estudios para observar como la 1,25-(OH)₂D₃ modulaba la actividad transcripcional de las distintas regiones del promotor del IR, antes analizados de forma basal. Los resultados de estos ensayos fueron los siguientes: a) La actividad del promotor entero se incrementó un 60% con respecto a su actividad promotora basal, b) la del fragmento deleccionado hasta -1473 pb se incrementó en un 70%, y c) la actividad del fragmento deleccionado hasta -876 pb aumentó un 60% (Figura 25). Estos resultados indicaron que la región desde -876 hasta -271 pb podría ser suficiente para la inducción de la actividad transcripcional de este promotor por la 1,25-(OH)₂D₃ y además sugirieron la posible presencia de VDRE(s) en esta región. Por todo ello, nuestro siguiente paso fue la localización de este(os) potencial(es) VDRE(s).

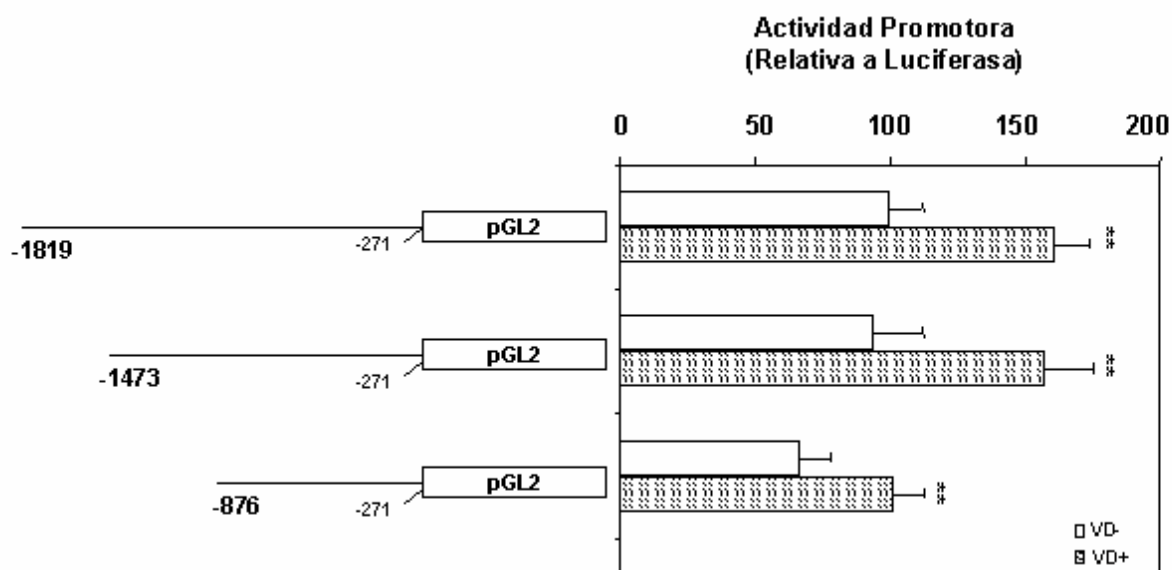


Figura 25. Efecto de la estimulación de la actividad transcripcional del promotor del gen del receptor de insulina humano y 5'-delecciones por la 1,25-dihidroxitamina D₃. Células U-937 fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido pHIR(1.5)-GL2 que contenía el promotor entero y con los plásmidos pHIR(-1473)-GL2 y pHIR(-876)-GL2 que contenían el promotor deleccionado en la zona 5' (hasta el pb -1473 y -876, respectivamente). Las células transfectadas no se trataron (VD-) (n=7) o se trataron con 1,25-(OH)₂D₃ a 10⁻⁸ M durante 24 h (VD+) (n=7). La actividad luciferasa está expresada en unidades arbitrarias asignando el valor 100 al promotor entero en células no tratadas, después de corregir la eficiencia de transfección. (Media ± SEM, **p< 0,01).

2.7 Estudio de la unión del receptor de la 1,25-dihidroxitamina D₃ a potenciales VDREs en el promotor del gen del receptor de insulina

Inicialmente seleccionamos por análisis computerizado, según se indica en el apartado 14 de Materiales y Métodos, una secuencia VDRE consenso con el fin de identificar posibles secuencias VDREs. Esta secuencia consenso (5'GGGTCA_nGGGGCA3') fue consensuada partiendo de secuencias VDREs, funcionales en distintos genes regulados por la 1,25-(OH)₂D₃, publicadas por otros autores: Demay MB, y col., 1992; Ozono K, y col., 1990; Colnot S, y col., 1995; Christakos S, y col., 1996; Ohyama Y, y col., 1996; Zou A, y col., 1997; Haussler MR, y col., 1998; Koszewski NJ, y col., 2000. Esta secuencia consenso tenía gran

similitud con el VDRE del promotor de la osteocalcina humana: 5'GGGTGAACGGGGCA3' (Ozono K, y col., 1990). Ambas secuencias tenían idénticas mitades del elemento 3', coincidían en el espaciador y sólo se diferenciaban en que presenta una citosina (C) en lugar de una guanina (G) en la mitad del elemento 5'. Por ello, a continuación se llevó a cabo un control positivo de la unión VDR-ADN por retardo en gel utilizando como sonda el oligonucleótido que contenía un VDRE del promotor del gen de la osteocalcina humana, denominado hOC (apartado 14.1 de Materiales y Métodos) (5'**TTGGT**ACTCAC**CGGGT**GAAC**GGGGGCATT**3'). Para la realización de dicho análisis se utilizaron extractos nucleares de células controles y de células tratadas con 1,25-(OH)₂D₃. La susodicha secuencia incluye dos elementos de respuesta al factor transcripcional AP-1, que se han indicado en letras negritas, uno estaba situado *upstream* de la mitad del elemento 5' del VDRE (Ozono K, y col., 1990) y el otro se encontraba en medio del VDRE solapándole (Aslam F, y col., 1999). En la figura 26 podemos observar la formación de dos complejos obtenidos a través de ensayos de retardo en gel, el complejo superior correspondería al complejo formado por un AP-1 unido a su sitio de unión y el complejo inferior correspondería al complejo formado por el VDR* unido al VDRE en coincidencia con otros autores (Botling J, y col., 1996; Aslam F, y col., 1999). En las calles en las que se emplearon extractos nucleares de células tratadas con la 1,25-(OH)₂D₃ se puede observar un incremento de la intensidad de los complejos debida al tratamiento con la hormona, también podemos ver que la adición de un exceso (50x y 200x) de oligonucleótido no marcado abolió ambos complejos, mientras que la adición en exceso (100x) de un oligonucleótido no relacionado fue incapaz de competir con

ellos. La formación del complejo correspondiente al VDR se vio eficientemente bloqueada por el anticuerpo monoclonal anti-VDR 9A7, sin embargo, este complejo no sufrió ninguna alteración cuando se le adicionó un suero no-inmune. De esta forma, como se esperaba, esta secuencia fue capaz de unir el VDRE a los VDR de los extractos nucleares de las células U-937, confirmando la viabilidad de nuestra metodología.

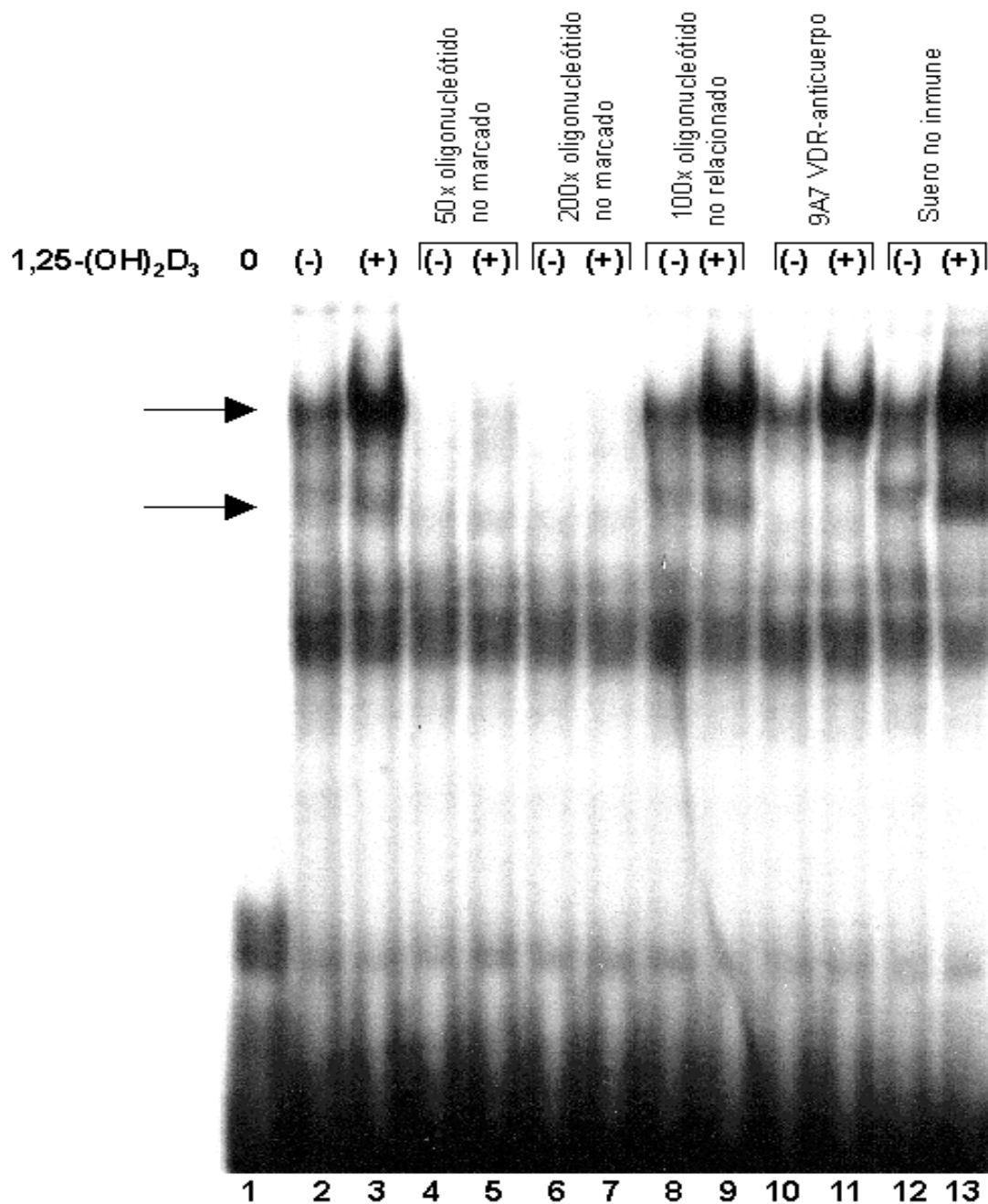


Figura 26. Control positivo de la unión del receptor de la vitamina D₃ (VDR) a secuencias de ADN analizado por retardo en gel. Extractos nucleares de células U-937, no tratadas y tratadas con 1,25-(OH)₂D₃ a la dosis de 10⁻⁸ M durante 24 h, se incubaron con el oligonucleótido marcado con idéntica secuencia a la región del promotor del gen de la osteocalcina humana desde -512 hasta -483 pb. Esta secuencia contiene un elemento de respuesta a la vitamina D (VDRE) y una secuencia AP-1 *upstream* del VDRE. **Calle 1:** no contiene extractos nucleares; **calle 2:** extractos nucleares de células no tratadas; **calle 3:** extractos nucleares de células tratadas; **calles 4 y 5:** 50x exceso de oligonucleótido no marcado; **calles 6 y 7:** 200x exceso de oligonucleótido no marcado; **calles 8 y 9:** 100x exceso de oligonucleótido no relacionado; **calles 10 y 11:** 1 µl de anti-VDR monoclonal anticuerpo 9A7; **calles 12 y 13:** 1 µl de suero no inmune. Las flechas indican la formación de un complejo VDR (la inferior) y un complejo AP-1 (superior).

A continuación se efectuó una búsqueda computerizada de secuencias candidatas a VDREs por homología con el VDRE consenso arriba descrito, en la región desde -876 hasta -271 pb del promotor del gen del IR, que hemos demostrado ser suficiente para el efecto transcripcional de la 1,25-(OH)₂D₃. Los resultados de esta búsqueda indicaron que en esta región no existían secuencias idénticas a este VDRE consenso, ni tampoco secuencias con 1, 2, 3, o 4 bases diferentes a la del consenso, sin embargo sí que pudimos detectar 10 secuencias que contenían 5 variaciones (Tabla 12). Comparando la mitad del elemento 3' de cada una de estas secuencias con la mitad del elemento 3' del consenso, no se pudo observar en ningún caso una homología completa, pero las primeras 5 bases (comenzando a contar de izquierda a derecha) fueron idénticas en las siguientes secuencias: -500/-486, -620/-606, -625/-611, -722/-708, -758/-744 y de éstas, sólo las secuencias: -620/-606, -625/-6011, -758/-744 tenían en la sexta base una purina, mientras que las secuencias: -500/-486, -722/-708 tenían una pirimidina. Dado que la sustitución de una purina por otra purina es más favorable espacialmente que una purina por una pirimidina y que la presencia de una pirimidina en la posición 6 de la mitad del elemento 3' de un VDRE puede conferirle respuestas negativas a 1,25-(OH)₂D₃ (Liu SM, y col., 1996), decidimos centrarnos sólo en las secuencias -620/-606, -625/-611, -758/-744 e investigarlas como potenciales VDREs.

Tabla 12. Secuencias del promotor del gen del receptor de insulina humano con 5 variaciones con respecto a la secuencia VDRE consenso (GGGTCAⁿⁿⁿGGGGCA), halladas utilizando el programa de búsqueda de secuencias SEQFIND.

Extremo 5'	SECUENCIA	Extremo 3'
-500	GGCCCGcacGGGGCC	-486
-607	CGGGACcggGCGGCA	-593
-616	GGGGCGgggCGGGAC	-602
-620	GGGCGGggcGGGGCG	-606
-625	GAGGCGggcGGGGCG	-611
-705	AGGGCGcgcGGATCT	-691
-712	GGGCTGtagGGCGCG	-698
-722	AGGAGActcGGGGCT	-708
-746	GCGCCTccgGGGGTC	-732
-758	CGGGCCtgtGGGGCG	-744

Cuando exploramos más a fondo el entorno de las secuencias de -620/-606 y -625/-611 encontramos que estaban incluidas dentro de las cuatro cajas GC localizadas entre -618 y -593 pb en el promotor del IR que son sitios de unión para los SP1 (Yoshizato K, y col., 2001; Araki E, y col., 1991). Análisis por retardo en gel utilizando como oligonucleótido marcado la secuencia del promotor del IR desde -633 hasta -604 pb (5'GAGGCGGGGAGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGG3') que incluía ambas secuencias -620/-606, -625/-611, dio resultados negativos como se muestra en la figura 27.

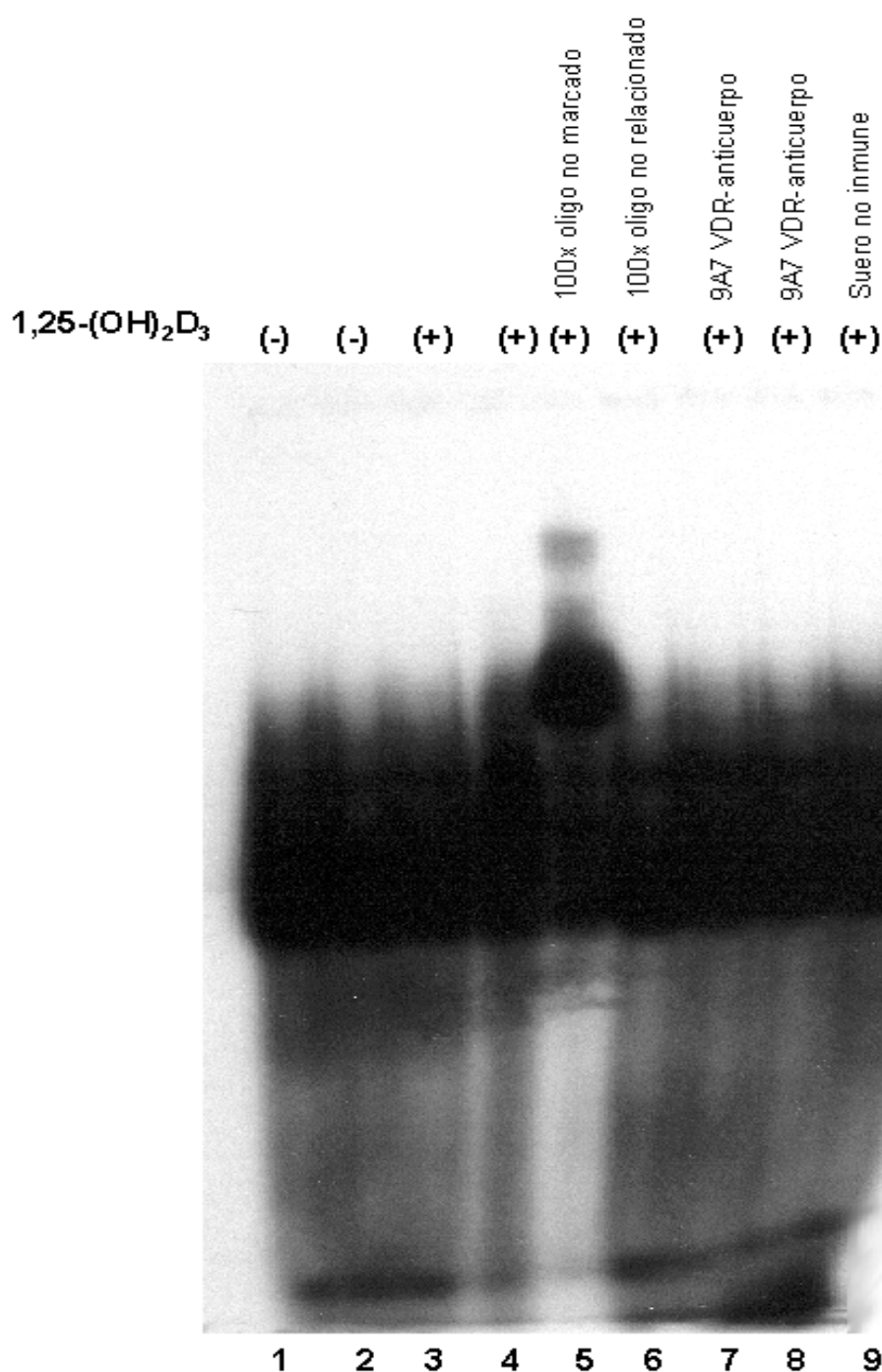


Figura 27. Retardo en gel utilizando la secuencia marcada del promotor del gen del receptor de insulina humano desde -633 hasta -604 pb, como oligonucleótido marcado y extractos nucleares de células U-937 no tratadas o tratadas con 1,25-dihidroxitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃) a la dosis de 10⁻⁸ M durante 24 h. Esta secuencia contiene dos potenciales VDREs solapados con cinco bases en la mitad del elemento 3' idénticas a las de la mitad del elemento 3' del VDRE consenso, secuencia deducida por nosotros a partir de secuencias de VDREs funcionales de genes regulados por 1,25-(OH)₂D₃ y previamente publicadas. **Calles 1 y 2:** extractos nucleares de células no tratadas; **calles 3 y 4:** extractos nucleares de células tratadas; **calles 5:** 100x exceso de oligonucleótido no marcado; **calles 6:** 100x exceso de oligonucleótido no relacionado; **calles 7 y 8:** 2 µl y 5 µl respectivamente, de anti-VDR monoclonal anticuerpo 9A7; **calles 9:** 2 µl de suero no inmune.

El siguiente paso fue analizar la posibilidad de hallar elementos-cis adyacentes o solapando con la secuencia -758/-744, utilizando para ello el programa TFSEARCH (apartado 14.1 de Materiales y Métodos). Así, se detectó una secuencia AP-2 solapando las dos últimas bases del posible VDRE. Empleando como sonda la secuencia natural del promotor del gen del IR desde -761 hasta -732 pb (5'CGTCGGGCCTGTGGGGCGCCTCCGGGGGTC3') que incluye el posible VDRE y la secuencia AP-2. Se realizaron ensayos de retardo en gel utilizando extractos nucleares de células controles y de células tratadas, obteniéndose como resultado la formación de un complejo principal (Figura 28), dicho complejo tenía mayor intensidad cuando las células se trataron previamente con la 1,25-(OH)₂D₃. En la figura 28 también podemos observar que el complejo fue competido eficientemente cuando se adicionó oligonucleótido no marcado (100x). Se demostró la alta especificidad del complejo cuando desapareció parcialmente la por la adición del anticuerpo específico 9A7 y por la falta de afectación al utilizar suero no-inmune. Además de todo esto, el complejo también compitió débilmente con un exceso (50x) de un oligonucleótido parcialmente relacionado, el hOC.

DISCUSIÓN

1. ESTUDIOS IN VIVO

Ratas no diabéticas tratadas con la 1,25-dihidroxitamina D₃ versus ratas no tratadas

El tratamiento con 1,25-(OH)₂D₃ a ratas no diabéticas (15VD+) causó un incremento significativo en el peso de los animales sin alterar los distintos parámetros medidos en la orina. Tampoco se observaron cambios en los parámetros medidos en el plasma. Dado que una de las funciones más clásicas de la 1,25-(OH)₂D₃ es regular la homeostasis del calcio y del fósforo (Darwish HM, y col., 1996), suponíamos que el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ aumentaría ligeramente los niveles de calcio sin producir por ello una hipercalcemia, como parece suceder, y este incremento en el calcio provocaría un incremento en la secreción de insulina en las células β pancreáticas (Billaudel S, y col., 1991), pero no ha sido así.

Además, en estos animales no diabéticos el tratamiento con 1,25-(OH)₂D₃ incrementó el indicador del tamaño celular en el hígado, en el riñón incrementó el contenido de proteínas y el indicador del tamaño celular, en el tejido adiposo perirrenal disminuyó el contenido de ADN y no alteró ninguno de estos parámetros en el tejido adiposo epididimal. Los incrementos citados en el hígado y en el riñón podrían ser atribuibles a una hipertrofia de estos órganos. Esto podría estar sustentado con el hecho de que nosotros hemos detectado que el tratamiento con 1,25-(OH)₂D₃ dio lugar a un incremento en el peso de los animales. La disminución en el contenido de ADN en el tejido adiposo perirrenal podría ser debida a una actividad antiproliferativa de la 1,25-(OH)₂D₃ en este

tejido, esta hipótesis ha sido sugerida también por otros autores (Koshiishi I. y col., 2001).

Los ensayos *Northern* en los tejidos en estudio de estos animales revelaron la presencia de las dos especies predominantes del ARNm del IR con tamaños de 9,5 y 7,5 kb, cuyo cociente fue diferente según los tejidos, en concordancia con datos de nuestro laboratorio y otros (Goldstein BJ. y col., 1987; Knott RM. y col., 1990; Tozzo E. y col., 1995; Campión J. y col., 1997; Campión J. y col., 1998). El tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ no provocó ningún cambio en la expresión del ARNm del IR en el hígado, ni en el riñón, ni en el tejido adiposo epididimal, aunque estos tejidos sí que presentan VDRs y en una concentración como sigue: riñón > hígado > tejido adiposo (Sundell K, y col., 1992). Sin embargo, la 1,25-(OH)₂D₃ disminuyó significativamente la expresión del ARNm del IR en el tejido adiposo perirrenal, sugiriendo la presencia de VDRs en este tejido, hecho que todavía no se ha descrito. Así pues, la 1,25-(OH)₂D₃ podría regular de forma tejido-específica la expresión del gen del IR.

Nuestros resultados por análisis de *Scatchard* demostraron que el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ a ratas no diabéticas no modificó ni el número ni la afinidad de los IRs, en concordancia con los datos de expresión en este tejido.

Proseguimos con el estudio del transporte de glucosa en adipocitos. El transporte basal en estas células ha sido muy estudiado (Young P, y col., 1985; de Souza CJ, y col., 1997) y se sabe que este transporte está mediado por el transportador de glucosa Glut4 (Myers MG Jr, y col., 1996). Nosotros observamos que el tratamiento con 1,25-(OH)₂D₃ a ratas no diabéticas no modificó el transporte de glucosa basal ni el estimulado por insulina a la concentración de

10^{-7} M. Estos resultados *in vivo* no son concordantes con el reciente trabajo de otros autores (Huang Y, y col., 2002) que han observado que la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ redujo el transporte de glucosa inducido por insulina en adipocitos de ratas, vía activación de la PKC β , este hecho puede deberse a que las condiciones del tratamiento y el método para analizarlo fueron diferentes al empleado por nosotros.

También estudiamos la oxidación de glucosa basal y estimulada por insulina en adipocitos de ratas tratadas con la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ o no tratadas. La oxidación de glucosa basal en adipocitos ya ha sido antes estudiada por otros autores (Arner P. y col., 1987; Bolinder J. y col., 1986). Según nuestros resultados, el tratamiento con la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ a ratas no diabéticas no afectó a la oxidación de glucosa basal ni la estimulada por insulina a la concentración de 10^{-7} M.

Ratas diabéticas versus ratas no diabéticas

Nuestros resultados en ratas con diabetes experimental inducida por estreptozotocina indicaron una disminución significativa del peso corporal de estos animales, éste es un signo, entre otros, característico del tratamiento con estreptozotocina (Murali B. Y col., 2001). Además, cuando analizamos distintos parámetros en la orina de estos animales observamos un incremento en la densidad, una acidificación del pH, presencia de leucocitos, cuerpos cetónicos y sangre junto a glucosuria. La presencia de leucocitos en orina puede ser debida a la enfermedad autoinmune producida por la estreptozotocina (Maksimovic-Ivanic D. y col., 2002) o a que estas ratas, quizá igual que ocurre con los hombres que

padecen diabetes, sean muy propensas a sufrir infecciones. Los otros parámetros, medidos en la orina, alterados que hemos enumerado son característicos de la diabetes (Eizirik DL. y col., 1984) También observamos hiperglucemia e hipoinsulinemia, en concordancia con previos datos de nuestro laboratorio (Mayor P. y col., 1987). Todas estas alteraciones son características del síndrome diabético.

La diabetes alteró algunos parámetros tisulares en los distintos tejidos. Así, indujo un aumento del contenido del ADN en el hígado, un aumento de proteínas y del índice del tamaño celular en el riñón, un incremento de ADN y proteínas en el tejido adiposo perirrenal y un incremento de proteínas en el tejido adiposo epididimal. El aumento de ADN en el hígado podría indicar una hipertrofia, pero dado que el índice de proteína/ADN no resultó modificado esta posibilidad debe ser excluida. El incremento de proteínas en el riñón, en el adiposo perirrenal y epididimal podría deberse a una reducción en el tamaño de estos órganos producida por la estreptozotocina (Tancrede G. y col., 1983). Esta explicación podría estar apoyada por la clara disminución detectada en el peso de estos animales. En el tejido adiposo epididimal se detectó, además de una disminución del peso de este tejido, una disminución en el tamaño de los adipocitos.

Por medio de los análisis *Northern* observamos que la diabetes experimental inducida por estreptozotocina incrementó la expresión del ARNm del IR en el hígado. Esto coincide con los resultados de otros autores (Tozzo E, y col., 1992; Brunetti A, y col., 1996; Amessou M, y col., 1999). La expresión del ARNm del IR en el riñón no resultó modificada. Nuestro grupo investigador (datos no mostrados) y Sechi LA. y col., 1992 hemos observado un incremento en este

ARNm en el riñón cuando la diabetes en lugar de ser durante 8 días se prolongaba a los 15 días. Y en cuanto a los tejidos adiposos, la diabetes decreció significativamente la expresión del ARNm del IR en el perirrenal y la aumentó en el epididimal. Por todo ello, podemos decir que el efecto de este agente diabetógeno es altamente tejido-específico.

Cuando se analizó la unión de la insulina a su receptor en adipocitos aislados del tejido adiposo epididimal de ratas con diabetes experimental, se observó una disminución en el número de IRs, sin alterar la afinidad por su ligando. Dado el menor tamaño de los adipocitos en ratas diabéticas, se tuvo en cuenta este hecho reflejando el número de receptores por unidad de superficie (μm^2) y esta vez la disminución en el número de IRs no fue estadísticamente significativa. La unión de la insulina a su receptor ha sido ampliamente estudiada en distintos órganos y tejidos de ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina. Así, algunos autores, al igual que nosotros, han detectado disminución en la unión de la insulina a sus receptores en adipocitos (Whittaker J y col., 1981) mientras que otros, al igual que nos ha pasado a nosotros cuando hemos corregido la unión de la insulina a su receptor por unidad de superficie, no han observado alteraciones en adipocitos (Vann Bennett G. y col., 1972) ni en homogenizados de cerebros de rata (Pacold ST. y col., 1979) y otros autores han detectado incremento en la unión de la insulina a su receptor en hepatocitos (Bhathena SJ. y col., 1978; Cech JM. y col., 1980; Samson M. y col., 1982), membranas hepáticas (Davidson MB. y col., 1977; Soman V. y col., 1978; Allgayer H. y col., 1982), adipocitos (Kasuga M. y col., 1978; Wieringa T. y col., 1978; Kobayashi M. y col., 1979; Philippe J. y col., 1981) y membranas de células de

riñón (Papachristodoulou DK. y col., 1982). Por tanto, los resultados siguen siendo ampliamente contradictorios

Seguidamente, quisimos comprobar si la diabetes experimental afectaba al transporte y a la oxidación de glucosa en adipocitos. La diabetes disminuyó el transporte de glucosa basal y estimulado por insulina. Estos datos corregidos por unidad de superficie, al igual que se hiciera en los ensayos de unión de la insulina a su receptor, dieron lugar a parecidos resultados. Cuando analizamos la oxidación de glucosa observamos que estaba disminuida tanto la basal como la estimulada por insulina. Y estos resultados se mantenían cuando los corregimos por unidad de superficie. Este descenso en la sensibilidad a la insulina, tanto en el transporte de glucosa como en la oxidación, ha sido descrito también por otros autores (Kasuga M. y col., 1978; Wieringa T. y col., 1978; Kobayashi M. y col., 1979; Samson M. y col., 1982; Karnieli E. y col., 1991).

Ratas diabéticas tratadas con la 1,25-dihidroxitamina D₃ versus ratas diabéticas

El tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ a ratas diabéticas revirtió significativamente la pérdida de peso ocasionada por la diabetes. Esta ganancia del peso corporal podría ser en parte debida a una mejora en el metabolismo de los carbohidratos (hemos observado que en ratas diabéticas está disminuido), grasa y proteínas de estos animales.

El tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ contrarrestó en parte la presencia de leucocitos en orina causada por la diabetes. Esta disminución en la presencia de leucocitos puede ser debida en parte al papel inmunosupresor de esta hormona

(Deluca HF. y col., 2001). En cuanto al pH de la orina el tratamiento con 1,25-(OH)₂D₃ lo acidificó aún más. En el plasma, no fue capaz de revertir ni la hiperglucemia ni la hipoinsulinemia producida por la diabetes, mientras que incrementó los niveles de fósforo.

Cuando valoramos la cantidad de ADN, ARN, proteínas y el indicador del tamaño celular (proteína/ADN) en los distintos tejidos en estudio observamos que el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ no revirtió de forma significativa ninguno de los valores de estos parámetros alterados por la diabetes, con la excepción de contenido de proteínas del tejido adiposo perirrenal. Estos tejidos podrían estar recuperando el peso perdido por la diabetes lo que estaría apoyado por el incremento en el peso corporal de estos animales.

La expresión del gen del IR por análisis *Northern* reveló que el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ a ratas diabéticas no modificó el incremento del ARNm del IR causado por la diabetes en el hígado ni en el riñón, sin embargo en el tejido adiposo epididimal revirtió el incremento en la expresión del gen del IR inducido por la diabetes.

Mediante análisis de *Scatchard* observamos que el tratamiento con 1,25-(OH)₂D₃ no alteró significativamente ni el número de IRs, ni la afinidad de estos receptores.

El tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ a ratas diabéticas no modificó la inhibición inducida por la diabetes del transporte de glucosa basal, ni de la oxidación de glucosa basal, ni tampoco cuando ambas actividades fueron estimuladas por la insulina. Esto no apoyaría nuestra hipótesis en la cual proponemos que la recuperación del peso corporal de estos animales pueda ser

debida a una mejora en el metabolismo de los carbohidratos, que tampoco está apoyada por una mejora en la glucosuria ni hiperglucemia, aunque el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ podría mejorar el metabolismo de las grasas y proteínas que están alterados en ratas con diabetes experimental Je HD. y col., 2001

En resumen, *in vivo* hemos observado que el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ a ratas no diabéticas no causó ninguna modificación de los parámetros estudiados en orina y sangre, pero sí un aumento del peso corporal de estos animales. El hígado y el riñón podrían haber sufrido una hipertrofia. La expresión de gen del IR fue inhibida en el tejido adiposo perirrenal y no se alteró en el hígado, riñón, ni en el tejido adiposo epididimal. En este último tejido, ni el número de IRs, ni el transporte de glucosa estimulado por insulina ni la oxidación de glucosa estimulada por insulina resultaron modificados por el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃.

Por otro lado, hemos observado que el tratamiento con 1,25-(OH)₂D₃ a ratas diabéticas por estreptozotocina revirtió la pérdida de peso ocasionada por la diabetes, contrarrestando en parte la presencia de leucocitos en orina, pero acidificando aún más su pH. En el plasma no fue capaz de revertir ni la hiperglucemia ni la hipoinsulinemia producida por la diabetes, mientras que incrementó los niveles de fósforo. El tratamiento con 1,25-(OH)₂D₃ no revirtió ninguno de los parámetros tisulares alterados por la diabetes, con la excepción de disminuir el contenido en proteínas del tejido adiposo perirrenal. Tampoco modificó el incremento del ARNm del IR causado por la diabetes en el hígado, ni en el riñón, pero sí en el tejido adiposo epididimal. En este último tejido no alteró ni el número de IRs, ni la afinidad de estos receptores. El tratamiento con 1,25-

(OH)₂D₃ a ratas diabéticas no modificó la inhibición inducida por la diabetes del transporte ni la oxidación de glucosa basal, tampoco las modificó cuando ambas actividades fueron estimuladas por la insulina. Por tanto, el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ en nuestras condiciones *in vivo* no ayuda a mejorar la diabetes experimental inducida por la estreptozotocina, bien por las concentraciones utilizadas de la hormona y la duración del tratamiento, bien por el reducido número de experimentos que hemos podido llevar a término o bien por la gravedad de la diabetes causada experimentalmente.

2. ESTUDIOS IN VITRO

Como se mencionó en la Introducción, el efecto de la 1,25-(OH)₂D₃ es dependiente de los niveles de VDR (Goff JP. y col., 1990). Por ello, procedimos en primer lugar a analizar como variaba la expresión del ARNm del VDR en las células U-937 tras el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃. Mediante ensayos *Northern* detectamos una única banda con un tamaño aproximado de 4,6 kb que fue regulada positivamente por su propia hormona. La 1,25-(OH)₂D₃ incrementó en mayor grado la expresión del ARNm del VDR a la concentración de 10⁻⁸ M durante 24 h que a la concentración 10⁻⁶ M durante 8 h. De hecho, el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ durante 24 h ha sido considerado por otros autores como el tiempo idóneo de estabilización de la regulación positiva del VDR por la 1,25-(OH)₂D₃, después de un máximo a las 12 h y una decaída hacia los niveles basales entre las 36 y 48 h (Lee Y, y col., 1989). Además, la concentración de 10⁻⁸ M, está cercana a los valores de K_d del VDR en las células U-937 descritos por

otros autores (Mezzetti G, y col., 1984; Hewison M, y col., 1989) y por nosotros en esta Tesis Doctoral, mediante ensayos de desplazamiento de la unión de la 1,25-(OH)₂D₃ a su receptor. Por todo lo indicado, la concentración 10⁻⁸ M de 1,25-(OH)₂D₃ y el tiempo de 24 h fueron los elegidos para los estudios de unión.

El tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ a células U-937 en esas condiciones no solo aumentó los niveles del ARNm del VDR, sino que también aumentó la proteína del VDR. Estos resultados están en concordancia con otros autores en esta y otras líneas mieloides (Lee Y, y col., 1989; Liu M. y col., 1996a). El VDR activado por la unión a su hormona podría mediar la regulación de la expresión del gen del IR por la 1,25-(OH)₂D₃.

En este sentido, mediante análisis *Northern* observamos las dos especies características de 11 y 8,5 kb del ARNm del IR presentes en esta línea celular (Leal MA, y col., 1992; Leal MA, y col., 1996; Campión J, y col., 1999; Campión J, y col., 2002). El tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ durante 24 h incrementó la expresión de ambas especies de una manera dependiente de la dosis, obteniéndose el máximo incremento a la concentración de 10⁻⁸ M de 1,25-(OH)₂D₃. Esta dosis y tiempo coinciden con las condiciones a las que se observó la máxima expresión de VDR a nivel de ARN y proteína, sugiriendo la implicación de este receptor en la inducción de la expresión del IR por la 1,25-(OH)₂D₃. Este incremento en los niveles de ARNm del IR estuvo acompañado de un aumento en el número de IRs determinado por ensayos de unión utilizando la misma dosis y tiempo.

Cuando analizamos el transporte de glucosa estimulado por insulina observamos que la 1,25-(OH)₂D₃ indujo un incremento de la respuesta a la

insulina, sin cambios en la sensibilidad celular a esta hormona. El Glut1 es el único transportador de glucosa en la línea celular U-937 (Caro C, y col., 1998) y es capaz de responder a insulina (Tordjman KM, y col., 1989; Calderhead DM, y col., 1990). Por ello, es razonable suponer que el Glut1 pudiera ser el transportador de glucosa implicado en el incremento del transporte inducido por la 1,25-(OH)₂D₃ en estas células.

Además, estudiamos la modulación por la 1,25-(OH)₂D₃ del sistema de señalización de la insulina al nivel de la PI3-K en el transporte de glucosa, utilizando para ello un inhibidor de esta enzima, la wortmanina (Kanai F, y col., 1993). Es conocido que la activación del IR estimula la fosforilación de las proteínas IRS y que una de las principales funciones de estas proteínas es la regulación de la PI3-K. La PI3-K existe como múltiples isoformas y la activación del tipo 1a durante su asociación con las proteínas IRS ha sido descrito como un mecanismo involucrado en la mayoría de las respuestas biológicas de la insulina, incluyendo el transporte y la oxidación de glucosa. En este trabajo, hemos demostrado que la wortmanina inhibe la respuesta de la insulina en el transporte de glucosa en las células U-937, demostrando así que este mecanismo es dependiente de la PI3-K. Además, la wortmanina causó una mayor inhibición de la respuesta insulínica en células tratadas con 1,25-(OH)₂D₃ que en células no tratadas. Esto sugiere la existencia de una incrementada actividad PI3-K inducida por la 1,25-(OH)₂D₃ que podría mediar la potenciación de esta respuesta insulínica.

Cuando analizamos la oxidación de glucosa por la 1,25-(OH)₂D₃ detectamos que esta hormona también fue capaz de incrementar esta actividad

tanto basal como estimulada por insulina, y esta última en términos de respuesta sin alterar la sensibilidad de la célula a esta hormona.

Por los mismos motivos que los mencionados en el transporte de glucosa realizamos ensayos inhibiendo la actividad enzimática de la PI3-K, demostrando que la PI3-K también estaba implicada en la oxidación de glucosa y que la wortmanina causó una mayor inhibición de la oxidación de glucosa en células tratadas que en células controles, sugiriendo que la 1,25-(OH)₂D₃ podría estar incrementando la actividad de la PI3-K.

Cuando estudiamos cómo la 1,25-(OH)₂D₃ modulaba la actividad biológica de la incorporación de timidina en el ADN de las células, observamos que la 1,25-(OH)₂D₃ decreció tanto la incorporación de timidina basal como la estimulada por insulina en términos de decrecida sensibilidad y respuesta celular. La 1,25-(OH)₂D₃ es un conocido inhibidor de la proliferación celular además de un inductor de la diferenciación de células leucémicas hacia macrófagos (Rots NY, y col., 1999; Torres R. y col., 2000). La disminución de la incorporación de timidina causada por el tratamiento con la 1,25-(OH)₂D₃ posiblemente sea debida a la modulación positiva por esta hormona de genes implicados en la retención del crecimiento y la diferenciación de células mieloides, incluyendo los inhibidores de ciclinas dependientes de quinasas como el p21, p27, p15 y p18, (Liu M, y col., 1996a; Liu M, y col., 1996b), el c-myc a través de la MAPK (Boland R. y col., 2002) y además interactuando con las proteínas fosfatasa PP1c y PP2Ac que desfosforilan a la enzima p70 S6 quinasa que al estar bloqueada provoca la retención de las células en la fase G1 y por consiguiente se retiene el crecimiento (Bettoun DJ. y col., 2002).

Dado que por estudios previos de nuestro grupo investigador (Leal MA, y col., 1995) se demostró que el mecanismo por el cual la 1,25-(OH)₂D₃ incrementó la expresión del gen del IR no era un efecto post-transcripcional, en este trabajo hemos estudiado si el mecanismo sería transcripcional. Así, hemos demostrado que la 1,25-(OH)₂D₃ es capaz de inducir la actividad transcripcional del promotor entero del gen del IR (desde -1819 hasta -271 pb) en un grado equivalente al incremento en la expresión del ARNm del IR y al incremento en el número de IRs. Además, hemos demostrado que la 1,25-(OH)₂D₃ produjo una similar inducción en la actividad transcripcional de dos progresivas deleciones 5' del promotor entero, una hasta -1473 pb y otra hasta -876 pb. Estos resultados sugirieron que la región del promotor del IR desde -876 hasta -271 pb, podría ser suficiente para la inducción transcripcional del gen del IR por la 1,25-(OH)₂D₃. De hecho, según otros autores esta región contiene información suficiente para una eficiente transcripción del gen del IR (Cameron KE, y col., 1992; Lee JK, y col., 1992).

Esta región incluye cuatro cajas GC (desde -618 hasta -593 pb), las cuales parecen ser esenciales para la expresión de este gen durante la diferenciación de mioblastos a miocitos en células BC3H-1 (Brunetti A, y col., 1993). Además, utilizando la base de datos TRANSFAC (Wingender E, y col., 2001) y sistemas de búsqueda asociados a esta base de datos, hemos sido capaces de identificar en esta región un potencial sitio de unión para el factor AP-1 (-877/-876 pb) y tres potenciales sitios de unión para el factor AP-2 (-436/-425 pb, -444/-433 pb, -745/-734 pb). Los dos primeros sitios AP-2 coinciden con un grupo de tres cajas GC localizadas en el promotor del IR humano entre -436 y -400 pb. Estas cajas

parecen no ser funcionales *in vivo* (Lee JK, y col., 1992; Yoshizato K, y col., 2001).

En esta región -876 a -271 pb, quisimos identificar la presencia de VDRE(s) para lo cual primeramente realizamos una búsqueda computerizada de secuencias candidatas a VDREs por homología con una secuencia VDRE consenso (5'GGGTCANNGGGGGCA3') que fue compilada con datos citados por otros autores informando sobre VDREs funcionales de varios genes (Ozono K, y col., 1990; Demay MB, y col., 1992; Colnot S, y col., 1995; Christakos S, y col., 1996; Ohyama Y, y col., 1996; Zou A, y col., 1997; Haussler MR, y col., 1998; Koszewski NJ, y col., 2000). Este consenso es ligeramente diferente del propuesto por Colnot S, y col., 1995 y por Haussler MR, y col., 1998 (5'PuGGTCANNPuPuGTTCA3'). El análisis computerizado reveló que no existía ninguna secuencia homóloga a nuestro VDRE consenso ni tampoco secuencias con variaciones en 1, 2, 3 o 4 bases de la secuencia consenso. Pero sí detectamos 10 secuencias candidatas a VDREs con 5 variaciones respecto a nuestra secuencia VDRE consenso (Tabla 12). De éstas, sólo la secuencia -758/-744 (5'CGGGCCTGTGGGGCG3') junto con la secuencia solapada del AP-2 (5'CGTCGGGCCTGTGGGGCGCCTCCGGGGGTC3'), la cual contiene el motivo bien caracterizado GCCNNNGGG (Hilger-Eversheim K, y col., 2000), resultó ser un sitio de unión para el VDR cuando se probó por ensayos de retardo en gel.

Este sitio VDRE tiene una base G en la segunda posición de cada mitad del elemento. Estas G han sido descritas como puntos de contacto con un residuo de arginina altamente conservado dentro de la α -hélice del dominio de unión al ADN del VDR (Freedman LP, y col., 1993). Las otras G que forman el elemento pueden

también establecer contactos con el VDR (Colnot S. y col., 1995). El VDR se une a este elemento compartiendo dos pb con el sitio AP-2. El posible *cross-talk* entre estos dos factores transcripcionales y sus requerimientos de estabilización necesitarán ser clarificados en posteriores estudios, pero el hecho de que un único complejo sea detectado por ensayos de retardo en gel, nos lleva a suponer la posibilidad de que el complejo VDR-ADN incluya el sitio AP-2.

Se han descrito otros casos de elementos-cis adyacentes y sus asociados factores transcripcionales que parecen modular la activación transcripcional por la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, aunque difieren en parte de nuestro caso. Un ejemplo (Ohyama Y, y col., 1996; Ozono K, y col., 1998) es el del gen de la 25-hidroxitamin D 24-hidroxilasa que está regulado por la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ y en cuyo promotor se encuentran dos VDREs separados por 100 pb, además un sitio AP-2 *like* adyacente, separado *downstream* por cuatro pb del VDRE proximal, todo es requerido para la completa activación transcripcional de este gen por la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$.

En resumen, *in vitro* la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ a través del VDR es capaz de incrementar la expresión del gen del IR y la proteína por él codificada dando lugar a un incremento de ciertas actividades biológicas de la insulina como el transporte y la oxidación de glucosa. La regulación primaria tiene lugar a nivel transcripcional a través de un VDRE localizado en el promotor del gen del IR (desde -758 hasta -744 pb) solapado con un sitio AP-2.

CONCLUSIONES

IN VIVO

1. El tratamiento con $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ a la dosis de $0,5 \mu\text{g/kg/día}$ durante 15 días a ratas no diabéticas no causó ninguna modificación en ninguno de los parámetros estudiados en orina y sangre, pero sí un aumento del peso corporal de estos animales. El hígado y el riñón podrían haber sufrido una hipertrofia. La expresión de gen del IR fue inhibida en el tejido adiposo perirrenal y no se alteró en el hígado, ni en el riñón, ni en el tejido adiposo epididimal. En este último tejido, ni el número de IRs, ni el transporte de glucosa estimulado por insulina ni la oxidación de glucosa estimuladas por insulina resultaron modificados por el tratamiento con la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$.
2. El tratamiento con $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ a la dosis de $0,5 \mu\text{g/kg/día}$ durante 15 días a ratas con diabetes experimental inducida por la estreptozotocina revirtió la pérdida de peso ocasionada por la diabetes, contrarrestando en parte la presencia de leucocitos en orina, pero acidificando aún más su pH. En el plasma no fue capaz de revertir ni la hiperglucemia ni la hipoinsulinemia producida por la diabetes, mientras que incrementó los niveles de fósforo. La $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ no revirtió ninguno de los parámetros tisulares alterados por la diabetes, con la excepción de disminuir el contenido en proteínas del tejido adiposo perirrenal. Tampoco modificó el incremento del ARNm del IR causado por la diabetes en el hígado ni en el riñón, pero sí lo modificó en el tejido adiposo epididimal. En este último tejido no alteró ni el número de IRs, ni la afinidad de estos receptores. La $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ no modificó la inhibición inducida por la diabetes del

transporte, ni la oxidación de glucosa basal ni tampoco cuando ambas actividades fueron estimuladas por la insulina.

3. El tratamiento con la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ en nuestras condiciones *in vivo* no ayuda a mejorar la diabetes experimental inducida por la estreptozotocina, bien por las concentraciones utilizadas de la hormona, la duración del tratamiento, el reducido número de experimentos que hemos podido llevar a término o bien por la gravedad de la diabetes causada experimentalmente.

IN VITRO

4. La $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ a la concentración 10^{-8} M durante 24 h, a través de su receptor VDR, es capaz de incrementar la expresión del gen del IR y la proteína por él codificada, dando lugar a un incremento de ciertas actividades biológicas de la insulina como el transporte y la oxidación de glucosa. La regulación primaria tiene lugar a nivel transcripcional a través de un VDRE (5'CGTCGGGCCTGTGGGGCGCCTCCGGGGGTC3'), localizado en el promotor del gen del IR, concretamente entre -758 y -744 pb y solapado con un sitio AP-2.

BIBLIOGRAFÍA

[Abita JP, Gauville C, Balitrand N, Gespach C, Canivet J.](#) Binding of 125I-insulin to the human histiocytic lymphoma cell line U-937: effect of differentiation with retinoic acid. *Leuk Res.* 1984;8(2):213-21.

[Allgayer H, Bachmann W, Hepp KD.](#) Increased dose-response relationship of liver plasma membrane adenylate cyclase to glucagon stimulation in diabetic rats. A possible role of the guanyl nucleotide-binding regulatory protein. *Diabetologia.* 1982 Jun;22(6):464-7.

[Amessou M, Bortoli S, Liemans V, Collinet M, Desbuquois B, Brichard S, Girard J.](#) Treatment of streptozotocin-induced diabetic rats with vanadate and phlorizin prevents the over-expression of the liver insulin receptor gene. *Eur J Endocrinol.* 1999 Jan;140(1):79-86.

[Anderson CL.](#) Isolation of the receptor for IgG from a human monocyte cell line (U937) and from human peripheral blood monocytes. *J Exp Med.* 1982 Dec 1;156(6):1794-806.

[Araki E, Shimada F, Uzawa H, Mori M, Ebina Y.](#) Characterization of the promoter region of the human insulin receptor gene. Evidence for promoter activity. *J Biol Chem.* 1987 Nov 25;262(33):16186-91.

[Araki E, Murakami T, Shirotani T, Kanai F, Shinohara Y, Shimada F, Mori M, Shichiri M, Ebina Y.](#) A cluster of four Sp1 binding sites required for efficient expression of the human insulin receptor gene. *J Biol Chem.* 1991 Feb 25;266(6):3944-8.

[Aranda A, Pascual A.](#) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* 2001 Jul;81(3):1269-304. Review.

[Arner P, Engfeldt P, Skarfors E, Lithell H, Bolinder J.](#) Insulin receptor binding and metabolic effects of insulin in human subcutaneous adipose tissue in untreated non-insulin dependent diabetes mellitus. *Ups J Med Sci.* 1987;92(1):47-58.

[Aslam F, McCabe L, Frenkel B, van Wijnen AJ, Stein GS, Lian JB, Stein JL.](#) AP-1 and vitamin D receptor (VDR) signaling pathways converge at the rat osteocalcin VDR element: requirement for the internal activating protein-1 site for vitamin D-mediated trans-activation. *Endocrinology.* 1999 Jan;140(1):63-70.

Ausubel FM, y col. *Current Protocols in Molecular Biology.* 1989. Ed. John Wiley and Sons, New York.

[Auwerx J, Dequeker J, Bouillon R, Geusens P, Nijs J.](#) Mineral metabolism and bone mass at peripheral and axial skeleton in diabetes mellitus. *Diabetes.* 1988 Jan;37(1):8-12.

[Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Pike JW, Shine J, O'Malley BW.](#) Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 May;85(10):3294-8.

[Beaulieu C, Kestekian R, Havrankova J, Gascon-Barre M.](#) Calcium is essential in normalizing intolerance to glucose that accompanies vitamin D depletion in vivo. Diabetes. 1993 Jan;42(1):35-43.

[Berger U, Wilson P, McClelland RA, Colston K, Haussler MR, Pike JW, Coombes RC.](#) Immunocytochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in normal human tissues. J Clin Endocrinol Metab. 1988 Sep;67(3):607-13.

[Bettoun DJ, Buck DW 2nd, Lu J, Khalifa B, Chin WW, Nagpal S.](#) A vitamin D receptor-Ser/Thr phosphatase-p70 S6 kinase complex and modulation of its enzymatic activities by the ligand. J Biol Chem. 2002 Jul 12;277(28):24847-50.

[Bhathena SJ, Voyles NR, Smith S, Recant L.](#) Decreased glucagon receptors in diabetic rat hepatocytes. Evidence for regulation of glucagon receptors by hyperglucagonemia. J Clin Invest. 1978 Jun;61(6):1488-97.

[Bikle DD, Gee E, Halloran B, Kowalski MA, Ryzen E, Haddad JG.](#) Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. J Clin Endocrinol Metab. 1986 Oct;63(4):954-9.

[Billaudel S, Aillet G, Tardivel P, Besse B, Sagot P, Le Guyader F, Mensier A, Lopes P.](#) [Typing of papillomaviruses in cervical dysplasias. Its value in treatment] J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris). 1991;20(7):941-5. French.

[Bischoff HA, Borchers M, Gudat F, Duermueller U, Theiler R, Stahelin HB, Dick W.](#) In situ detection of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in human skeletal muscle tissue. Histochem J. 2001 Jan;33(1):19-24.

[Boland R, De Boland AR, Buitrago C, Morelli S, Santillan G, Vazquez G, Capiati D, Baldi C.](#) Non-genomic stimulation of tyrosine phosphorylation cascades by 1,25(OH)₂D₃ by VDR-dependent and -independent mechanisms in muscle cells. Steroids. 2002 May;67(6):477-82.

[Bolinder J, Lithell H, Skarfors E, Arner P.](#) Effects of obesity, hyperinsulinemia, and glucose intolerance on insulin action in adipose tissue of sixty-year-old men. Diabetes. 1986 Mar;35(3):282-90.

[Botling J, Oberg F, Torma H, Tuohimaa P, Blauer M, Nilsson K.](#) Vitamin D₃- and retinoic acid-induced monocytic differentiation: interactions between the endogenous vitamin D₃ receptor, retinoic acid receptors, and retinoid X receptors in U-937 cells. Cell Growth Differ. 1996 Sep;7(9):1239-49.

[Boucher BJ, Mannan N, Noonan K, Hales CN, Evans SJ.](#) Glucose intolerance and impairment of insulin secretion in relation to vitamin D deficiency in east London Asians. *Diabetologia*. 1995 Oct;38(10):1239-45.

[Bradford MM.](#) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.

[Briata P, Gherzi R.](#) Multifactorial control of insulin receptor gene expression in human cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Aug 16;170(3):1184-90.

[Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E.](#) Vitamin D. *Am J Physiol*. 1999 Aug;277(2 Pt 2):F157-75. Review.

[Brumbaugh PF, Haussler MR.](#) Specific binding of 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol to nuclear components of chick intestine. *J Biol Chem*. 1975 Feb 25;250(4):1588-94.

[Brunetti A, Foti D, Goldfine ID.](#) Identification of unique nuclear regulatory proteins for the insulin receptor gene, which appear during myocyte and adipocyte differentiation. *J Clin Invest*. 1993 Sep;92(3):1288-95.

[Brunetti A, Brunetti L, Foti D, Accili D, Goldfine ID.](#) Human diabetes associated with defects in nuclear regulatory proteins for the insulin receptor gene. *J Clin Invest*. 1996 Jan 1;97(1):258-62.

[Calderhead DM, Kitagawa K, Lienhard GE, Gould GW.](#) Translocation of the brain-type glucose transporter largely accounts for insulin stimulation of glucose transport in BC3H-1 myocytes. *Biochem J*. 1990 Aug 1;269(3):597-601.

[Calisti L, Federico G, Balestri M, Fusaro C, Saggese G, Bottone E.](#) [Diabetes and growth. An auxological follow-up of 36 diabetic children] *Minerva Pediatr*. 1988 Oct;40(10):575-80

Calle C, Leal MA, Mas A, Aller P. *Diabetología* 1994; 37(suppl.1):A121.

Calle C, Campión J, García-Arencibia M, Maestro B, Dávila N. Transcriptional inhibition of the human insulin receptor gene by aldosterone. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2002 (enviado).

[Cameron KE, Resnik J, Webster NJ.](#) Transcriptional regulation of the human insulin receptor promoter. *J Biol Chem*. 1992 Aug 25;267(24):17375-83.

[Campion J, Aller P, Davila N, Carranza MC, de Miguel R, Calle C.](#) Tissue-specific modulation of insulin receptor mRNA levels in adrenaline-treated rats. *Mol Cell Biochem*. 1997 Apr;169(1-2):165-9.

[Campion J, Lahera V, Cachofeiro V, Maestro B, Davila N, Carranza MC, Calle C.](#) In vivo tissue specific modulation of rat insulin receptor gene expression in an experimental model of mineralocorticoid excess. *Mol Cell Biochem.* 1998 Aug;185(1-2):177-82.

[Campion J, Maestro B, Mata F, Davila N, Carranza MC, Calle C.](#) Inhibition by aldosterone of insulin receptor mRNA levels and insulin binding in U-937 human promonocytic cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999 Sep-Oct;70(4-6):211-8.

[Campion J, Maestro B, Molero S, Davila N, Carranza MC, Calle C.](#) Aldosterone impairs insulin responsiveness in U-937 human promonocytic cells via the downregulation of its own receptor. *Cell Biochem Funct.* 2002 Sep;20(3):237-45.

[Caro C, Colby-Germinario S, Brenner B, Oliveira M, Wainberg MA, Germinario RJ.](#) Sugar transport and glut transporter expression in a variety of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) chronically infected target cell lines. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998 Sep;30(9):1031-8.

[Carrascosa JM, Vogt B, Ullrich A, Haring HU.](#) Activation of phosphatidylinositol-3-kinase by insulin is mediated by both A and B human insulin receptor types. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Jan 15;174(1):123-7.

[Cech JM, Freeman RB Jr, Caro JF, Amatruda JM.](#) Insulin action and binding in isolated hepatocytes from fasted, streptozotocin-diabetic, and older, spontaneously obese rats. *Biochem J.* 1980 Jun 15;188(3):839-45.

[Chaplinski TJ, Bennett TE, Caro JF.](#) Alteration in insulin receptor expression accompanying differentiation of HL-60 leukemia cells. *Cancer Res.* 1986 Mar;46(3):1203-7.

[Chertow BS, Sivitz WI, Baranetsky NG, Clark SA, Waite A, Deluca HF.](#) Cellular mechanisms of insulin release: the effects of vitamin D deficiency and repletion on rat insulin secretion. *Endocrinology.* 1983 Oct;113(4):1511-8.

[Chomczynski P, Sacchi N.](#) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.

[Christakos S, Norman AW.](#) Studies on the mode of action of calciferol. XVIII. Evidence for a specific high affinity binding protein for 1,25 dihydroxyvitamin D₃ in chick kidney and pancreas. *Biochem Biophys Res Commun.* 1979 Jul 12;89(1):56-63.

[Christakos S, Raval-Pandya M, Wernyj RP, Yang W.](#) Genomic mechanisms involved in the pleiotropic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochem J.* 1996 Jun 1;316 (Pt 2):361-71. Review.

[Clark SA, Stumpf WE, Sar M.](#) Effect of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ on insulin secretion. *Diabetes*. 1981 May;30(5):382-6.

[Clemens TL, Garrett KP, Zhou XY, Pike JW, Haussler MR, Dempster DW.](#) Immunocytochemical localization of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in target cells. *Endocrinology*. 1988 Apr;122(4):1224-30.

[Colnot S, Lambert M, Blin C, Thomasset M, Perret C.](#) Identification of DNA sequences that bind retinoid X receptor-1,25(OH)₂D₃-receptor heterodimers with high affinity. *Mol Cell Endocrinol*. 1995 Aug 30;113(1):89-98.

[Colston KW, Feldman D.](#) Demonstration of a 1,25-dihydroxycholecalciferol cytoplasmic receptor-like binder in mouse kidney. *J Clin Endocrinol Metab*. 1979 Nov;49(5):798-800.

[Costa EM, Hirst MA, Feldman D.](#) Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors by vitamin D analogs in cultured mammalian cells. *Endocrinology*. 1985 Nov;117(5):2203-10.

[Costa EM, Feldman D.](#) Homologous up-regulation of the 1,25 (OH)₂ vitamin D₃ receptor in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986 Jun 13;137(2):742-7.

[Costa EM, Feldman D.](#) Modulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor binding and action by sodium butyrate in cultured pig kidney cells (LLC-PK1). *J Bone Miner Res*. 1987 Apr;2(2):151-9.

[Craig TA, Benson LM, Naylor S, Kumar R.](#) Modulation effects of zinc on the formation of vitamin D receptor and retinoid X receptor alpha-DNA transcription complexes: analysis by microelectrospray mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2001;15(12):1011-6.

[Cross HS, Bareis P, Hofer H, Bischof MG, Bajna E, Kriwanek S, Bonner E, Peterlik M.](#) 25-Hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. *Steroids*. 2001 Mar-May;66(3-5):287-92.

[Davidson MB, Kaplan SA.](#) Increased insulin binding by hepatic plasma membranes from diabetic rats: normalization by insulin therapy. *J Clin Invest*. 1977 Jan;59(1):22-30.

[Darwish HM, DeLuca HF.](#) Recent advances in the molecular biology of vitamin D action. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1996;53:321-44. Review.

[DeLuca HF.](#) The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEB J*. 1988 Mar 1;2(3):224-36. Review.

[DeLuca HF, Cantorna MT.](#) Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J*. 2001 Dec;15(14):2579-85. Review.

[Demay MB, Kiernan MS, DeLuca HF, Kronenberg HM.](#) Characterization of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor interactions with target sequences in the rat osteocalcin gene. *Mol Endocrinol.* 1992 Apr;6(4):557-62.

[de Souza CJ, Hirshman MF, Horton ES.](#) CL-316,243, a beta3-specific adrenoceptor agonist, enhances insulin-stimulated glucose disposal in nonobese rats. *Diabetes.* 1997 Aug;46(8):1257-63.

[Di Girolamo M, Mendlinger S, Fertig JW.](#) A simple method to determine fat cell size and number in four mammalian species. *Am J Physiol.* 1971 Sep;221(3):850-8.

[Dyanan WS, Tjian R.](#) The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell.* 1983 Nov;35(1):79-87.

[Eizirik DL, Migliorini RH.](#) Reduced diabetogenic effect of streptozotocin in rats previously adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. *Diabetes.* 1984 Apr;33(4):383-8.

[Evans RM.](#) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 1988 May 13;240(4854):889-95. Review.

[Faraco JH, Morrison NA, Baker A, Shine J, Frossard PM.](#) A polymorphism at the human vitamin D receptor gene locus. *Nucleic Acids Res.* 1989 Mar 11;17(5):2150.

[Feinberg AP, Vogelstein B.](#) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum. *Anal Biochem.* 1984 Feb;137(1):266-7.

[Frazer TE, White NH, Hough S, Santiago JV, McGee BR, Bryce G, Mallon J, Avioli LV.](#) Alterations in circulating vitamin D metabolites in the young insulin-dependent diabetic. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981 Dec;53(6):1154-9.

[Freedman LP, Luisi BF.](#) On the mechanism of DNA binding by nuclear hormone receptors: a structural and functional perspective. *J Cell Biochem.* 1993 Feb;51(2):140-50. Review.

[Gallacher SJ, Fenner JA, Fisher BM, Quin JD, Fraser WD, Logue FC, Cowan RA, Boyle IT, MacCuish AC.](#) An evaluation of bone density and turnover in premenopausal women with type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 1993 Mar;10(2):129-33.

[Gedik O, Akalin S.](#) Effects of vitamin D deficiency and repletion on insulin and glucagon secretion in man. *Diabetologia.* 1986 Mar;29(3):142-5.

[Gil G, Smith JR, Goldstein JL, Slaughter CA, Orth K, Brown MS, Osborne TF.](#) Multiple genes encode nuclear factor 1-like proteins that bind to the promoter for

3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Dec;85(23):8963-7.

[Gliemann J, Osterlind K, Vinten J, Gammeltoft S.](#) A procedure for measurement of distribution spaces in isolated fat cells. Biochim Biophys Acta. 1972 Nov 24;286(1):1-9. No abstract available.

[Gloss B, Yeo-Gloss M, Meistererst M, Rogge L, Winnacker EL, Bernard HU.](#) Clusters of nuclear factor I binding sites identify enhancers of several papillomaviruses but alone are not sufficient for enhancer function. Nucleic Acids Res. 1989 May 11;17(9):3519-33.

[Goff JP, Reinhardt TA, Beckman MJ, Horst RL.](#) Contrasting effects of exogenous 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25-(OH)₂D] versus endogenous 1,25-(OH)₂D, induced by dietary calcium restriction, on vitamin D receptors. Endocrinology. 1990 Feb;126(2):1031-5.

[Goldstein BJ, Muller-Wieland D, Kahn CR.](#) Variation in insulin receptor messenger ribonucleic acid expression in human and rodent tissues. Mol Endocrinol. 1987 Nov;1(11):759-66.

[Goldstein BJ, Dudley AL.](#) The rat insulin receptor: primary structure and conservation of tissue-specific alternative messenger RNA splicing. Mol Endocrinol. 1990 Feb;4(2):235-44.

[Harris P, Ralph P.](#) Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. J Leukoc Biol. 1985 Apr;37(4):407-22.

[Hass R, Bartels H, Topley N, Hadam M, Kohler L, Goppelt-Strube M, Resch K.](#) TPA-induced differentiation and adhesion of U937 cells: changes in ultrastructure, cytoskeletal organization and expression of cell surface antigens. Eur J Cell Biol. 1989 Apr;48(2):282-93.

[Hass R, Brach M, Gunji H, Kharbanda S, Kufe D.](#) Inhibition of EGR-1 and NF-kappa B gene expression by dexamethasone during phorbol ester-induced human monocytic differentiation. Biochem Pharmacol. 1992 Oct 20;44(8):1569-76.

[Haussler CA, Marion SL, Pike JW, Haussler MR.](#) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits the clonogenic growth of transformed cells via its receptor. Biochem Biophys Res Commun. 1986 Aug 29;139(1):136-43.

[Haussler MR, Mangelsdorf DJ, Komm BS, Terpening CM, Yamaoka K, Allegretto EA, Baker AR, Shine J, McDonnell DP, Hughes M, et al.](#) Molecular biology of the vitamin D hormone. Recent Prog Horm Res. 1988;44:263-305. Review.

[Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW.](#) The nuclear vitamin D receptor: biological and

molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res.* 1998 Mar;13(3):325-49. Review.

[Herbert V, Lau KS, Gottlieb CW, Bleicher SJ.](#) Coated charcoal immunoassay of insulin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1965 Oct;25(10):1375-84.

[Hewison M, Barker S, Brennan A, Katz DR, O'Riordan JL.](#) Modulation of myelomonocytic U937 cells by vitamin D metabolites. *Bone Miner.* 1989 Mar;5(3):323-33.

[Hewison M.](#) Vitamin D and the immune system. *J Endocrinol.* 1992 Feb;132(2):173-5. Review.

[Hilger-Eversheim K, Moser M, Schorle H, Buettner R.](#) Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene.* 2000 Dec 30;260(1-2):1-12. Review.

[Hilliard GM 4th, Cook RG, Weigel NL, Pike JW.](#) 1,25-dihydroxyvitamin D₃ modulates phosphorylation of serine 205 in the human vitamin D receptor: site-directed mutagenesis of this residue promotes alternative phosphorylation. *Biochemistry.* 1994 Apr 12;33(14):4300-11.

[Hirschhorn RR, Aller P, Yuan ZA, Gibson CW, Baserga R.](#) Cell-cycle-specific cDNAs from mammalian cells temperature sensitive for growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Oct;81(19):6004-8.

Holick MF. Vitamin D: the underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and health. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 2002; 9: 87-98.

[Holman GD, Kasuga M.](#) From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport. *Diabetologia.* 1997 Sep;40(9):991-1003. Review.

[Hough S, Russell JE, Teitelbaum SL, Avioli LV.](#) Calcium homeostasis in chronic streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat. *Am J Physiol.* 1982 Jun;242(6):E451-6.

[Hsieh JC, Jurutka PW, Galligan MA, Terpening CM, Haussler CA, Samuels DS, Shimizu Y, Shimizu N, Haussler MR.](#) Human vitamin D receptor is selectively phosphorylated by protein kinase C on serine 51, a residue crucial to its trans-activation function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Oct 15;88(20):9315-9.

[Hsieh JC, Whitfield GK, Oza AK, Dang HT, Price JN, Galligan MA, Jurutka PW, Thompson PD, Haussler CA, Haussler MR.](#) Characterization of unique DNA-binding and transcriptional-activation functions in the carboxyl-terminal extension of the zinc finger region in the human vitamin D receptor. *Biochemistry.* 1999 Dec 7;38(49):16347-58.

[Huang Y, Ishizuka T, Miura A, Kajita K, Ishizawa M, Kimura M, Yamamoto Y, Kawai Y, Morita H, Uno Y, Yasuda K.](#) Effect of 1 alpha,25-dihydroxy vitamin D₃ and vitamin E on insulin-induced glucose uptake in rat adipocytes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2002 Mar;55(3):175-83.

[Hughes MR, y col.,](#) 1978 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ receptors in parathyroid glands. Preliminary characterization of cytoplasmic and nuclear binding components. *J Biol Chem.* 1978 Feb 25;253(4):1065-73.

[Inaba M, DeLuca HF.](#) Stabilization of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in the human leukemia cell line, HL-60, with diisopropylfluorophosphate. *Biochim Biophys Acta.* 1989 Jan 17;1010(1):20-7.

[Jakob F, Gieseler F, Tresch A, Hammer S, Seufert J, Schneider D.](#) Kinetics of nuclear translocation and turnover of the vitamin D receptor in human HL60 leukemia cells and peripheral blood lymphocytes--coincident rise of DNA-relaxing activity in nuclear extracts. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992 Mar;42(1):11-6.

[Je HD, Shin CY, Park HS, Huh IH, Sohn UD.](#) The comparison of vitamin C and vitamin E on the protein oxidation of diabetic rats. *J Auton Pharmacol.* 2001 Oct-Dec;21(5-6):231-6.

[Jurutka PW, Hsieh JC, MacDonald PN, Terpening CM, Haussler CA, Haussler MR, Whitfield GK.](#) (a) Phosphorylation of serine 208 in the human vitamin D receptor. The predominant amino acid phosphorylated by casein kinase II, in vitro, and identification as a significant phosphorylation site in intact cells. *J Biol Chem.* 1993 Mar 25;268(9):6791-9.

[Jurutka PW, Hsieh JC, Haussler MR.](#) (b) Phosphorylation of the human 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor by cAMP-dependent protein kinase, in vitro, and in transfected COS-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 Mar 31;191(3):1089-96.

[Jurutka PW, Hsieh JC, Nakajima S, Haussler CA, Whitfield GK, Haussler MR.](#) Human vitamin D receptor phosphorylation by casein kinase II at Ser-208 potentiates transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 16;93(8):3519-24.

[Jurutka PW, Remus LS, Whitfield GK, Thompson PD, Hsieh JC, Zitzer H, Tavakkoli P, Galligan MA, Dang HT, Haussler CA, Haussler MR.](#) The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Mol Endocrinol.* 2000 Mar;14(3):401-20.

[Kahn CR.](#) Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes.* 1994 Aug;43(8):1066-84. Review.

[Kahn CR.](#) Diabetes. Causes of insulin resistance. *Nature*. 1995 Feb 2;373(6513):384-5.

[Kanai F, Ito K, Todaka M, Hayashi H, Kamohara S, Ishii K, Okada T, Hazeki O, Ui M, Ebina Y.](#) Insulin-stimulated GLUT4 translocation is relevant to the phosphorylation of IRS-1 and the activity of PI3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Sep 15;195(2):762-8.

[Kasuga M, Akanuma Y, Iwamoto Y, Kosaka K.](#) Insulin binding and glucose metabolism in adipocytes of streptozotocin-diabetic rats. *Am J Physiol*. 1978 Aug;235(2):E175-82.

[Karnieli E, Hissin PJ, Simpson IA, Salans LB, Cushman SW.](#) A possible mechanism of insulin resistance in the rat adipose cell in streptozotocin-induced diabetes mellitus. Depletion of intracellular glucose transport systems. *J Clin Invest*. 1981 Sep;68(3):811-4.

[Kellerer M, Lammers R, Haring HU.](#) Insulin signal transduction: possible mechanisms for insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1999;107(2):97-106. Review.

[Kim HS, Lee JK, Tsai SY.](#) E1a activation of insulin receptor gene expression is mediated by Sp1-binding sites. *Mol Endocrinol*. 1995 Feb;9(2):178-86.

[Kizaki M, Norman AW, Bishop JE, Lin CW, Karmakar A, Koeffler HP.](#) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ receptor RNA: expression in hematopoietic cells. *Blood*. 1991 Mar 15;77(6):1238-47.

[Knott RM, Hesketh JE, Trayhurn P.](#) Insulin receptor gene expression in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Soc Trans*. 1990 Dec;18(6):1263.

[Kobayashi M, Olefsky JM.](#) Effects of streptozotocin-induced diabetes on insulin binding, glucose transport, and intracellular glucose metabolism in isolated rat adipocytes. *Diabetes*. 1979 Feb;28(2):87-95.

[Koshiishi I, Mitani H, Sumita T, Imanari T.](#) 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) prevents the conversion of adipose tissue into fibrous tissue in skin exposed to chronic UV irradiation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2001 Jun 1;173(2):99-104.

[Koszewski NJ, Malluche HH, Russell J.](#) Vitamin D receptor interactions with positive and negative DNA response elements: an interference footprint comparison. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2000 Mar;72(3-4):125-32.

[Kream BE, Yamada S, Schnoes HK, DeLuca HF.](#) (a) Specific cytosol-binding protein for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in rat intestine. *J Biol Chem*. 1977 Jul 10;252(13):4501-5.

[Kream BE, Jose M, Yamada S, DeLuca HF.](#) (b) A specific high-affinity binding macromolecule for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in fetal bone. *Science*. 1977 Sep 9;197(4308):1086-8.

[Labarca C, Paigen K.](#) A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem*. 1980 Mar 1;102(2):344-52. No abstract available.

[Labuda M, Fujiwara TM, Ross MV, Morgan K, Garcia-Heras J, Ledbetter DH, Hughes MR, Glorieux FH.](#) Two hereditary defects related to vitamin D metabolism map to the same region of human chromosome 12q13-14. *J Bone Miner Res*. 1992 Dec;7(12):1447-53.

[Lamothe B, Baudry A, Desbois P, Lamotte L, Bucchini D, De Meyts P, Joshi RL.](#) Genetic engineering in mice: impact on insulin signalling and action. *Biochem J*. 1998 Oct 15;335 (Pt 2):193-204. Review.

[Leal MA, Cabañas C, Rius C, Aller P, Calle C.](#) Modulation by dexamethasone of insulin binding and insulin receptor mRNA levels in U-937 human promonocytic cells. *Biochimie*. 1992 Jun;74(6):545-9.

[Leal MA, Aller P, Mas A, Calle C.](#) The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on insulin binding, insulin receptor mRNA levels, and isotype RNA pattern in U-937 human promonocytic cells. *Exp Cell Res*. 1995 Apr;217(2):189-94.

[Leal MA, Aller P, Calle C.](#) Effect of dexamethasone on insulin receptor mRNA levels, RNA stability and isotype RNA pattern in U-937 human promonocytic cells. *J Endocrinol Invest*. 1996 Sep;19(8):530-4.

[Lee JK, Tam JW, Tsai MJ, Tsai SY.](#) Identification of cis- and trans-acting factors regulating the expression of the human insulin receptor gene. *J Biol Chem*. 1992 Mar 5;267(7):4638-45.

[Lee JK, Tsai SY.](#) Multiple hormone response elements can confer glucocorticoid regulation on the human insulin receptor gene. *Mol Endocrinol*. 1994 May;8(5):625-34.

[Lee S, Clark SA, Gill RK, Christakos S.](#) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and pancreatic beta-cell function: vitamin D receptors, gene expression, and insulin secretion. *Endocrinology*. 1994 Apr;134(4):1602-10

[Lee Y, Inaba M, DeLuca HF, Mellon WS.](#) Immunological identification of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in human promyelocytic leukemic cells (HL-60) during homologous regulation. *J Biol Chem*. 1989 Aug 15;264(23):13701-5.

[Levy JR, Krystal G, Glickman P, Dastvan F.](#) Effects of media conditions, insulin, and dexamethasone on insulin-receptor mRNA and promoter activity in HepG2 cells. *Diabetes*. 1991 Jan;40(1):58-65.

[Levy JR, Hug V.](#) Regulation of insulin receptor gene expression. Cell cycle-mediated effects on insulin receptor mRNA stability. *J Biol Chem.* 1992 Dec 15;267(35):25289-95.

[Levy JR, Hug V.](#) Nuclear protein-binding analysis of a GC-rich insulin-receptor promoter regulatory region. *Diabetes.* 1993 Jan;42(1):66-73.

[Levy JR, Hannah S, Mooney RL, Hug V, Stevens W.](#) Sequence and functional characterization of the terminal exon of the human insulin receptor gene. *Biochim Biophys Acta.* 1995 Sep 19;1263(3):253-7.

[Lienhard GE.](#) Insulin. Life without the IRS. *Nature.* 1994 Nov 10;372(6502):128-9.

[Liggett SB.](#) Beta-adrenoceptor-effector system of the human macrophage U937 cell line. *Eur J Pharmacol.* 1989 Apr 12;163(1):171-4.

[Liu M, Iavarone A, Freedman LP.](#) (b) Transcriptional activation of the human p21(WAF1/CIP1) gene by retinoic acid receptor. Correlation with retinoid induction of U937 cell differentiation. *J Biol Chem.* 1996 Dec 6;271(49):31723-8.

[Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP.](#) (a) Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D₃ leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev.* 1996 Jan 15;10(2):142-53.

[Liu SM, Koszewski N, Lupez M, Malluche HH, Olivera A, Russell J.](#) Characterization of a response element in the 5'-flanking region of the avian (chicken) PTH gene that mediates negative regulation of gene transcription by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and binds the vitamin D₃ receptor. *Mol Endocrinol.* 1996 Feb;10(2):206-15.

[MacDonald PN, Whitfield GK, Haussler CA, Hocker AM, Haussler MR, Komm BS.](#) Evaluation of a putative vitamin D response element in the avian calcium binding protein gene. *DNA Cell Biol.* 1992 Jun;11(5):377-83.

[MacDonald PN, Baudino TA, Tokumaru H, Dowd DR, Zhang C.](#) Vitamin D receptor and nuclear receptor coactivators: crucial interactions in vitamin D-mediated transcription. *Steroids.* 2001 Mar-May;66(3-5):171-6. Review.

[Maki T, Andersson LC, Kontula KK.](#) Expression and function of beta-adrenergic receptors in human hematopoietic cell lines. *Eur J Haematol.* 1992 Nov;49(5):263-8.

[Maksimovic-Ivanic D, Trajkovic V, Miljkovic DJ, Stojkovic MM, Stosic-Grujicic S.](#) Down-regulation of multiple low dose streptozotocin-induced diabetes by mycophenolate mofetil. *Clin Exp Immunol.* 2002 Aug;129(2):214-23.

[Mamula PW, Wong KY, Maddux BA, McDonald AR, Goldfine ID.](#) Sequence and analysis of promoter region of human insulin-receptor gene. *Diabetes*. 1988 Sep;37(9):1241-6.

[Mangelsdorf DJ, Pike JW, Haussler MR.](#) Avian and mammalian receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D₃: in vitro translation to characterize size and hormone-dependent regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Jan;84(2):354-8.

[Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, y col.](#) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995 Dec 15;83(6):835-9. Review.

[Mayor P, Calle C.](#) [Effect of streptozotocin at the insulin pre-receptor, receptor and post-receptor level in adipocytes of rats] *Rev Esp Fisiol*. 1987 Dec;43(4):445-53.

[McDonnell DP, Mangelsdorf DJ, Pike JW, Haussler MR, O'Malley BW.](#) Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. *Science*. 1987 Mar 6;235(4793):1214-7.

[McKeon C, Moncada V, Pham T, Salvatore P, Kadowaki T, Accili D, Taylor SI.](#) Structural and functional analysis of the insulin receptor promoter. *Mol Endocrinol*. 1990 Apr;4(4):647-56.

[McKeon C, Pham T.](#) Transactivation of the human insulin receptor gene by the CAAT/enhancer binding protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991 Jan 31;174(2):721-8.

[McKeon C, Accili D, Chen H, Pham T, Walker GE.](#) A conserved region in the first intron of the insulin receptor gene binds nuclear proteins during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Nov 26;240(3):701-6.

[Mezzetti G, Bagnara G, Monti MG, Bonsi L, Brunelli MA, Barbiroli B.](#) 1 alpha, 25-dihydroxycholecalciferol and human histiocytic lymphoma cell line (U-937): the presence of receptor and inhibition of proliferation. *Life Sci*. 1984 May 28;34(22):2185-91.

[Milde P, Merke J, Ritz E, Haussler MR, Rauterberg EW.](#) Immunohistochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors and estrogen receptors by monoclonal antibodies: comparison of four immunoperoxidase methods. *J Histochem Cytochem*. 1989 Nov;37(11):1609-17.

[Minta JO, Pambrun L.](#) In vitro induction of cytologic and functional differentiation of the immature human monocytelike cell line U-937 with phorbol myristate acetate. *Am J Pathol*. 1985 Apr;119(1):111-26.

[Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, Inoue Y, Morita K, Takeda E, Pike JW.](#) Structural organization of the human

vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol.* 1997 Jul;11(8):1165-79.

[Murali B, Goyal RK.](#) Effect of chronic treatment with losartan on streptozotocin induced diabetic nephropathy. *Clin Exp Hypertens.* 2001 Oct;23(7):513-20.

[Myers MG Jr, White MF.](#) Insulin signal transduction and the IRS proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996;36:615-58. Review.

[Naar AM, Boutin JM, Lipkin SM, Yu VC, Holloway JM, Glass CK, Rosenfeld MG.](#) The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell.* 1991 Jun 28;65(7):1267-79.

[Nakajima S, Hsieh JC, MacDonald PN, Galligan MA, Haussler CA, Whitfield GK, Haussler MR.](#) The C-terminal region of the vitamin D receptor is essential to form a complex with a receptor auxiliary factor required for high affinity binding to the vitamin D-responsive element. *Mol Endocrinol.* 1994 Feb;8(2):159-72.

Nakajima S, Yamagata M, Ozono K. Effects of cyclic adenosine monophosphate and protein kinase-A on ligand-dependent transactivation via D receptor. *J Bone Miner Res* 1996;(Suppl 1):S162.

[Nilsson K, Forsbeck K, Gidlund M, Sundstrom C, Totterman T, Sallstrom J, Venge P.](#) Surface characteristics of the U-937 human histiocytic lymphoma cell line: specific changes during inducible morphologic and functional differentiation in vitro. *Hamatol Bluttransfus.* 1981;26:215-21.

[Norman AW, Frankel JB, Heldt AM, Grodsky GM.](#) Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science.* 1980 Aug 15;209(4458):823-5.

[Norman AW, Henry HL, Bishop JE, Song XD, Bula C, Okamura WH.](#) Different shapes of the steroid hormone 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ act as agonists for two different receptors in the vitamin D endocrine system to mediate genomic and rapid responses. *Steroids.* 2001 Mar-May;66(3-5):147-58. Review.

[Nyomba BL, Bouillon R, Lissens W, Van Baelen H, De Moor P.](#) 1,25-Dihydroxyvitamin D and vitamin D-binding protein are both decreased in streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology.* 1985 Jun;116(6):2483-8.

[Nyomba BL, Bouillon R, Bidingija M, Kandjingu K, De Moor P.](#) Vitamin D metabolites and their binding protein in adult diabetic patients. *Diabetes.* 1986 Aug;35(8):911-5.

[Ohyama Y, Ozono K, Uchida M, Yoshimura M, Shinki T, Suda T, Yamamoto O.](#) Functional assessment of two vitamin D-responsive elements in the rat 25-hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase gene. *J Biol Chem.* 1996 Nov 29;271(48):30381-5.

[Olsson I, Gullberg U, Ivhed I, Nilsson K.](#) Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937 by 1 alpha,25-dihydroxycholecalciferol. *Cancer Res.* 1983 Dec;43(12 Pt 1):5862-7.

[Olsson IL, Breitman TR.](#) (a) Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937 by retinoic acid and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-inducing agents. *Cancer Res.* 1982 Oct;42(10):3924-7.

[Olsson IL, Breitman TR, Gallo RC.](#) (b) Priming of human myeloid leukemic cell lines HL-60 and U-937 with retinoic acid for differentiation effects of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-inducing agents and a T-lymphocyte-derived differentiation factor. *Cancer Res.* 1982 Oct;42(10):3928-33.

[Ozono K, Liao J, Kerner SA, Scott RA, Pike JW.](#) The vitamin D-responsive element in the human osteocalcin gene. Association with a nuclear proto-oncogene enhancer. *J Biol Chem.* 1990 Dec 15;265(35):21881-8.

[Ozono K, Yamagata M, Ohyama Y, Nakajima S.](#) Direct repeat 3-type element lacking the ability to bind to the vitamin D receptor enhances the function of a vitamin D-responsive element. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1998 Sep;66(5-6):263-9.

[Pacold ST, Blackard WG.](#) Central nervous system insulin receptors in normal and diabetic rats. *Endocrinology.* 1979 Dec;105(6):1452-7.

[Palacios R, Ivhed I, Sideras P, Nilsson K, Sugawara I, Fernandez C.](#) Accessory function of human tumor cell lines. I. Production of interleukin 1 by the human histiocytic lymphoma cell line U-937. *Eur J Immunol.* 1982 Oct;12(10):895-9.

[Pan LC, Price PA.](#) Ligand-dependent regulation of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in rat osteosarcoma cells. *J Biol Chem.* 1987 Apr 5;262(10):4670-5.

[Pan P, Reddy K, Lee S, Studzinski GP.](#) Differentiation-related regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor mRNA in human leukaemia cells HL-60. *Cell Prolif.* 1991 Mar;24(2):159-70.

[Papachristodoulou DK, Bass PS, Davey P, Thomas JH.](#) Insulin binding and degradation by kidney cell membranes of streptozotocin-diabetic rats. *Horm Metab Res.* 1982 Jul;14(7):345-50.

[Perlmann T, Rangarajan PN, Umesono K, Evans RM.](#) Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. *Genes Dev.* 1993 Jul;7(7B):1411-22.

[Philippe J, Halban PA, Gjinovci A, Duckworth WC, Estreicher J, Renold AE.](#) Increased clearance and degradation of [3H]insulin in streptozotocin diabetic rats. *J Clin Invest.* 1981 Mar;67(3):673-80.

[Pike JW.](#) (a) Receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in chick pancreas: a partial physical and functional characterization. *J Steroid Biochem.* 1982 Mar;16(3):385-95.

[Pike JW, Donaldson CA, Marion SL, Haussler MR.](#) (b) Development of hybridomas secreting monoclonal antibodies to the chicken intestinal 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Dec;79(24):7719-23.

[Pike JW.](#) Intracellular receptors mediate the biologic action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Nutr Rev.* 1985 Jun;43(6):161-8. Review.

[Polly P, Carlberg C, Eisman JA, Morrison NA.](#) Identification of a vitamin D₃ response element in the fibronectin gene that is bound by a vitamin D₃ receptor homodimer. *J Cell Biochem.* 1996 Mar 1;60(3):322-33.

[Proud CG, Denton RM.](#) Molecular mechanisms for the control of translation by insulin. *Biochem J.* 1997 Dec 1;328 (Pt 2):329-41. Review.

[Ralph P, Moore MA, Nilsson K.](#) Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp Med.* 1976 Jun 1;143(6):1528-33.

[Reaven GM, Chang H, Hoffman BB, Azhar S.](#) Resistance to insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes isolated from spontaneously hypertensive rats. *Diabetes.* 1989 Sep;38(9):1155-60.

[Rius C, Zorrilla AR, Cabanas C, Mata F, Bernabeu C, Aller P.](#) Differentiation of human promonocytic leukemia U-937 cells with DNA topoisomerase II inhibitors: induction of vimentin gene expression. *Mol Pharmacol.* 1991 Apr;39(4):442-8.

[Rius C, Aller P.](#) Vimentin expression as a late event in the in vitro differentiation of human promonocytic cells. *J Cell Sci.* 1992 Feb;101 (Pt 2):395-401.

[Robert A, Grunberger G, Carpenter JL, Dayer JM, Orci L, Gorden P.](#) The insulin receptor of a human monocyte-like cell line: characterization and function. *Endocrinology.* 1984 Jan;114(1):247-53.

[Rochel N, Wurtz JM, Mitschler A, Klaholz B, Moras D.](#) The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Mol Cell.* 2000 Jan;5(1):173-9.

[Rodland O, Markestad T, Aksnes L, Aarskog D.](#) Plasma concentrations of vitamin D metabolites during puberty of diabetic children. *Diabetologia.* 1985 Sep;28(9):663-6.

[Rots NY, Iavarone A, Bromleigh V, Freedman LP.](#) Induced differentiation of U937 cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ involves cell cycle arrest in G₁ that is preceded

by a transient proliferative burst and an increase in cyclin expression. *Blood*. 1999 Apr 15;93(8):2721-9.

[Rouis M, Thomopoulos P, Louache F, Testa U, Hervy C, Titeux M.](#) Differentiation of U-937 human monocyte-like cell line by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ or by retinoic acid. Opposite effects on insulin receptors. *Exp Cell Res*. 1985 Apr;157(2):539-43.

[Rudnicki PM, Molsted-Pedersen L.](#) Effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol on glucose metabolism in gestational diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1997 Jan;40(1):40-4.

[Saffer JD, Jackson SP, Annarella MB.](#) Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Mol Cell Biol*. 1991 Apr;11(4):2189-99.

[Samson M, Fehlmann M, Morin O, Dolais-Kitabgi J, Freychet P.](#) Insulin and glucagon binding and stimulation of amino acid transport in isolated hepatocytes from streptozotocin diabetic rats. *Metabolism*. 1982 Aug;31(8):766-72.

[Sandgren ME, Bronnegard M, DeLuca HF.](#) Tissue distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in the male rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991 Dec 16;181(2):611-6.

Scatchard G. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Annu Acad Sci NY*. 1949; 51:660-672.

[Schneider LE, Schedl HP, McCain T, Haussler MR.](#) Experimental diabetes reduces circulating 1,25-dihydroxyvitamin D in the rat. *Science*. 1977 Jun 24;196(4297):1452-4.

[Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W.](#) Identification of a novel lymphoid specific octamer binding protein (OTF-2B) by proteolytic clipping bandshift assay (PCBA). *EMBO J*. 1988 Dec 20;7(13):4221-9.

[Schule R, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Bolado J, Pike JW, Evans RM.](#) Jun-Fos and receptors for vitamins A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene. *Cell*. 1990 May 4;61(3):497-504.

[Schwartz GG, Whitlatch LW, Chen TC, Lokeshwar BL, Holick MF.](#) Human prostate cells synthesize 1,25-dihydroxyvitamin D₃ from 25-hydroxyvitamin D₃. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1998 May;7(5):391-5.

[Sechi LA, Griffin CA, Grady EF, Grunfeld C, Kalinyak JE, Schambelan M.](#) Tissue-specific regulation of insulin receptor mRNA levels in rats with STZ-induced diabetes mellitus. *Diabetes*. 1992 Sep;41(9):1113-8.

[Seino S, Bell GI.](#) (a) Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Feb 28;159(1):312-6.

[Seino S, Seino M, Nishi S, Bell GI.](#) (b) Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Jan;86(1):114-8.

[Seino S, Seino M, Bell GI.](#) (a) Human insulin-receptor gene. Diabetes. 1990 Feb;39(2):129-33. Review.

[Seino S, Seino M, Bell GI.](#) (b) Human insulin-receptor gene. Partial sequence and amplification of exons by polymerase chain reaction. Diabetes. 1990 Jan;39(1):123-8.

[Shaffer PL, Gewirth DT.](#) Structural basis of VDR-DNA interactions on direct repeat response elements. EMBO J. 2002 May 1;21(9):2242-52

[Simpson RU, DeLuca HF.](#) Characterization of a receptor-like protein for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in rat skin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980 Oct;77(10):5822-6.

[Skouteris GG, Georgakopoulos E.](#) Hepatocyte growth factor-induced proliferation of primary hepatocytes is mediated by activation of phosphatidylinositol 3-kinase. Biochem Biophys Res Commun. 1996 Jan 5;218(1):229-33.

[Smith EL, Walworth NC, Holick MF.](#) Effect of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ on the morphologic and biochemical differentiation of cultured human epidermal keratinocytes grown in serum-free conditions. J Invest Dermatol. 1986 Jun;86(6):709-14.

[Soman V, Felig P.](#) Glucagon binding and adenylate cyclase activity in liver membranes from untreated and insulin-treated diabetic rats. J Clin Invest. 1978 Mar;61(3):552-60.

[Somjen D, Weisman Y, Berger E, Earon Y, Kaye AM, Binderman I.](#) Developmental changes in the responsiveness of rat kidney to vitamin D metabolites. Endocrinology. 1986 Jan;118(1):354-9

[Storm TL, Sorensen OH, Lund B, Lund B, Christiansen JS, Andersen AR, Lumholtz IB, Parving HH.](#) Vitamin D metabolism in insulin-dependent diabetes mellitus. Metab Bone Dis Relat Res. 1983;5(3):107-10.

[Stumpf WE, Sar M, Clark SA, DeLuca HF.](#) Brain target sites for 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Science. 1982 Mar 12;215(4538):1403-5.

[Stumpf WE, Denny ME.](#) Vitamin D (solatriol), light, and reproduction. Am J Obstet Gynecol. 1989 Nov;161(5):1375-84. Review

[Sundell K, Bishop JE, Bjornsson BT, Norman AW.](#) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in the Atlantic cod: plasma levels, a plasma binding component, and organ distribution of a high affinity receptor. Endocrinology. 1992 Nov;131(5):2279-86.

[Sundstrom C, Nilsson K.](#) Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer*. 1976 May 15;17(5):565-77.

[Sunn KL, Cock TA, Crofts LA, Eisman JA, Gardiner EM.](#) Novel N-terminal variant of human VDR. *Mol Endocrinol*. 2001 Sep;15(9):1599-609.

[Tanaka Y, Seino Y, Ishida M, Yamaoka K, Satomura K, Yabuuchi H, Seino Y, Imura H.](#) Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on insulin secretion: direct or mediated? *Endocrinology*. 1986 May;118(5):1971-6.

[Tancrede G, Rousseau-Mignerot S, Nadeau A.](#) Long-term changes in the diabetic state induced by different doses of streptozotocin in rats. *Br J Exp Pathol*. 1983 Apr;64(2):117-23.

[Tangpricha V, Flanagan JN, Whitlatch LW, Tseng CC, Chen TC, Holt PR, Lipkin MS, Holick MF.](#) 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase in normal and malignant colon tissue. *Lancet*. 2001 May 26;357(9269):1673-4.

[Testa U, Ferbus D, Gabbianelli M, Pascucci B, Boccoli G, Louache F, Thang MN.](#) Effect of endogenous and exogenous interferons on the differentiation of human monocyte cell line U937. *Cancer Res*. 1988 Jan 1;48(1):82-8.

[Tewari DS, Cook DM, Taub R.](#) Characterization of the promoter region and 3' end of the human insulin receptor gene. *J Biol Chem*. 1989 Sep 25;264(27):16238-45.

[Thomas PS.](#) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Sep;77(9):5201-5.

[Thompson PD, Jurutka PW, Haussler CA, Whitfield GK, Haussler MR.](#) Heterodimeric DNA binding by the vitamin D receptor and retinoid X receptors is enhanced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and inhibited by 9-cis-retinoic acid. Evidence for allosteric receptor interactions. *J Biol Chem*. 1998 Apr 3;273(14):8483-91.

[Tordjman KM, Leingang KA, James DE, Mueckler MM.](#) Differential regulation of two distinct glucose transporter species expressed in 3T3-L1 adipocytes: effect of chronic insulin and tolbutamide treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Oct;86(20):7761-5.

[Torres R, Calle C, Aller P, Mata F.](#) Etoposide stimulates 1,25-dihydroxyvitamin D₃ differentiation activity, hormone binding and hormone receptor expression in HL-60 human promyelocytic cells. *Mol Cell Biochem*. 2000 May;208(1-2):157-62.

[Tozzo E, Desbuquois B.](#) Effects of STZ-induced diabetes and fasting on insulin receptor mRNA expression and insulin receptor gene transcription in rat liver. *Diabetes*. 1992 Dec;41(12):1609-16.

[Tozzo E, Tessier F, Desbuquois B.](#) Expression of the hepatic insulin receptor gene in the rat during postnatal development. *Horm Metab Res.* 1995 Apr;27(4):163-8.

[Trinchieri G, Rosen M, Perussia B.](#) Induction of differentiation of human myeloid cell lines by tumor necrosis factor in cooperation with 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃. *Cancer Res.* 1987 May 1;47(9):2236-42.

[Tsoukas CD, Provvedini DM, Manolagas SC.](#) 1,25-dihydroxyvitamin D₃: a novel immunoregulatory hormone. *Science.* 1984 Jun 29;224(4656):1438-40.

[Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao YC, Tsubokawa M, et al.](#) Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature.* 1985 Feb 28-Mar 6;313(6005):756-61.

[Umesono K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM.](#) Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D₃ receptors. *Cell.* 1991 Jun 28;65(7):1255-66.

[Vaisanen S, Perakyla M, Karkkainen JI, Steinmeyer A, Carlberg C.](#) Critical role of helix 12 of the vitamin D₃ receptor for the partial agonism of carboxylic ester antagonists. *J Mol Biol.* 2002 Jan 11;315(2):229-38.

[Vann Bennett G, Cuatrecasas P.](#) Insulin receptor of fat cells in insulin-resistant metabolic states. *Science.* 1972 May 19;176(36):805-6.

[Vegeto E, Pollio G, Pellicciari C, Maggi A.](#) Estrogen and progesterone induction of survival of monoblastoid cells undergoing TNF-alpha-induced apoptosis. *FASEB J.* 1999 May;13(8):793-803.

[Ways DK, Dodd RC, Bennett TE, Hooker JL, Earp HS.](#) Effect of retinoic acid on phorbol ester-stimulated differentiation and protein kinase C-dependent phosphorylation in the U937 human monoblastoid cell. *Cancer Res.* 1988 Oct 15;48(20):5779-87.

[Webster NJ, Kong Y, Cameron KE, Resnik JL.](#) An upstream element from the human insulin receptor gene promoter contains binding sites for C/EBP beta and NF-1. *Diabetes.* 1994 Feb;43(2):305-12.

[Whitfield GK, Hsieh JC, Nakajima S, MacDonald PN, Thompson PD, Jurutka PW, Haussler CA, Haussler MR.](#) A highly conserved region in the hormone-binding domain of the human vitamin D receptor contains residues vital for heterodimerization with retinoid X receptor and for transcriptional activation. *Mol Endocrinol.* 1995 Sep;9(9):1166-79.

[Whittaker J, Cuthbert C, Hammond V, Alberti KG.](#) Impaired insulin binding to isolated adipocytes in experimental diabetic ketoacidosis. *Diabetologia.* 1981 Dec;21(6):563-8.

[Wieringa T, Krans HM.](#) Reduced glucose transport and increased binding of insulin in adipocytes from diabetic and fasted rats. *Biochim Biophys Acta*. 1978 Feb 1;538(3):563-70.

[Wilson HD, Horst RL, Schedl HP.](#) Calcium intake regulates 1,25-dihydroxy-vitamin D formation in the diabetic rat. *Diabetes*. 1982 May;31(5 Pt 1):401-5.

[Wingender E, Chen X, Fricke E, Geffers R, Hehl R, Liebich I, Krull M, Matys V, Michael H, Ohnhaus R, Pruss M, Schacherer F, Thiele S, Urbach S.](#) The TRANSFAC system on gene expression regulation. *Nucleic Acids Res*. 2001 Jan 1;29(1):281-3.

[Yang-Feng TL, Francke U, Ullrich A.](#) Gene for human insulin receptor: localization to site on chromosome 19 involved in pre-B-cell leukemia. *Science*. 1985 May 10;228(4700):728-31.

[Yoshizato K, Shirotani T, Furukawa N, Taguchi T, Motoshima H, Toyonaga T, Hirashima Y, Kawashima J, Ebina Y, Shichiri M, Araki E.](#) Identification of a cis-acting element and a novel trans-acting factor of the human insulin receptor gene in HepG2 and rat liver cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jan 19;280(2):428-34.

[Young P, King L, Cawthorne MA.](#) Increased insulin binding and glucose transport in white adipocytes isolated from C57B1/6 ob/ob mice treated with the thermogenic beta-adrenoceptor agonist BRL 26830. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985 Dec 17;133(2):457-61.

[Zanello SB, Collins ED, Marinissen MJ, Norman AW, Boland RL.](#) Vitamin D receptor expression in chicken muscle tissue and cultured myoblasts. *Horm Metab Res*. 1997 May;29(5):231-6.

[Zhang C, Baudino TA, Dowd DR, Tokumaru H, Wang W, MacDonald PN.](#) Ternary complexes and cooperative interplay between NCoA-62/Ski-interacting protein and steroid receptor coactivators in vitamin D receptor-mediated transcription. *J Biol Chem*. 2001 Nov 2;276(44):40614-20.

[Zhou L, Chen H, Xu P, Cong LN, Sciacchitano S, Li Y, Graham D, Jacobs AR, Taylor SI, Quon MJ.](#) Action of insulin receptor substrate-3 (IRS-3) and IRS-4 to stimulate translocation of GLUT4 in rat adipose cells. *Mol Endocrinol*. 1999 Mar;13(3):505-14.

[Zineb R, Zhor B, Odile W, Marthe RR.](#) Distinct, tissue-specific regulation of vitamin D receptor in the intestine, kidney, and skin by dietary calcium and vitamin D. *Endocrinology*. 1998 Apr;139(4):1844-52.

[Zou A, Elgort MG, Allegretto EA.](#) Retinoid X receptor (RXR) ligands activate the human 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase promoter via RXR heterodimer

binding to two vitamin D-responsive elements and elicit additive effects with 1,25-dihydroxyvitamin D₃. J Biol Chem. 1997 Jul 25;272(30):19027-34.