

Revisión

Modulación de la expresión de genes de incretinas mediada por nutrientes; revisión sistemática

R. Martínez-Rodríguez y A. Gil

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Centro de Investigación Biomédica. Universidad de Granada. Granada. España.

Resumen

Las incretinas son una serie de hormonas que tras una ingesta de alimentos son secretadas y liberadas al torrente sanguíneo por células enteroendocrinas del intestino, llegando al páncreas, donde producen un efecto potenciador en la liberación de insulina. El objetivo de este trabajo ha sido realizar una revisión sistemática de la modulación de la expresión génica de las incretinas mediada por nutrientes utilizando ecuaciones específicas de búsqueda en la base de datos PubMed. Las dos incretinas más relevantes son el péptido análogo al glucagón 1 (GLP-1) y el péptido insulínotropo dependiente de glucosa (GIP), que provienen de los precursores proglucagón y proGIP, respectivamente. GLP-1 es mayoritariamente sintetizado y secretado por las células L del íleon y del colon, a diferencia de GIP que lo hace por las células K de duodeno y yeyuno proximal. Se ha demostrado que la ruta canónica de señalización Wnt está estrechamente relacionada con la producción de estas hormonas, ya que el factor de transcripción TCF7L2 influye en la expresión génica de proglucagón y proGIP en células enteroendocrinas L y K. Por otra parte, se ha demostrado que la ruta biosintética de las hexosaminas es capaz de glicosilar la β -catenina, componente fundamental de la señalización canónica Wnt, lo que interfiere en la fosforilación de esta proteína, impidiendo así su degradación en el proteasoma. El aumento de la concentración de glucosa incrementa la ruta de las hexosaminas y de esta manera la glicosilación de la β -catenina. Esto produce una acumulación de esta proteína en el citoplasma celular y permite su entrada al núcleo, donde ejerce su acción al unirse a una serie de moléculas y factores de transcripción, permitiendo de este modo que se expresen los genes diana, entre los que se encuentran los de las hormonas incretinas. También hay evidencias de que la glucosa, a través de la ruta de las hexosaminas, es capaz de inducir la activación autocrina de la ruta de señalización Wnt estimulando la secreción de proteínas Wnt.

(*Nutr Hosp.* 2011;27:46-53)

DOI:10.3305/nh.2012.27.1.5437

Palabras clave: *Incretinas. Regulación de la expresión génica. Proteínas Wnt. Glicosilación.*

Correspondencia:

Ángel Gil.
 Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II.
 Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos.
 Centro de Investigación Biomédica.
 Universidad de Granada. Campus de la Salud.
 Avda. del Conocimiento, s/n.
 18100 Armilla. Granada. España.
 E-mail: agil@ugr.es

Recibido: 3-VIII-2011.

Aceptado: 8-VIII-2011.

GENE EXPRESSION MODULATION OF INCRETINS MEDIATED BY NUTRIENTS; A SYSTEMATIC REVIEW

Abstract

Incretins are a cluster of hormones which are secreted and released into the bloodstream after food intake by gut enteroendocrine cells, reaching to pancreas where produce a potentiating effect on insulin release. The aim of this study was to perform a systematic review of incretins gene expression mediated by nutrients using specific search equations in the PubMed database. The two most relevant incretins are GLP-1 and GIP, which come from proglucagon and proGIP precursor respectively. GLP-1 is mainly synthesized and released by ileum and colon L cells, in contrast to GIP which does it by K cells in duodenum and proximal jejunum. It has been shown that canonical Wnt signalling pathway is closely related to the production of these hormones, since transcription factor TCF7L2 affects proglucagon and proGIP gene expression in L and K enteroendocrine cells. On the other hand, it has been shown that the hexosamine biosynthetic pathway can produce N-linked glycosylation of β -catenin, an essential component of canonical Wnt signalling. This process hinders β -catenin phosphorylation and, thereby prevents proteasome degradation. Increasing glucose concentration enhances the hexosamine pathway and thus β -catenin glycosylation. This causes a β -catenin cytoplasmic accumulation allowing entry into nucleus, where it exerts its action by binding to a clump of molecules and transcription factors, allowing to express the target genes, including the incretin hormones. There is also evidence that glucose, through the hexosamine pathway, can induce autocrine activation of Wnt signalling pathway by stimulating secretion of Wnt proteins.

(*Nutr Hosp.* 2012;27:46-53)

DOI:10.3305/nh.2012.27.1.5437

Key words: *Incretins. Gene expression regulation. Wnt proteins. Glycosylation.*

Abreviaturas

- APC: Adenomatous polyposis coli.
 β -Trcp: Proteína que contiene repeticiones de transducina β .
 CBP: Proteína de unión a CREB.
 CK1: Caseína quinasa 1.
 DPP IV: Dipeptidil peptidasa IV.
 GFAT: Glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa.
 GIP: Péptido insulínico dependiente de glucosa.
 GLP-1: Péptido análogo al glucagón 1.
 GPR: Receptor acoplado a proteína G.
 GSK3: Glucógeno sintasa quinasa 3.
 HAT: Histona-acetiltransferasa.
 HBP: Ruta biosintética de las hexosaminas.
 HMT: Histona-metiltransferasa.
 LEF: Factor potenciador linfocitario.
 LRP: Proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad.
 OGA: N-acetil O-glucosaminasa.
 OGT: O-GlcNAc transferasa.
 PC: Prohormona convertasa.
 PPAR: Receptor activado por proliferador peroxisomal.
 TCF: Factor de células T.
 WRE: Elemento de respuesta a Wnt.

Introducción

El término incretina hace referencia al efecto de la liberación de insulina producido en respuesta a la ingesta de alimentos. Las incretinas son una serie de hormonas que incrementan de forma directa o indirecta esa secreción de insulina en las células de los islotes de Langerhans pancreáticos^{1,2}. En el organismo hay varias hormonas que producen este efecto de una forma indirecta³⁻⁷ (tabla I), pero que lo hagan directamente, actualmente sólo se conocen dos, lo que las convierte en las más importantes. Se trata del péptido insulínico dependiente de glucosa o GIP (anteriormente conocido como péptido inhibidor gástrico, *gastric inhibitory peptide*) y del péptido análogo al glucagón 1 o GLP-1 (*glucagon like peptide*)⁸. Pero la acción de estas hormonas no sólo se ciñe al páncreas y la liberación de la insulina, sino que juegan otros papeles en el organismo. GLP-1 suprime la secreción de glucagón, inhibe el vaciamiento gástrico y reduce el apetito y la ingesta de alimento⁹. También parece que mejora y aumenta la proliferación de células pancreáticas, protege a los miocitos del daño isquémico, regula la homeostasis de glucosa y tiene una función neuroprotectora¹⁰. Por otra parte, GIP puede que tenga una relación directa con la obesidad y el metabolismo lipídico^{10,11}, la remodelación ósea y, en el sistema nervioso central, un papel regulador en la proliferación de células progenitoras neurales y modificación del comportamiento¹⁰.

Tabla I
Hormonas con efecto incretina

Efecto directo	Efecto indirecto
GIP	Colecistoquinina Gastrina Ghrelin
GLP-1	Neurotensina Péptido PHI Péptido YY

Un estudio reciente en ratas, añade una posible relación entre GIP y la aclimatación al frío¹².

Las hormonas incretinas GIP y GLP-1 pertenecen a una superfamilia de péptidos glucagón y, por tanto, existe homología en la secuencia de aminoácidos entre ellos. GIP es un péptido de 42 aminoácidos que deriva de su precursor, ProGIP, mientras que GLP-1 lo hace del precursor proglucagón e incluye péptidos de 30 y 31 aminoácidos. El "efecto incretina" ha sido estudiado con la glucosa y se ha visto que cuando es ingerida por vía oral produce una respuesta insulínica mucho mayor que si se administrase por vía intravenosa, lo que indica que la secreción de GIP y GLP-1 se realiza en el tracto digestivo¹³ y, efectivamente, está mediada por dos tipos de células enteroendocrinas del epitelio gastrointestinal. Las células K, ubicadas principalmente en duodeno y yeyuno proximal, son las encargadas de segregar GIP. Las células L, que se encuentran en su mayoría en el íleon y colon, sintetizan y segregan GLP-1¹⁴. También se sabe que una pequeña cantidad de células del intestino delgado proximal, expresa tanto GLP-1 como GIP¹⁵. Se estima que la vía indirecta de las incretinas es la base de hasta un 70% de la secreción de insulina estimulada por glucosa en individuos sanos¹⁴. A nivel de la célula β pancreática, GIP y GLP-1 llegan a la circulación después de que la ingesta de alimentos proporcione una señal de cambio en la concentración de glucosa que amplifica la respuesta secretora, aumentando así la liberación de insulina en condiciones en las que más se necesita¹³. Estos efectos sobre la liberación final de insulina y la mejora de la homeostasis de glucosa, han generado una serie de expectativas sobre estas hormonas en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 y ha llevado al desarrollo de varias terapias basadas, principalmente en GLP-1.

El hecho de que estas hormonas se liberen cuando los alimentos llegan al sistema digestivo y la capacidad que se ha observado que tienen algunos nutrientes para potenciar o disminuir esta liberación¹⁶⁻¹⁸, hace pensar que exista también un sistema que regule su producción. Este es un tema que está poco estudiado y por lo tanto, la modulación de la expresión génica de incretinas mediada por nutrientes es, aún, una hipótesis. El objetivo de este trabajo es encontrar, mediante una revisión sistemática de la bibliografía disponible hasta la fecha, un mecanismo de regulación de la expresión

de genes de incretinas que esté influenciado por algún nutriente y dé una posible explicación a esta hipótesis.

Metodología

El trabajo se comenzó llevando a cabo una búsqueda de revisiones bibliográficas que permitieran abordar el tema desde una perspectiva amplia. La base de datos consultada para ello fue la que proporciona el recurso PubMed, del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de los Estados Unidos. La primera ecuación de búsqueda utilizada fue la siguiente: (“*Gene Expression Profiling*” [Mesh] OR “*Gene Expression*” [Mesh] OR “*Gene Expression Regulation, Developmental*” [Mesh] OR “*Gene Expression Regulation*” [Mesh]) AND “*Incretins*” [Mesh]. Esta primera consulta dio como resultado 9 artículos de los cuales 3 eran revisiones. Tras revisar los abstract de cada uno, se decidió completar la lectura de uno de ellos¹³.

Una vez establecidas las bases del conocimiento sobre incretinas, se desarrolló una búsqueda de artículos originales que dieran solución a la hipótesis de partida. Para ello se empleó la siguiente ecuación: (((“*Incretins/agonists*” [Mesh] OR “*Incretins/analogs and derivatives*” [Mesh] OR “*Incretins/biosynthesis*” [Mesh] OR “*Incretins/genetics*” [Mesh] OR “*Incretins/metabolism*” [Mesh] OR “*Incretins/physiology*” [Mesh] OR “*Incretins/secretion*” [Mesh] OR “*Incretins/therapeutic use*” [Mesh])) AND “*Gene Expression Regulation*” [Mesh]) NOT Review. Con ella se obtuvieron 6 resultados, de los cuales, tan sólo uno³⁴ dio una clave muy buena e importante para este trabajo de la regulación de la expresión génica en la síntesis de incretinas. Utilizando una ruta alternativa ((“*Incretins/biosynthesis*” [Mesh] OR “*Incretins/genetics*” [Mesh] OR “*Incretins/metabolism*” [Mesh]) NOT (“*review*” [Publication Type] OR “*review literature as topic*” [MeSH Terms] OR “*review*” [All Fields]) AND (“*2006/04/01*” [PDat]: “*2011/03/30*” [PDat]) AND (“*humans*” [MeSH Terms] AND “*2006/04/01*” [PDat]: “*2011/03/30*” [PDat])) se encontró una lista de 65 artículos entre los que fueron seleccionados varios no muy relevantes, pero que, tras su lectura, permitieran llegar a algún otro artículo de mayor interés. Con la ecuación “*Gene expression*” AND “*Incretins*” AND “*nutrient*” tampoco se logró ningún resultado concluyente, por lo que se llegó a la conclusión de que no existía ningún trabajo que hubiese estudiado lo que se estaba buscando.

Debido a la inexistencia de trabajos para la regulación génica mediada por nutrientes, la búsqueda se centró en la síntesis de incretinas ((“*Incretins/biosynthesis*” [Mesh]) NOT Review). Ya que varios artículos hacían referencia a la señalización Wnt como regulador de la síntesis de incretinas, se empezó a buscar una relación entre nutrientes y la ruta de señalización Wnt por medio de la ecuación “*Wnt Proteins*” [Mesh] AND “*Nutrients*” y de esta manera fue como se encontró un comentario del Biochemical Journal que se referen-

ciaba en un trabajo original que estudiaba justo lo que se estaba buscando³⁹.

El resto de trabajos consultados fueron tomados de las propias referencias que hacía cada trabajo en su bibliografía y también de consultas en diferentes recursos webs.

Mecanismos moleculares de secreción y regulación de la síntesis de incretinas

Las células L enteroendocrinas que sintetizan y liberan GLP-1 se encuentran dispersas por todo el intestino delgado y grueso, con mayor densidad en el íleon distal y el colon. GIP, por el contrario, es producido por un tipo de células anatómicamente distintas, conocidas como células K, que están, en su mayoría, ubicadas en el duodeno. Tal vez debido a eso, las concentraciones circulantes de GLP-1 y GIP presentan perfiles distintos después de la ingesta de alimentos. Dependiendo de la composición de la comida, la secreción de GLP-1 pueden presentar un perfil bifásico, con una fase temprana poco después de la ingesta de alimentos y con una duración de 15-30 min, y una fase tardía que persiste durante 1-2 horas o más. La secreción de GIP se produce con un retraso corto de tiempo similar y también pueden permanecer elevada durante varias horas. En humanos, la glucosa puede ser detectada en el duodeno proximal dentro de los 5 minutos tras la ingesta de una sobrecarga de glucosa líquida, correlacionándose con el tiempo necesario para ver la primera elevación rápida de la concentración de GLP-1 y GIP en sangre¹³. Por tanto, existen mecanismos de detección de nutrientes en estas células que permiten la pronta liberación de hormonas y posiblemente, la síntesis de las mismas.

Secreción de incretinas

La liberación de GIP se realiza rápidamente por la llegada de nutrientes en el duodeno, gracias a su alta densidad local de células K, sin embargo, estudios con infusión de glucosa en humanos mostraron que la secreción de GLP-1 es estimulada sólo cuando la tasa de entrada de glucosa en el duodeno excede la capacidad de absorción duodenal, es decir, cuando la glucosa no absorbida se filtra hasta el yeyuno y estimula potencialmente a las células L en esa región¹⁹. Pero la secreción no sólo se produce por ingesta de hidratos de carbono, sino que los otros dos macronutrientes, lípidos y proteínas, también la estimulan²⁰⁻²³. Tras la secreción tanto de GLP-1 como de GIP, se produce una rápida degradación de las hormonas, provocada por la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV)^{24,25}.

Existen varios receptores con siete dominios transmembrana muy ubicuos que son ampliamente activados por aminoácidos, hidratos de carbono o ácidos grasos libres y que se expresan en varios tejidos, entre los que está el tracto gastrointestinal. Esto ha llevado a la

hipótesis de que estos receptores pueden actuar como sensores de modulación de la ingesta de alimentos, por ejemplo, la liberación de las hormonas incretinas en el intestino²⁶. Los receptores acoplados a proteína G (GPRs), son proteínas integrales de membrana con siete hélices α . Los propios receptores de GIP y GLP-1 pertenecen a este grupo^{27,28}, pero en las células enteroendocrinas, se expresan varios tipos de GPRs, acoplados a G_s y G_q , que inducen la secreción de incretinas. Estos receptores actúan induciendo rutas de señalización, como AMPc y PKC (proteína quinasa C) el aumento de la concentración de calcio en la célula por medio de canales de calcio, lo que provoca la liberación de incretinas¹³.

Producción de incretinas

Procesamiento de la hormona

GLP-1 se escinde tras la traducción a partir del producto del gen proglucagón, que no sólo se expresa en las células L, sino también en las células del páncreas y un subconjunto de neuronas del tallo cerebral. El procesamiento alternativo de la prohormona es atribuible en gran medida a la expresión diferencial de las enzimas prohormona convertasas (PC). Mientras que las células pancreáticas expresan PC2 y generan el glucagón, las células L en el intestino expresan PC1/3 y producen los péptidos bioactivos GLP-1, GLP-2 y oxintomodulina. La fracción carboxilo terminal de proglucagón se procesa casi en su totalidad a GLP-1 y GLP-2 en células L, la región N-terminal es liberada como péptido activo oxintomodulina y el resto en forma de glicentina^{14,29,30}. Los análisis de expresión de genes en células L GLUTag, un modelo experimental, muestra que los niveles de RNAm de proglucagón y PC1/3 aumentan significativamente tras la incubación con glucosa, comparado con lactato. Por el contrario, el RNAm de PC2 no es regulado por glucosa tras 12 h de incubación, mientras que tanto glucosa como lactato tienden a incrementar su expresión tras 24 h. Los datos de este estudio muestran que la glucosa no sólo es un estímulo primario de liberación de GLP-1, sino también un modulador transcripcional positivo de niveles de RNAm de proglucagón y PC-1/3 en células L GLUTag³¹.

A diferencia de proglucagón, el precursor proGIP en las células K no se cree que contenga secuencias de péptidos bioactivos además de la de GIP. El procesamiento de proGIP en las células K, como el de proglucagón en células L, se atribuye a la acción de PC1/3³⁰.

Regulación de la síntesis

Existen varios trabajos que sostienen que la expresión de los genes de incretinas está regulada, principalmente, por la ruta de señalización Wnt, ya que un miembro de esta ruta, el factor de transcripción TCF7L2 o TCF-4

(factor de transcripción de células T, no confundir con el factor de transcripción 4), ha demostrado influir en la expresión génica intestinal tanto de proglucagón como de proGIP en células enteroendocrinas³²⁻³⁵. Además, el propio GLP-1 estimula de forma autocrina la ruta Wnt y ninguno de estos efectos han sido descritos en las células de los islotes pancreáticos¹⁴.

RUTA DE SEÑALIZACIÓN WNT

La señalización Wnt es un proceso extremadamente complejo que ha de ser cuidadosamente controlado, tanto temporal como espacialmente. Es de fundamental importancia para la diferenciación celular, comunicación célula-célula, formación y crecimiento de órganos. Las proteínas Wnt son ligandos glicoprotéicos secretados por células. Contienen un dominio conservado de aproximadamente 300 aminoácidos y está interrumpido por una secuencia de 21 a 23 residuos de cisteína que tienen un patrón espacial característico. Son poco solubles en agua debido a una cadena lipídica (palmitoil) ligada a un residuo conservado de cisteína. Muchas células, particularmente indiferenciadas o inflamatorias, secretan proteínas Wnt, pero otras también lo hacen en respuesta a estímulos. Las Wnt tienen un efecto dependiente de concentración, son transportadas a través de largas distancias y pueden actuar en células situadas lejos de donde fueron producidas. La activación Wnt se logra tanto por señalización paracrina como autocrina³⁶. Existen dos tipos de señalización Wnt, pero la importante para este trabajo es la ruta canónica de señalización.

La ruta canónica de señalización Wnt (fig. 1) ha sido bien definida por McDonald, Tamai y He³⁷. Funciona mediante la regulación del coactivador transcripcional β -catenina. En ausencia de Wnt, la β -catenina plasmática es constantemente degradada por la acción del complejo Axina, que está compuesto por la proteína de andamio axina, el supresor tumoral APC (*adenomatous polyposis coli*), la caseína quinasa 1 (CK1) y la glucógeno-sintasa quinasa 3 (GSK3). CK1 y GSK3 fosforilan secuencialmente la región amino terminal de la β -catenina, lo cual provoca el reconocimiento por parte de β -Trcp, una subunidad ligasa de la ubiquitina E3, y su consecuente ubiquitinación y degradación en el proteasoma. Esta continua eliminación de β -catenina previene su entrada en el núcleo y los genes diana de la ruta Wnt se mantienen, por tanto, reprimidos por la familia de proteínas del factor de células T ligado a DNA/factor potenciador linfoide (TCF/LEF). La ruta de señalización Wnt/ β -catenina se activa cuando un ligando se une al receptor transmembrana Frizzled (Fz) y a su correceptor, la proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad 6 ó 5 (LRP6/5). La formación del complejo Wnt-Fz-LRP6/5 junto con el reclutamiento de la proteína andamio Dishevelled (Dvl) da como resultado la fosforilación y activación del LRP y el anclaje del complejo axina a los recepto-

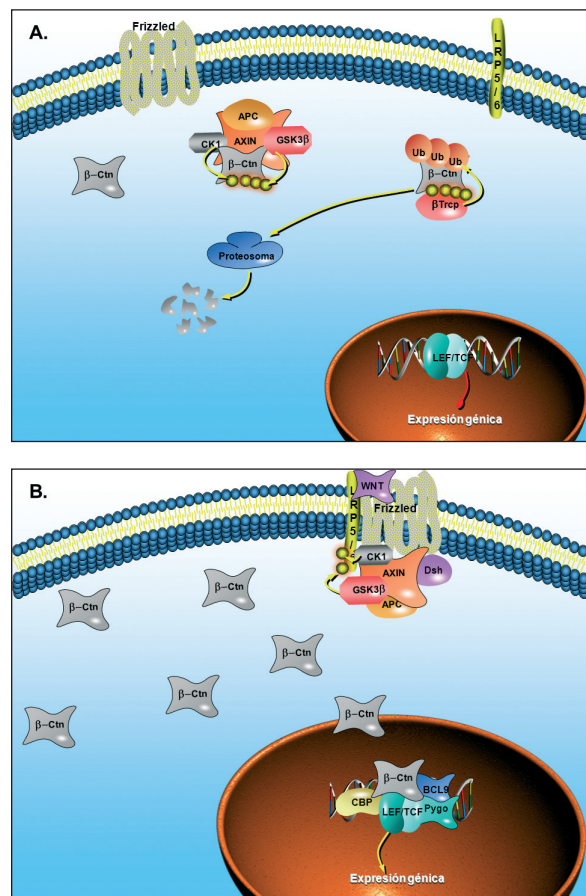


Fig. 1.—Representación simple de la ruta de señalización Wnt. El cuadro A simboliza la inactivación de la ruta mediante la fosforilación de β -catenina y su posterior degradación en el proteosoma. B representa la ruta activada, con la entrada de β -catenina al núcleo.

res. Este evento permite la inhibición de la fosforilación de β -catenina mediada por el complejo Axina y de esta manera, la estabilización de β -catenina, que se acumula en el citoplasma y puede viajar hasta el núcleo para formar complejos con TCF/LEF y activar la expresión génica diana de Wnt³⁷, que en células enteroendocrinas L y K conduce a la síntesis de GLP-1 y GIP respectivamente.

En 2008, Anagnostou y Shepherd publicaron un trabajo en el que se identificó una importante unión entre la detección de glucosa y la ruta de señalización Wnt/ β -catenina³⁸. Sus datos indican que la ruta de señalización Wnt responde a la concentración fisiológica de nutrientes. Uno de los primeros resultados obtenidos sugiere que la glucosa regula los niveles de β -catenina. En este estudio, se utilizaron líneas celulares de macrófagos (J774.2 y RAW264.7) porque habían demostrado previamente que tenían respuesta a glucosa. Además se ha visto que la β -catenina, en estas células, representa una *pool* citosólico y nuclear de β -catenina que está implicado en la transducción de señales Wnt y la activación transcripcional dependiente de TCF. En este estudio, las líneas celulares se mantuvieron durante un período

de inanición de glucosa. La restauración de los niveles de glucosa, dio como resultado un aumento rápido en los niveles de β -catenina dependiente de la dosis en ambas líneas celulares. Los cambios en los niveles de β -catenina se observaron entre 5 mM y 20 mM de glucosa, indicando que el efecto puede ocurrir dentro del rango fisiológico de concentraciones de glucosa³⁸.

RUTA DE LAS HEXOSAMINAS

En el trabajo realizado por Anagnostou y su colega Shepherd se dieron evidencias de que la ruta de las hexosaminas está implicada en la regulación de los niveles de β -catenina por varios motivos. El primero de ellos es que los efectos descritos anteriormente eran bloqueados por fármacos inhibidores de GFAT (glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa). Además se sabe que GFAT requiere glutamina como donador del grupo amino y el efecto de la glucosa desaparecía cuando no estaba presente la glutamina. La última evidencia de la influencia de la ruta de las hexosaminas fue que los efectos de la glucosa podían ser replicados administrando bajos niveles de glucosamina (GlcN), que puede entrar directamente en la ruta de las hexosaminas corriente abajo de GFAT³⁸.

La ruta biosintética de las hexosaminas (HBP, *Hexosamine Biosynthetic Pathway*) resulta en la producción de UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) y otros nucleótidos hexosaminas. UDP-GlcNAc es el producto principal y el donante único para la O-unión de una sola molécula de N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) a muchas proteínas citoplasmáticas y nucleares. Al entrar en la célula la glucosa es rápidamente fosforilada a glucosa-6-fosfato, que puede ser oxidada a través de la glucólisis o derivar a las pentosas fosfato o ser almacenada como glucógeno. En la glucólisis, la G6P se isomeriza a fructosa-6-fosfato (F6P) antes de que actúe la ruta. Aproximadamente el 2,5% de la F6P, y por esta razón de la glucosa, se desvía a la HBP. Como se ha comentado antes, GFAT cataliza la formación de glucosamina-6-fosfato, con la glutamina como donante de amina y la F6P como sustrato aceptor en el primer paso y limitante de la ruta. Posteriormente, la adición de un grupo acetil produce N-acetilglucosamina-6-fosfato, que es rápidamente modificado a UDP-GlcNAc. La utilización de glucosamina y de acetil en los primeros dos pasos une potencialmente el metabolismo de aminoácidos y de ácidos grasos con HBP³⁹.

La modificación reversible de las proteínas mediante adición y eliminación de GlcNAc, análoga a la adición y eliminación de fosfato, también tiene una compleja interacción con la modificación O-fosfato. Los sitios diana de la N-acetil-O-glicosilación están en los propios sitios de O-fosforilación o muy próximos a ellos. El ciclo de la GlcNAc se completa gracias a dos enzimas. Una de ellas es la OGT (O-GlcNAc transferasa), que cataliza la O-unión de GlcNAc con los residuos de

serina y treonina de la proteína diana. La otra es la OGA (O-GlcNacasa), que elimina la fracción hexosamina³⁹.

Debido a la amplia funcionalidad de las proteínas diana, la vía de las hexosaminas también se conoce como “ruta de señalización hexosamina”. El producto final UDP-GlcNAc, es un potente inhibidor de la GFAT y también modula la afinidad de OGT para sustratos individuales³⁹.

En el estudio de Anagnostou y Shepherd³⁸, se utilizó tunicamicina y 2DOG (2-deoxi-D-glucosa), inhibidores de la N-glicosilación y se demostró que esta glicosilación es la responsable del efecto de la glucosa en β -catenina pero el mecanismo por el cual se produce este efecto aún no está resuelto. En un primer momento se pensó que podía deberse a un aumento en la síntesis de cateninas, pero esta idea quedó anulada tras comprobarse que los niveles de RNAm de β -catenina no estaban afectados ni por glucosa ni por glucosamina o por ausencia de glutamina, así que es necesario buscar otra explicación³⁹.

RELACION ENTRE WNT Y HEXOSAMINAS

La fosforilación de β -catenina por GSK3 es un paso esencial en su marcaje para la degradación en el proteasoma, como ya se ha comentado. En un principio se pensó que bajos niveles de actividad de GSK3 podrían explicar el aumento de β -catenina, pero se vio que no era así. Sin embargo, se encontró que la relación de β -catenina total fosforilada disminuía con el tratamiento de glucosa o glucosamina, indicando que está ocurriendo menos fosforilación mediada por GSK3, estabilizándose así la β -catenina³⁸. La explicación que se le puede dar a esto, teniendo en cuenta los resultados de este trabajo y la fisiología de la ruta de las hexosaminas está representada en la figura 2. La glucosa afecta a la señalización Wnt de manera que la N-acetil-O-glicosilación de β -catenina obstaculiza la O-fosforilación mediada por GSK3, debido a una simple cuestión estructural, y esto conduce a un cambio conformacional que le permite evadir al complejo de destrucción y su posterior degradación en el proteasoma. De esta manera, empieza a aumentar la concentración de β -catenina en el citoplasma.

Además de estos efectos de la glucosa sobre β -catenina, también se ha visto que induce una activación autocrina de la ruta de señalización canónica Wnt. La glucosa podría estar estimulando la secreción de proteínas Wnt, ya que se sabe que la secreción de algunas Wnts requiere N-glicosilación y se ha visto regulación autocrina de la señalización Wnt. Otra hipótesis es que la glucosa podría estar regulando la N-glicosilación de las proteínas Fz o sus correceptores (LRP5/6). Esto podría estar alterando la señalización Wnt ya que se sabe que algunos receptores están regulados funcionalmente por N-glicosilación. Por ejemplo, hay evidencias de que LRP6 es N-glicosilado y esto afecta a la

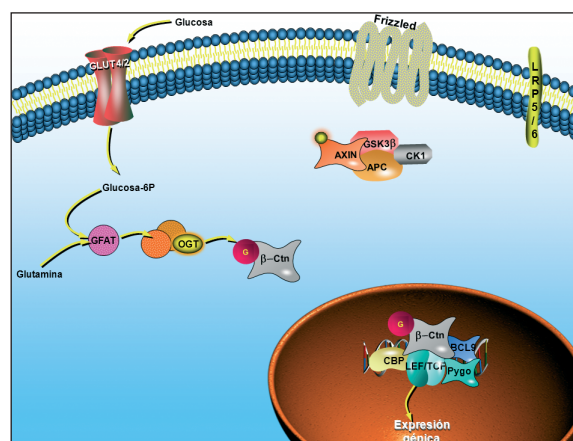


Fig. 2.—Representación simplificada de la relación entre la ruta biosintética de las hexosaminas y la ruta canónica de señalización Wnt.

capacidad de localización y señalización de este receptor. Para probar que, por cualquiera de estas hipótesis, se requería señalización extracelular de Wnt para el efecto de glucosa en β -catenina, Anagnostou y Shepherd, en primer lugar utilizaron Dkk1, que bloquea la interacción entre Wnt y el complejo Frizzled-LRP y, en segundo lugar, sFRP2, que también bloquea la señalización Wnt. En ambos casos se vio que el efecto de la glucosa sobre β -catenina no se producía, con lo que la ruta de señalización de Wnt, podría estar implicada en este efecto. Después de esto, los investigadores realizaron pruebas con un medio que contenía Wnt3a y tunicamicina (que bloquea la fosforilación de LRP6) y se demostró que el aumento en β -catenina inducido por glucosa se presenta debido a una activación autocrina del sistema de señalización Wnt y que esto implica a la ruta de las hexosaminas y la N-glicosilación de proteínas³⁸.

Regulación de la expresión génica

La familia de factores de transcripción unidos a DNA TCF/LEF son el acompañante principal de β -catenina en la regulación génica. TCF reprime la expresión génica interactuando con el represor Groucho (llamado TLE1 en humanos), que promueve la desacetilación de histonas y la compactación de la cromatina. La estabilización de β -catenina inducida por Wnt y su acumulación en el núcleo conducen a TCF a acomplejarse con β -catenina, lo cual desplaza a Groucho y se une a otros coactivadores para la activación de genes. Las proteínas TCF son factores HMG (*high mobility group*) de unión al DNA y además de unirse a una secuencia consenso de ADN denominada elemento de respuesta a Wnt (WRE), CCTTTGWW (representando W tanto T como A), causan una flexión importante del DNA que puede alterar la estructura local de la cromatina. TCF7L2 actúa tanto como represor como activador³⁷.

Se han identificado gran cantidad de coactivadores asociados a β -catenina. Este complejo multiproteico

incluye BCL9 y Pygopus (Pygo), un mediador (para la iniciación de la transcripción), p300/CBP e histonaacetiltransferasas (HATs) TRRAP/TIP60, histona-metiltransferasas (HMTs) MLL1/2, la familia SWI/SNF de ATPasas para la remodelación de cromatina y el complejo PAF1 para la elongación de la transcripción y modificación de histonas. Estructuralmente, la β -catenina está formada por tres dominios, el amino terminal, el central y el carboxilo terminal. El dominio central está formado por doce repeticiones de tipo "armadillo". Mientras que las repeticiones centrales de β -catenina se asocian con TCF y la repetición armadillo amino terminal se une a BCL9, la mayoría de los complejos coactivadores interactúan con la porción carboxilo terminal de la β -catenina, creando una interacción entre β -catenina, el aparato transcripcional y la cromatina³⁷. Desde la repetición armadillo 10 al extremo carboxilo (COOH) terminal de β -catenina interactúa con el dominio de unión a CREB de CBP (CREB binding protein) para unirse a ella. CBP actúa como coactivador de β -catenina y juntos, activan la transcripción⁴⁰. De hecho, la unión TCF/ β -catenina a WREs conduce a una acetilación de histonas dependiente de CBP a una distancia genómica significativa (30 kb), lo que sugiere que el reclutamiento local de TCF/ β -catenina da como resultado una modificación generalizada de la cromatina³⁷.

Un estudio reciente, relaciona, también, al receptor activado por proliferadores de los peroxisomas β/δ (PPAR β/δ) con la ruta Wnt³¹. En él se vio que PPAR β/δ regula transcripcionalmente la expresión de proglucagón en células L enteroendocrinas a través de la estimulación de la ruta β -catenina/TCF-4. La conclusión de este estudio identifica un papel para PPAR β/δ como regulador positivo de la señalización de GLP-1 por incremento tanto de la expresión génica de proglucagón como del receptor de GLP-1 en células L enteroendocrinas productoras de GLP-1 y páncreas, respectivamente³¹.

Pero la cuestión realmente importante es si el incremento de β -catenina inducido por glucosa tiene consecuencias funcionales para la expresión génica. El trabajo de Anagnostou y Shepherd³⁸ lo confirma. Estos investigadores llevaron a cabo unos experimentos que mostraron un aumento de β -catenina en el núcleo de las células utilizadas. También demostraron que la glucosa aumenta la actividad transcripcional del sistema β -catenina/TCF, ya que tras añadirla, se expresan una serie de genes blanco de β -catenina. Estos resultados demuestran claramente que la glucosa, a través de la ruta de las hexosaminas y la N-glicosilación, incrementa los niveles de β -catenina funcional, que se acumula en el núcleo y se une a los miembros de la familia TCF/LEF para activar la transcripción de genes diana³⁸, entre los que se encuentran, en células enteroendocrinas L y K, los genes de GLP-1 y GIP.

Estos resultados también pueden darse *in vivo*, ya que estos investigadores han encontrado que los niveles de β -catenina incrementan rápidamente de 2 a 3 veces en distintos órganos (hígado, músculo y tejido

adiposo) tras la realimentación de ratas en ayunas y también en hígado de ratas insulino-pénicas e hiperglucémicas con diabetes inducida por estreptozotocina³⁸. Esto indica que los cambios en β -catenina ocurren en tejidos implicados en la regulación del metabolismo de glucosa bajo condiciones fisiológicas relevantes y que estos efectos también son debidos a cambios en la glucosa *in vivo*, lo que permite hipotetizar sobre la presencia de esta regulación en células enteroendocrinas L y K, productoras de las hormonas incretinas.

Conclusión

La ruta de señalización Wnt es la responsable de la regulación de la expresión génica de distintas proteínas implicadas en innumerables procesos metabólicos. Se sabe que la síntesis de proglucagón y por lo tanto de GLP-1 y también de GIP está controlada por el sistema represor TCF/LEF, sobre el que actúa β -catenina, en las células enteroendocrinas K y L. La evidencia de que la glucosa puede ejercer efectos directos sobre la ruta de señalización Wnt/ β -catenina establece así una unión entre los nutrientes y las redes de señalización, que son capaces de coordinar y regular distintas respuestas metabólicas. De este modo, la comprensión del proceso puede mejorar el conocimiento sobre el metabolismo de la insulina y la homeostasis de la glucosa. Además, es bastante probable que otros nutrientes estén implicados en la modulación de la expresión génica de las hormonas incretinas, por lo que se hace necesario un estudio dedicado a ello.

Perspectivas

Este trabajo intenta establecer las bases de una posible futura línea de investigación que confirme lo aquí teorizado sobre las células enteroendocrinas K y L del intestino en humanos y la producción de las hormonas incretinas GIP y GLP-1. Estas observaciones, junto con otras evidencias disponibles, identifican la señalización Wnt/ β -catenina como un área terapéutica, principalmente para la obesidad, la diabetes y otras enfermedades metabólicas asociadas. De hecho, hoy en día existen tratamientos para la diabetes en los que se utilizan estas hormonas como fármacos. El mejor entendimiento de los procesos de producción de incretinas, y su modulación por los nutrientes y otros componentes de la dieta puede ayudar a mejorar el tratamiento o a encontrar alguno alternativo.

Referencias

1. McIntyre N, Holdsworth CD, Turner DS. New interpretation of oral glucose tolerance. *Lancet* 1964; 2 (7349): 20-1.
2. McIntyre N, Holdsworth CD, Turner DS. Intestinal factors in the control of insulin secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1965; 25 (10): 1317-24.

3. Van der Burg MP, Guicherit OR, Frölich M, Gooszen HG. Insulinotropic effects of cholecystokinin, gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1 during perfusion of short-term cultured canine isolated islets. *Regulatory Peptides* 1995; 60 (1): 61-7.
4. Kelly KR, Brooks LM, Solomon TP, Kashyap SR, O'Leary VB, Kirwan JP. The glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucose-stimulated insulin response to exercise training and diet in obesity. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 2009; 296 (6): E1269-74.
5. Rehfeld JF. Incretin physiology beyond glucagon-like peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide: cholecystokinin and gastrin peptides. *Acta Physiologica (Oxford, England)* 2011; 201 (4): 405-11.
6. Cui C, Ohnuma H, Daimon M, Susa S, Yamaguchi H, Kameda W, Jimbu Y, Oizumi T, Kato T. Ghrelin infused into the portal vein inhibits glucose-stimulated insulin secretion in Wistar rats. *Peptides* 2008; 29 (7): 1241-6.
7. Shuster LT, Go VL, Rizza RA, O'Brien PC, Service FJ. Potential incretins. *Mayo Clinic Proceedings* 1988; 63 (8): 794-800.
8. Arechavaleta R. El efecto fisiológico de las incretinas. *Advanced Studies in Medicine* 2006; 6 (7A): S581-S585.
9. Holst JJ, Vilsbøll T, Deacon CF. The incretin system and its role in type 2 diabetes mellitus. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009; 297 (1-2): 127-36.
10. Asmar M, Holst JJ. Glucagon-like peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide: new advances. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity* 2010; 17 (1): 57-62.
11. Szalowska E, Meijer K, Kloosterhuis N, Razaee F, Priebe M, Vonk RJ. Sub-chronic administration of stable GIP analog in mice decreases serum LPL activity and body weight. *Peptides* 2011; 32 (5): 938-45.
12. Irwin N, Francis JM, Flatt PR. Alterations of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) during cold acclimation. *Regulatory Peptides* 2011; 167 (1): 91-6.
13. Parker HE, Reimann F y Gribble FM. Molecular mechanisms underlying nutrient-stimulated incretin secretion. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2010; 12: e1.
14. Holst JJ. The Physiology of Glucagon-like Peptide 1. *Physiological Reviews* 2007; 87: 1409-1439.
15. Mortensen K, Christensen LL, Holst JJ, Orskov C. GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. *Regulatory Peptides* 2003; 114 (2-3): 189-96.
16. Fujita Y, Wideman RD, Speck M, Asadi A, King DS, Webber TD, Haneda M y Kieffer TJ. Incretin release from gut is acutely enhanced by sugar but not by sweeteners in vivo. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2009; 296: E473-E479.
17. Reimer RA. Meat hydrolysate and essential amino acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion, in the human NCI-H716 enteroendocrine cell line, is regulated by extracellular signal-regulated kinase1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Journal of Endocrinology* 2006; 191: 159-170.
18. Shimotoyodome A, Fukuoka D, Suzuki J, Fujii Y, Mizuno T, Meguro S, Tokimitsu I y Hase T. Coingestion of Acylglycerols Differentially Affects Glucose-Induced Insulin Secretion via Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide in C57BL/6J Mice. *Endocrinology* 2009; 150 (5): 2118-26.
19. Schirra J, Katschinski M, Weidmann C, Schäfer T, Wank V, Arnold R y Göke B. Gastric emptying and release of incretin hormones after glucose ingestion in humans. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 97 (1): 92-103.
20. Yoder SM, Yang Q, Kindel TL, Tso P. Stimulation of incretin secretion by dietary lipid: is it dose dependent? *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2009; 297 (2): G299-305.
21. Karamanlis A, Chaikomin R, Doran S, Bellon M, Bartholomeusz FD, Wishart JM, Jones KL, Horowitz M, Rayner CK. Effects of protein on glycemic and incretin responses and gastric emptying after oral glucose in healthy subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2007; 86 (5): 1364-8.
22. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature Medicine* 2005; 11 (1): 90-4.
23. Carr RD, Larsen MO, Winzell MS, Jelic K, Lindgren O, Deacon CF, Åhrén B. Incretin and islet hormonal responses to fat and protein ingestion in healthy men. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2008; 295 (4): E779-84.
24. Deacon CF, Nauck MA, Meier J, Hücking K, Holst JJ. Degradation of endogenous and exogenous gastric inhibitory polypeptide (GIP) in healthy and in type 2 diabetic subjects as revealed using a new assay for the intact peptide. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000; 85: 3575-3581.
25. Vilsbøll T, Agero H, Krarup T, Holst JJ. Similar elimination rates of glucagon-like peptide-1 in obese type 2 diabetic patients and healthy subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 88: 220-224.
26. Wellendorph P, Johansen LD, Bräuner-Osborne H. The emerging role of promiscuous 7TM receptors as chemosensors for food intake. *Vitamins and Hormones* 2010; 84: 151-84.
27. Harada N. Structure and function of incretin receptor. *Nippon Rinsho* 2001; 69 (5): 813-20.
28. Yip RG, Wolfe MM. GIP biology and fat metabolism. *Life Sciences* 2000; 66 (2): 91-103.
29. Dhanvantari S, Izzo A, Jansen E, Brubaker PL. Coregulation of glucagon-like peptide-1 synthesis with proglucagon and prohormone convertase 1 gene expression in enteroendocrine GLUTag cells. *Endocrinology* 2001; 142 (1): 37-42.
30. Meier JJ y Nauck MA. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide/gastric inhibitory polypeptide. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 18 (4): 587-606.
31. Daoudi M, Hennuyer N, Borland MG, Touche V, Duhem C, Gross B, Caiazzo R, Kerr-Conte J, Pattou F, Peters JM, Staels B, Lestavel S. PPAR β/δ Activation Induces Enteroendocrine L Cell GLP-1 Production. *Gastroenterology* 2011. [Epub ahead of print]
32. Jin T y Liu L. The Wnt Signaling Pathway Effector TCF7L2 and Type 2 Diabetes Mellitus. *Molecular Endocrinology* 2008; 22 (11): 2383-92.
33. Jin T. The WNT signalling pathway and diabetes mellitus. *Diabetologia* 2008; 51 (10): 1771-80.
34. García-Martínez JM, Chocarro-Calvo A, Moya CM, García-Jiménez C. WNT/beta-catenin increases the production of incretins by entero-endocrine cells. *Diabetologia* 2009; 52 (9): 1913-24.
35. Yi F, Brubaker PL, Jin T. TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; 280 (2): 1457-64.
36. Gustafson B y Smith U. WNT signalling is both an inducer and effector of glucagon-like peptide-1. *Diabetologia* 2008; 51: 1768-1770.
37. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell* 2009; 17 (1): 9-26.
38. Anagnostou SH, Shepherd PR. Glucose induces an autocrine activation of the Wnt/beta-catenin pathway in macrophage cell lines. *Biochemical Journal* 2008; 416 (2): 211-8.
39. www.rgd.mcw.edu/wg/pathway/hexosamine_biosynthetic_pathway
40. Takemaru KI, Moon RT. The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *The Journal of Cell Biology* 2000; 149 (2): 249-54.

Revisión

Nutrient-mediated modulation of incretin gene expression; a systematic review

R. Martínez-Rodríguez and A. Gil

Department of Biochemistry and Molecular Biology II. Institute of Nutrition and Food Technology. Centre of Biomedical Research. University of Granada. Granada. Spain.

Abstract

Incretins are a cluster of hormones which are secreted and released into the bloodstream after food intake by gut enteroendocrine cells, reaching to pancreas where produce a potentiating effect on insulin release. The aim of this study was to perform a systematic review of incretins gene expression mediated by nutrients using specific search equations in the PubMed database. The two most relevant incretins are GLP-1 and GIP, which come from proglucagon and proGIP precursor respectively. GLP-1 is mainly synthesized and released by ileum and colon L cells, in contrast to GIP which does it by K cells in duodenum and proximal jejunum. It has been shown that canonical Wnt signalling pathway is closely related to the production of these hormones, since transcription factor TCF7L2 affects proglucagon and proGIP gene expression in L and K enteroendocrine cells. On the other hand, it has been shown that the hexosamine biosynthetic pathway can produce N-linked glycosylation of β -catenin, an essential component of canonical Wnt signalling. This process hinders β -catenin phosphorylation and, thereby prevents proteasome degradation. Increasing glucose concentration enhances the hexosamine pathway and thus β -catenin glycosylation. This causes a β -catenin cytoplasmic accumulation allowing entry into nucleus, where it exerts its action by binding to a clump of molecules and transcription factors, allowing to express the target genes, including the incretin hormones. There is also evidence that glucose, through the hexosamine pathway, can induces autocrine activation of Wnt signalling pathway by stimulating secretion of Wnt proteins.

(*Nutr Hosp.* 2012;27:46-53)

DOI:10.3305/nh.2012.27.1.5437

Key words: *Incretins. Gene expression regulation. Wnt proteins. Glycosylation.*

Correspondence: Ángel Gil.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II.
Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos.
Centro de Investigación Biomédica.
Universidad de Granada. Campus de la Salud.
Avda. del Conocimiento, s/n.
18100 Armilla. Granada. España.
E-mail: agil@ugr.es

Recibido: 3-VIII-2011.

Aceptado: 8-VIII-2011.

MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE INCRETINAS MEDIADA POR NUTRIENTES; REVISIÓN SISTEMÁTICA

Resumen

Las incretinas son una serie de hormonas que tras una ingesta de alimentos son secretadas y liberadas al torrente sanguíneo por células enteroendocrinas del intestino, llegando al páncreas, donde producen un efecto potenciador en la liberación de insulina. El objetivo de este trabajo ha sido realizar una revisión sistemática de la modulación de la expresión génica de las incretinas mediada por nutrientes utilizando ecuaciones específicas de búsqueda en la base de datos PubMed. Las dos incretinas más relevantes son el péptido análogo al glucagón 1 (GLP-1) y el péptido insulinotrópico dependiente de glucosa (GIP), que provienen de los precursores proglucagón y proGIP, respectivamente. GLP-1 es mayoritariamente sintetizado y secretado por las células L del íleon y del colon, a diferencia de GIP que lo hace por las células K de duodeno y yeyuno proximal. Se ha demostrado que la ruta canónica de señalización Wnt está estrechamente relacionada con la producción de estas hormonas, ya que el factor de transcripción TCF7L2 influye en la expresión génica de proglucagón y proGIP en células enteroendocrinas L y K. Por otra parte, se ha demostrado que la ruta biosintética de las hexosaminas es capaz de glicosilar la β -catenina, componente fundamental de la señalización canónica Wnt, lo que interfiere en la fosforilación de esta proteína, impidiendo así su degradación en el proteasoma. El aumento de la concentración de glucosa incrementa la ruta de las hexosaminas y de esta manera la glicosilación de la β -catenina. Esto produce una acumulación de esta proteína en el citoplasma celular y permite su entrada al núcleo, donde ejerce su acción al unirse a una serie de moléculas y factores de transcripción, permitiendo de este modo que se expresen los genes diana, entre los que se encuentran los de las hormonas incretinas. También hay evidencias de que la glucosa, a través de la ruta de las hexosaminas, es capaz de inducir la activación autocrina de la ruta de señalización Wnt estimulando la secreción de proteínas Wnt.

(*Nutr Hosp.* 2011;27:46-53)

DOI:10.3305/nh.2012.27.1.5437

Palabras clave: *Incretinas. Regulación de la expresión génica. Proteínas Wnt. Glicosilación.*

Abbreviations

APC: Adenomatous polyposis coli.
β-Trcp: β-Transducin repeat-containing protein β.
CBP: CREB-binding protein.
CK1: Casein kinase 1.
DPP IV: Dipeptidyl peptidase IV.
GFAT: Glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase.
GIP: Glucose-dependent insulinotropic peptide.
GLP-1: Glucagon-like peptide-1.
GPR: G protein-coupled receptor.
GSK3: Glycogen synthase kinase 3.
HAT: Histone-acetyltransferase.
HBP: Hexosamine biosynthetic pathway.
HMT: Histone-methyltransferase.
LEF: Lymphoid enhancer factor.
LRP: Low density lipoprotein receptor-related protein.
OGA: O-GlcNAc hydrolase.
OGT: O-GlcNAc transferase.
PC: Prohormone convertase.
PPAR: Peroxisome proliferator activated receptor.
TCF: T-cell transcription factor.
WRE: Wnt-responsive element.

Introduction

The term incretin refers to the effect of insulin released in response to food intake. Incretin hormones directly or indirectly increase this insulin secretion by β cells of pancreatic islets of Langerhans.^{1,2} Various hormones exert this effect in an indirect manner in organisms³⁻⁷ (table I), but only two of them act in a direct manner, making them the most relevant. These are glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP), previously known as gastric inhibitory peptide, and glucagon-like peptide-1 (GLP-1).⁸ Besides enhancing pancreatic insulin release, these hormones play other roles in the organism. GLP-1 suppresses glucagon secretion, inhibits gastric emptying, and reduces appetite and food intake.⁹ It also appears to improve and increase the proliferation of pancreatic β cells, protect myocytes from ischemic damage, regulate glucose homeostasis, and exert an effect on immune function.¹⁰ For its part, GIP has been directly related to obesity, lipid metabolism,^{10,11} and bone remodeling, and it plays a regulatory role in the CNS in the proliferation of neural progenitor cells and behavior modification.¹⁰ A recent rat study added a possible relationship between GIP and cold acclimation.¹²

The incretin hormones GIP and GLP-1 belong to a superfamily of glucagon peptides and therefore have amino acid sequences in common. GIP is a peptide of 42 amino acids derived from its precursor, ProGIP, while GLP-1 includes peptides of 30 and 31 amino acids derived from its precursor, proglucagon. The “incretin effect” has been studied with glucose, obser-

Table I
Hormones with incretin effect

<i>Direct effect</i>	<i>Indirect effect</i>
GIP	Cholecystokinin Gastrin Ghrelin
GLP-1	Neurotensin Peptide PHI Peptide YY

ving a much greater insulin response after the oral *versus* intravenous intake of glucose, indicating that GIP and GLP-1 secretion takes place in the digestive tract¹³ and is mediated by two types of enteroendocrine cells of the gastrointestinal epithelium. Thus, K cells, mainly localized in the duodenum and proximal jejunum, synthesize and release GIP, while L cells, largely found in the ileum and colon, synthesize and release GLP-1.¹⁴ A small amount of proximal small intestine cells are also known to express both GLP-1 and GIP.¹⁵ It is estimated that the indirect effects of incretins are responsible for up to 70% of the insulin secretion stimulated by glucose in healthy individuals.¹⁴ A change in blood glucose concentration derived from food intake amplifies the secretion by pancreatic β cells of GIP and GLP-1 into the blood stream, thereby increasing the release of insulin at the time when it is most needed.¹³ These effects on insulin release and glucose homeostasis improvement have raised expectations about the utilization of these hormones in the treatment of type two diabetes, and various therapies have been developed, mainly based on GLP-1.

The fact that these hormones are released when the food arrives in the digestive system and the capacity of some nutrients to increase or decrease this release¹⁶⁻¹⁸ suggest the existence of a system that regulates their production. However, there have been few studies on this issue, and the nutrient-mediated modulation of incretin gene expression remains hypothetical. The objective of this systematic review of the available literature was to search for an incretin gene expression regulatory mechanism that is influenced by a nutrient and therefore supports this hypothesis.

Method

The study was initiated with a search for literature reviews that would allow the issue to be approached from a wide perspective. We explored the PubMed database of the U.S. National Center for Biotechnology Information (NCBI). The first search equation used was “Gene Expression Profiling”[Mesh] OR “Gene Expression”[Mesh] OR “Gene Expression Regulation, Developmental”[Mesh] OR “Gene Expression Regulation”[Mesh]) AND “Incretins”[Mesh]. This initial search yielded nine articles, of which three were

reviews. After reading the abstracts of each paper, one of them was selected for a full examination.¹³

Once the bases of knowledge on incretins were established, a search was performed for articles related to our study hypothesis, using the equation ((*"Incretins/agonists"*[Mesh] OR *"Incretins/analogs and derivatives"*[Mesh] OR *"Incretins/biosynthesis"*[Mesh] OR *"Incretins/genetics"*[Mesh] OR *"Incretins/metabolism"*[Mesh] OR *"Incretins/physiology"*[Mesh] OR *"Incretins/secretion"*[Mesh] OR *"Incretins/therapeutic use"*[Mesh])) AND (*"Gene Expression Regulation"*[Mesh]) NOT Review. This search yielded six reports, but only one provided useful data on the regulation of gene expression in incretin synthesis.³⁴ We then used an alternative route ((*"Incretins/ biosynthesis"* [Mesh] OR *"Incretins/genetics"*[Mesh] OR *"Incretins/ metabolism"*[Mesh]) NOT (*"review"*[Publication Type] OR *"review literature as topic"*[MeSH Terms] OR *"review"*[All Fields]) AND (*"2006/04/01"*[PDat] : *"2011/03/30"*[PDat]) AND (*"humans"*[MeSH Terms] AND *"2006/04/01"*[PDat]: *"2011/03/30"* [PDat])), which generated 65 articles. Although some of these were not very relevant, their reading led to other papers of more interest. The search equation *"Gene expression"* AND *"Incretins"* AND *"nutrient"* also produced no conclusive result, and it was concluded that no authors had directly addressed the issue of interest in this study.

Given the lack of studies on nutrient-mediated incretin gene regulation, a search was conducted on the synthesis of incretins, using ((*"Incretins/biosynthesis"*[Mesh]) NOT Review). Various articles referred to Wnt signaling as a regulator of incretin synthesis, and the search was then focused on the relationship between nutrients and the Wnt signaling pathway, using *"Wnt Proteins"*[Mesh] AND *"Nutrients"*. We found a comment in the *Biochemical Journal* on an original study highly relevant to our study hypothesis.³⁹ The remaining studies consulted were drawn from reference lists in the selected articles and from different web pages.

Molecular mechanisms of incretin secretion and synthesis regulation

The enteroendocrine L cells that synthesize and release GLP-1 are found dispersed throughout the small and large intestine, with a higher density in the distal ileum and colon. In contrast, the anatomically distinct K cells that produce GIP are largely found in the duodenum. This may explain the different profiles of blood GLP-1 and GIP concentrations after food intake. Depending on the composition of the food, GLP-1 secretion can show a biphasic profile, with an early stage shortly after food intake that lasts for 15-30 min and a late phase that persists for 1-2 hours or longer. GIP secretion is produced after a similar brief delay and can remain elevated for various hours. In

humans, glucose can be detected in the proximal duodenum within 5 minutes after the intake of an overload of liquid glucose, correlating with the time that elapses before the first rapid rise in blood GLP-1 and GIP levels.¹³ Hence, these cells possess nutrient-detection mechanisms that permit the prompt release and possibly the synthesis of the hormones.

Incretin secretion

GIP is released rapidly upon the arrival of nutrients to the duodenum because of the elevated local density of K cells. However, human studies on glucose infusion showed that GLP-1 is only stimulated when the rate of glucose entry into the duodenum exceeds the duodenal absorption capacity, i.e., when the non-adsorbed glucose filters to the jejunum and can stimulate L cells in this region.¹⁹ Secretion is stimulated not only by carbohydrates but also by the other two macronutrients, lipids and proteins.²⁰⁻²³ Both GLP-1 and GIP are rapidly degraded after their secretion by the enzyme dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV).^{24,25}

Several highly ubiquitous transmembrane receptors with seven domains are widely activated by amino acids, carbohydrates, and free fatty acids and are expressed in various tissues, including the gastrointestinal tract. It has been hypothesized that these receptors may act as food intake modulation sensors, e.g., releasing incretin hormones into the intestine.²⁶ GIP and GLP-1 receptors are G protein-coupled receptors (GPRs), which are integral membrane proteins with seven α helices,^{27,28} although enteroendocrine cells express various types of GPR coupled to G_s and G_q that induce incretin secretion. These receptors act by inducing signaling pathways, such as AMPc and protein kinase (PKC) in order to increase the calcium concentration *via* calcium channels, thereby producing the release of incretins.¹³

Incretin production

Hormone processing

GLP-1 is cleaved after translational processing of the proglucagon gene product, which is expressed not only in L cells but also in pancreatic cells and a subset of brain-stem neurons. Alternative production of the pro-hormone is largely attributable to the differential expression of prohormone convertase (PC) enzymes. Pancreatic α cells express PC2 and generate glucagon, whereas L cells in the intestine express PC1/3 and produce the bioactive peptides GLP-1, GLP-2, and oxyntomodulin. The carboxyl-terminal fraction of proglucagon I is almost completely processed to GLP-1 and GLP-2 in L cells, while the N-terminal is released as active peptide oxyntomodulin and the rest as glycentin.^{14,29,30} Analysis of gene expression in L GLUTag cells, an experimental model, showed significantly increased mRNA levels of

proglucagon and PC1/3 after incubation with glucose *versus* lactate. In contrast, the mRNA of PC2 was not regulated by glucose after 12 h of incubation, while both glucose and lactate tended to increase its expression after 24 h. These data show that glucose is not only a primary stimulator of GLP-1 release but also a positive transcriptional modulator of proglucagon and PC-1/3 mRNA levels in L GLUTag cells.³¹

Unlike proglucagon, the proGIP precursor in K cells is not believed to contain sequences of bioactive peptides besides GIP. The processing of proGIP in K cells, as in the case of proglucagon in L cells, is attributed to the action of PC1/3.³⁰

Synthesis regulation

Various studies have reported that incretin gene expression is mainly regulated by the Wnt signaling pathway. One member of this pathway, transcription factor TCF7L2 or TCF-4 (T-cell transcription factor, not to be confused with transcription factor 4), was found to influence the gene expression of both proglucagon and proGIP in enteroendocrine cells in the gut.³²⁻³⁵ Furthermore, GLP-1 itself stimulates the Wnt pathway in an autocrine manner, and none of these effects have been described in pancreatic islet cells.¹⁴

WNT SIGNALING PATHWAY

Wnt signaling is an extremely complex process that has to be meticulously controlled in time and space. It is critically important for cell differentiation, cell-cell communication, and organ formation and growth. Wnt proteins are glycoprotein ligands secreted by cells. They contain a conserved domain of around 300 amino acids interrupted by a sequence of 21 to 23 cysteine residues that have a characteristic spatial pattern. They are poorly soluble in water due to a lipid chain (palmitoyl) bound to a conserved cysteine residue. Many cells, especially undifferentiated or inflammatory cells secrete Wnt proteins, and others also secrete them in response to stimuli. The effect of Wnt proteins depends on their concentration. They are transported over long distances and can act on cells distant from their production site. Wnt is activated by both paracrine and autocrine signaling.³⁶ There are two types of Wnt signaling, but the canonic signaling pathway is more relevant to the present study.

The canonic Wnt signaling pathway (fig. 1) was well defined by McDonald, Tamai, and He.³⁷ It functions by regulating the β -catenin transcriptional coactivator. In the absence of Wnt, plasma β -catenin is constantly degraded by action of the Axin complex, which is composed of the tumor suppressor protein adenomatous polyposis coli (APC), casein kinase 1 (CK1), and glycogen synthase kinase 3 (GSK3). CK1 and GSK3 sequentially phosphorylate the amino-terminal region

of β -catenin, producing its recognition by β -Trcp, a subunit of ubiquitin E3 with ligase activity, and its consequent ubiquitination and degradation in the proteasome. This continuous elimination of β -catenin prevents its entry into the nucleus, and the target genes of the Wnt pathway are therefore repressed by the DNA-bound T-cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) family. The Wnt/ β -catenin signaling pathway is activated when a ligand binds to the Frizzled (Fz) transmembrane receptor and its co-receptor, low density lipoprotein receptor-related protein 6 or 5 (LRP6/5). Formation of the Wnt-Fz-LRP6/5 complex along with recruitment of the Disheveled (Dvl) scaffolding protein results in LRP phosphorylation and activation and anchorage of the Axin complex to the receptors. This event permits inhibition of Axin complex-mediated β -catenin phosphorylation and thereby achieves the stabilization of β -catenin, which accumulates in the cytoplasm and can travel to the nucleus to form complexes with TCF/LEF and activate the target gene expression of Wnt,³⁷ leading to the synthesis of GLP-1 and GIP in enteroendocrine L and K cells, respectively.

In 2008, Anagnostou and Shepherd published a study in which they identified an important link between glucose detection and the Wnt/ β -catenin signaling pathway,³⁸ indicating that this pathway responds to physiological concentrations of nutrients. One of the first results obtained suggested that glucose regulates β -catenin levels. They used macrophage cell lines (J774.2 and RAW264.7), because these had previously shown a response to glucose. Anagnostou and Shepherd also observed that the β -catenin in these cells represents a cytosolic and nuclear pool of β -catenin that is involved in the transduction of Wnt signals and TCF-dependent transcriptional activity. They maintained these cell lines during a period of glucose starvation and found that the restoration of glucose levels produced a rapid and dose-dependent increase in β -catenin in both cell lines. Changes in β -catenin were observed between 5 mM and 20 mM of glucose, indicating that this effect can be exerted within the physiological range of glucose concentrations.³⁸

HEXOSAMINE PATHWAY

Anagnostou and Shepherd reported that the hexosamine pathway is involved in the regulation of β -catenin levels. Their first evidence was that the above-mentioned effects were blocked by drugs that inhibit glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT). GFAT is known to require glutamine as amino group donor, and the effect of glucose disappeared when glutamine was not present. Further proof of the influence of the hexosamine pathway was their finding that the effects of glucose could be replicated by administering low levels of glucosamine (GlcN), which can directly enter the hexosamine pathway downstream from GFAT.³⁸

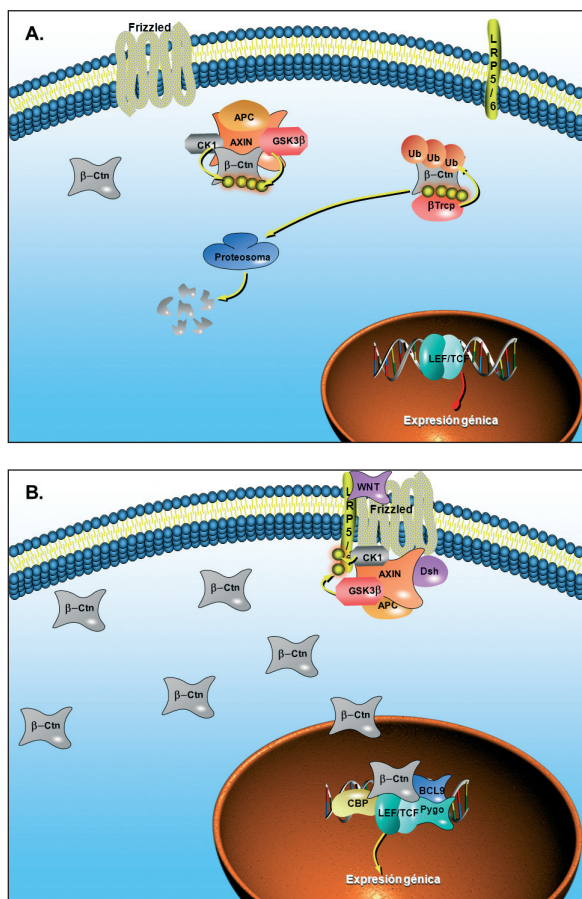


Fig. 1.—Simplified representation of the Wnt signaling pathway. Panel A represents the inactivation of the pathway by the phosphorylation of β -catenin and its subsequent degradation in the proteasome. B depicts the activated pathway, with the entry of β -catenin into the nucleus.

The hexosamine biosynthetic pathway (HBP) results in the production of UDP-N-acetyl glucosamine (UDP-GlcNAc) and other hexosamine nucleotides. UDP-GlcNAc is the main product and sole donor for O-binding of a single molecule of N-acetyl glucosamine (O-GlcNAc) to many cytoplasmic and nuclear proteins. Upon entry into the cell, the glucose is rapidly phosphorylated to glucose-6-phosphate, which can be oxidized *via* glycolysis, converted to pentose phosphates, or stored as glycogen. In glycolysis, G6P is isomerized to fructose-6-phosphate (F6P) before activation of the pathway. Approximately 2.5% of the F6P, and consequently the glucose, is diverted to HBP. As noted above, GFAT catalyzes the formation of glucosamine-6-phosphate, with glutamine as amine donor and F6P as acceptor substrate in the first and rate-limiting step of the pathway. Subsequently, addition of an acetyl group produces N-acetylglucosamine-6-phosphate, which is rapidly modified to UDP-GlcNAc. The utilization of glucosamine and acetyl in the first two steps potentially links the metabolism of amino acids and fatty acids to HBP.³⁹

The reversible modification of the proteins by the addition and removal of GlcNAc (analogous to the

addition and removal of phosphate) also shows a complex interaction with O-phosphate modification. The target sites of N-acetyl-O-glycosylation are the O-phosphorylation sites themselves or are very close to them. The GlcNAc cycle is completed thanks to two enzymes. One of these is O-GlcNAc transferase (OGT), which catalyzes the O-binding of GlcNAc to serine and threonine residues of the target protein. The other is O-GlcNAc hydrolase (OGA), which eliminates the hexosamine fraction.³⁹

Because of the wide functionality of the target proteins, the hexosamine pathway is also known as the hexosamine signaling pathway. The final product, UDP-GlcNAc, is a potent inhibitor of GFAT and modulates the affinity of OGT for specific substrates.³⁹

Anagnostou and Shepherd³⁸ utilized the N-glycosylation inhibitors tunicamycin and 2-deoxy-D-glucose (2DOG) and demonstrated that this glycosylation is responsible for the effect of glucose on β -catenin, but the mechanism underlying this effect has not been elucidated. It was initially attributed to an increase in catenin synthesis, but this was ruled out by the finding that β -catenin mRNA levels were not affected by glucose or glucosamine or by the absence of glutamine; therefore, another explanation must be sought.³⁹

RELATIONSHIP BETWEEN WNT AND HEXOSAMINES

Phosphorylation of β -catenin by GSK3 is an essential step in its signaling for degradation in the proteasome, as commented above. It was first thought that low GSK3 activity levels may explain the increase in β -catenin, but this has been ruled out. However, the phosphorylated/total β -catenin ratio was found to decrease with glucose or glucosamine treatments, indicating a reduced GSK3-mediated phosphorylation and a consequent stabilization of β -catenin.³⁸ One explanation, based on the results of the latter study and the physiology of the hexosamine pathway, is depicted in figure 2. The effect of glucose on Wnt signaling is that N-acetyl-O-glycosylation of β -catenin hinders GSK3-mediated O-phosphorylation due to a simple structural cause, and this leads to a conformational change that allows it to evade the destruction complex and subsequent degradation in the proteasome, thereby increasing the concentration of β -catenin in the cytoplasm.

Besides its effects on β -catenin, glucose also induces autocrine activation of the Wnt canonical signaling pathway. Glucose may stimulate the secretion of Wnt proteins, given that the secretion of some Wnts is known to require N-glycosylation, and autocrine regulation of Wnt signaling has been observed. Another hypothesis is that glucose may regulate the N-glycosylation of Fz proteins or their co-receptors (LRP5/6). This may alter Wnt signaling, because some receptors are functionally regulated by N-glycosylation. Thus, there is evidence that LRP6 is N-glycosylated, and this affects its localization and signaling capacity. In order

to test whether, with either hypothesis, extracellular Wnt signaling was required for the effect of glucose on β -catenin, Anagnostou and Shepherd first utilized Dkk1, which blocks the interaction between Wnt and the Frizzled-LPR complex, and then utilized sFRP2, which also blocks Wnt signaling. The effect of glucose on β -catenin was not produced in either case; hence, the Wnt signaling pathway may be involved in this effect. The researchers next used a medium containing Wnt3a and tunicamycin (which blocks LRP6 phosphorylation) and found a glucose-induced increase in β -catenin due to an autocrine activation of the Wnt signaling system involving the hexosamine pathway and protein N-glycosylation.³⁸

Gene expression regulation

The TCF/LEF family of DNA-bound transcription factors is the main companion of β -catenin in gene regulation. TCF represses the gene expression, interacting with the repressor Groucho (known as TLE1 in humans), which promotes histone deacetylation and chromatin compaction. The stabilization of β -catenin induced by Wnt and its accumulation in the nucleus leads TCF to form a complex with β -catenin, which displaces Groucho and binds to other gene coactivators. TCF proteins are high-mobility group (HMG) DNA-binding transcription factors that not only bind to a DNA consensus sequence designated the Wnt-responsive element (WRE), CCTTTGWW (with W representing both T and A) but also produce a DNA flexion that can change the local chromatin structure. TCF7L2 acts as both repressor and activator.³⁷

A large number of β -catenin-associated coactivators have been identified. This multiprotein complex includes BCL9 and Pygopus (Pygo), a mediator (to initiate the transcription), p300/CBP and histone-acetyltransferases (HATs) TRRAP/TIP60, histone-methyltransferases (HMTs) MLL1/2, the SWI/SNF family of ATPases for chromatin remodeling, and the PAF1 complex for elongation of histone transcription and modification. Structurally, β -catenin comprises three domains: the amino-terminal, central, and carboxyl-terminal domains. The central domain is formed by 12 armadillo-type repeats. Although the central repeats of β -catenin are associated with TCF and the amino-terminal repeat binds to BCL9, the majority of coactivator complexes interact with the carboxyl-terminal portion of β -catenin, creating interaction between β -catenin, transcriptional apparatus, and chromatin.³⁷ The sequence from armadillo repeat 10 to the carboxyl-terminal end (COOH) of β -catenin interacts with and binds to the CPB (CREB binding protein) domain. CBP acts as coactivator of β -catenin and they activate transcription together.⁴⁰ In fact, the binding of TCF/ β -catenin to WREs leads to a CBP-dependent histone acetylation and a significant genomic distance (30 kb), which suggests that the local recruitment of

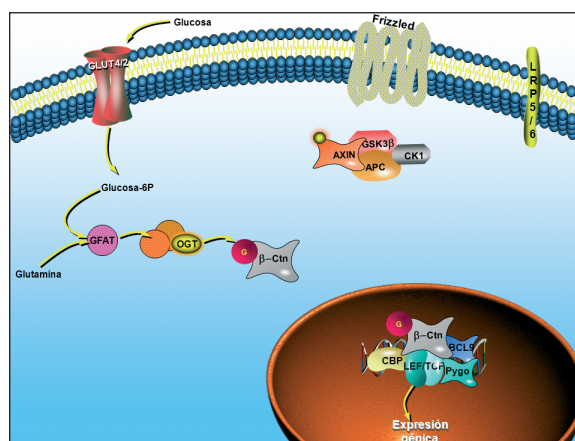


Fig. 2.—Simplified representation of the relationship between the hexosamine biosynthetic pathway and the canonical Wnt signaling pathway.

TCF/ β -catenin results in a generalized chromatin modification.³⁷

A recent study also related the peroxisome proliferator activated receptor β/δ (PPAR β/δ) to the Wnt pathway,³¹ in which PPAR β/δ was observed to transcriptionally regulate proglucagon expression in enteroendocrine L cells through stimulation of the β -catenin/TCF-4 pathway. The authors identified a role for PPAR β/δ as positive regulator of GLP-1 signaling through increases in the gene expression of proglucagon and the GLP-1 receptor in GLP-1-producing enteroendocrine L cells and pancreas, respectively.³¹

However, the key question is whether the glucose-induced increase in β -catenin has functional consequences for gene expression. This was addressed by Anagnostou and Shepherd³⁸ in experiments that showed increased β -catenin in the nucleus of the cells under study. They also demonstrated that glucose increases the transcriptional activity of the β -catenin/TCF system, given that a series of β -catenin target genes were expressed after its addition. These results clearly demonstrate that glucose, through the hexosamine pathway and N-glycosylation, increases levels of functional β -catenin, which accumulates in the nucleus and binds to members of the TCF/LEF family to activate transcription of the target genes,³⁸ including GLP-1 and GIP genes in enteroendocrine L and K cells.

These results can also be obtained *in vivo*, and a rapid 2- to 3-fold increase in β -catenin levels has been reported in liver, muscle, and adipose tissue after refeeding food-deprived rats and in the liver of insulinopenic and hyperglycemic rats with streptozotocin-induced diabetes.³⁸ This indicates that changes in β -catenin take place in tissues involved in the regulation of glucose metabolism under relevant physiological conditions, and that these effects are also attributable to changes in glucose *in vivo*, permitting the framing of hypotheses on the presence of this regulation in incretin hormone-producing enteroendocrine L and K cells.

Conclusion

The Wnt signaling pathway is responsible for regulation the gene expression of different proteins involved in innumerable metabolic processes. Synthesis of proglucagon and consequently of GLP-1 and GIP is known to be controlled by the TCF/LEF repressor system, on which β -catenin acts, in enteroendocrine K and L cells. Evidence that glucose can exert direct effects on the Wnt/ β -catenin signaling pathway establishes a link between nutrients and signaling networks, which are capable of coordinating and regulating different metabolic responses. In this way, understanding of the process can improve our knowledge of the metabolism of insulin and glucose homeostasis. Furthermore, other nutrients are likely to be involved in modulating the gene expression of incretin hormones, and they warrant specific study.

Perspectives

The aim of this study was to establish the bases for a possible research line to test hypotheses on enteroendocrine K and L cells in the human gut and the production of GIP and GLP-1 incretin hormones. These observations, alongside other available evidence, indicate that Wnt/ β -catenin signaling is of therapeutic interest, especially in relation to obesity, diabetes, and other associated metabolic diseases. In fact, diabetic drug treatments using these hormones are now available. A greater understanding of incretin production processes and their modulation by nutrients and other dietary components can help to improve treatments or identify alternative options.

References

1. McIntyre N, Holdsworth CD, Turner DS. New interpretation of oral glucose tolerance. *Lancet* 1964; 2 (7349): 20-1.
2. McIntyre N, Holdsworth CD, Turner DS. Intestinal factors in the control of insulin secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1965; 25 (10): 1317-24.
3. Van der Burg MP, Guicherit OR, Frölich M, Gooszen HG. Insulinotropic effects of cholecystokinin, gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1 during perfusion of short-term cultured canine isolated islets. *Regulatory Peptides* 1995; 60 (1): 61-7.
4. Kelly KR, Brooks LM, Solomon TP, Kashyap SR, O'Leary VB, Kirwan JP. The glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucose-stimulated insulin response to exercise training and diet in obesity. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 2009; 296 (6): E1269-74.
5. Rehfeld JF. Incretin physiology beyond glucagon-like peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide: cholecystokinin and gastrin peptides. *Acta Physiologica (Oxford, England)* 2011; 201 (4): 405-11.
6. Cui C, Ohnuma H, Daimon M, Susa S, Yamaguchi H, Kameda W, Jimbu Y, Oizumi T, Kato T. Ghrelin infused into the portal vein inhibits glucose-stimulated insulin secretion in Wistar rats. *Peptides* 2008; 29 (7): 1241-6.
7. Shuster LT, Go VL, Rizza RA, O'Brien PC, Service FJ. Potential incretins. *Mayo Clinic Proceedings* 1988; 63 (8): 794-800.

8. Arechavaleta R. El efecto fisiológico de las incretinas. *Advanced Studies in Medicine* 2006; 6 (7A): S581-S585.
9. Holst JJ, Vilsbøll T, Deacon CF. The incretin system and its role in type 2 diabetes mellitus. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009; 297 (1-2): 127-36.
10. Asmar M, Holst JJ. Glucagon-like peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide: new advances. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity* 2010; 17 (1): 57-62.
11. Szalowska E, Meijer K, Kloosterhuis N, Razaee F, Priebe M, Vonk RJ. Sub-chronic administration of stable GIP analog in mice decreases serum LPL activity and body weight. *Peptides* 2011; 32 (5): 938-45.
12. Irwin N, Francis JM, Flatt PR. Alterations of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) during cold acclimation. *Regulatory Peptides* 2011; 167 (1): 91-6.
13. Parker HE, Reimann F y Gribble FM. Molecular mechanisms underlying nutrient-stimulated incretin secretion. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2010; 12: e1.
14. Holst JJ. The Physiology of Glucagon-like Peptide 1. *Physiological Reviews* 2007; 87: 1409-1439.
15. Mortensen K, Christensen LL, Holst JJ, Orskov C. GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. *Regulatory Peptides* 2003; 114 (2-3): 189-96.
16. Fujita Y, Wideman RD, Speck M, Asadi A, King DS, Webber TD, Haneda M y Kieffer TJ. Incretin release from gut is acutely enhanced by sugar but not by sweeteners in vivo. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2009; 296: E473-E479.
17. Reimer RA. Meat hydrolysate and essential amino acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion, in the human NCI-H716 enteroendocrine cell line, is regulated by extracellular signal-regulated kinase1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Journal of Endocrinology* 2006; 191: 159-170.
18. Shimotoyodome A, Fukuoka D, Suzuki J, Fujii Y, Mizuno T, Meguro S, Tokimitsu I y Hase T. Coingestion of Acylglycerols Differentially Affects Glucose-Induced Insulin Secretion via Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide in C57BL/6J Mice. *Endocrinology* 2009; 150 (5): 2118-26.
19. Schirra J, Katschinski M, Weidmann C, Schäfer T, Wank V, Arnold R y Göke B. Gastric emptying and release of incretin hormones after glucose ingestion in humans. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 97 (1): 92-103.
20. Yoder SM, Yang Q, Kindel TL, Tso P. Stimulation of incretin secretion by dietary lipid: is it dose dependent? *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2009; 297 (2): G299-305.
21. Karamanlis A, Chaikomin R, Doran S, Bellon M, Bartholomeusz FD, Wishart JM, Jones KL, Horowitz M, Rayner CK. Effects of protein on glycemic and incretin responses and gastric emptying after oral glucose in healthy subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2007; 86 (5): 1364-8.
22. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature Medicine* 2005; 11 (1): 90-4.
23. Carr RD, Larsen MO, Winzell MS, Jelic K, Lindgren O, Deacon CF, Ahrén B. Incretin and islet hormonal responses to fat and protein ingestion in healthy men. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2008; 295 (4): E779-84.
24. Deacon CF, Nauck MA, Meier J, Hücking K, Holst JJ. Degradation of endogenous and exogenous gastric inhibitory polypeptide (GIP) in healthy and in type 2 diabetic subjects as revealed using a new assay for the intact peptide. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000; 85: 3575-3581.
25. Vilsbøll T, Agero H, Krarup T, Holst JJ. Similar elimination rates of glucagon-like peptide-1 in obese type 2 diabetic patients and healthy subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 88: 220-224.
26. Wellendorph P, Johansen LD, Bräuner-Osborne H. The emerging role of promiscuous 7TM receptors as chemosensors for food intake. *Vitamins and Hormones* 2010; 84: 151-84.

27. Harada N. Structure and function of incretin receptor. *Nippon Rinsho* 2001; 69 (5): 813-20.
28. Yip RG, Wolfe MM. GIP biology and fat metabolism. *Life Sciences* 2000; 66 (2): 91-103.
29. Dhanvantari S, Izzo A, Jansen E, Brubaker PL. Coregulation of glucagon-like peptide-1 synthesis with proglucagon and prohormone convertase 1 gene expression in enteroendocrine GLUTag cells. *Endocrinology* 2001; 142 (1): 37-42.
30. Meier JJ y Nauck MA. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide/gastric inhibitory polypeptide. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 18 (4): 587-606.
31. Daoudi M, Hennuyer N, Borland MG, Touche V, Duhem C, Gross B, Caiazzo R, Kerr-Conte J, Pattou F, Peters JM, Staels B, Lestavel S. PPAR β/δ Activation Induces Enteroendocrine L Cell GLP-1 Production. *Gastroenterology* 2011. [Epub ahead of print]
32. Jin T y Liu L. The Wnt Signaling Pathway Effector TCF7L2 and Type 2 Diabetes Mellitus. *Molecular Endocrinology* 2008; 22 (11): 2383-92.
33. Jin T. The WNT signalling pathway and diabetes mellitus. *Diabetologia* 2008; 51 (10): 1771-80.
34. García-Martínez JM, Chocarro-Calvo A, Moya CM, García-Jiménez C. WNT/beta-catenin increases the production of incretins by entero-endocrine cells. *Diabetologia* 2009; 52 (9): 1913-24.
35. Yi F, Brubaker PL, Jin T. TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; 280 (2): 1457-64.
36. Gustafson B y Smith U. WNT signalling is both an inducer and effector of glucagon-like peptide-1. *Diabetologia* 2008; 51: 768-1770.
37. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell* 2009; 17 (1): 9-26.
38. Anagnostou SH, Shepherd PR. Glucose induces an autocrine activation of the Wnt/beta-catenin pathway in macrophage cell lines. *Biochemical Journal* 2008; 416 (2): 211-8.
39. www.rgd.mcw.edu/wg/pathway/hexosamine_biosynthetic_pathway
40. Takemaru KI, Moon RT. The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *The Journal of Cell Biology* 2000; 149 (2): 249-54.