

R-6521

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA

ESTUDIO DE LA FUNCION DE LA CELULA B DEL PANCREAS
ENDOCRINO EN RATAS SOMETIDAS A DIFERENTES DIETAS

por

Remedios Ramírez Cárdenas

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
BIBLIOTECA

Tesis para optar al grado
de Doctor en Farmacia

Sevilla, Agosto de 1986

ESTUDIO DE LA FUNCION DE LA CELULA B DEL PANCREAS
ENDOCRINO EN RATAS SOMETIDAS A DIFERENTES DIETAS

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en
Farmacia por la Licenciada Remedios Ramírez Cárdenas

Sevilla, Agosto de 1986

DIRECTOR



R. GOBERNA ORTIZ
Catedrático-Director del
Departamento de Bioquímica
de la Facultad de Medicina
de la Universidad de Sevilla.

PONENTE



A. MACHADO DE LA QUINTANA
Catedrático de Bioquímica
de la Facultad de Farmacia
de la Universidad de Sevilla.



AVDA. SANCHEZ PIZJUAN, 4
TELEFS. 37 79 50 - 37 78 70

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
FACULTAD DE MEDICINA
41009 SEVILLA

D. RAIMUNDO GOBERNA ORTIZ, Catedrático de
Bioquímica de la Facultad de Medicina de
la Universidad de Sevilla

CERTIFICA : que el trabajo titulado "Estudio de la función
de la célula B del páncreas endocrino en ratas
sometidas a diferentes dietas", ha sido reali-
zado en este Departamento por D^a R. Ramírez Cár-
denas bajo mi dirección.

Sevilla, Agosto de 1986

A handwritten signature in cursive script, reading "R. Goberna".

Fdo: Dr. R. Goberna

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Raimundo Goberna por la dirección de este trabajo y su constante interés en mi formación científica.

Al Dr. Francisco J. Bedoya por la ayuda en el inicio de este trabajo y su valiosa crítica del mismo.

A José M^a López por su inestimable colaboración y ayuda en la realización de la parte experimental.

Al Prof. Alberto Machado por aceptar ser Ponente de esta Tesis.

A todos mis compañeros del Departamento que me animaron en la realización de este trabajo.

A M^a del Carmen Gómez por su ayuda en la labor mecanográfica.

A mis padres

INDICE

I.- INTRODUCCION.....	1
1. Estructura del páncreas endocrino.....	1
2. Papel funcional de los islotes de Langerhans. Sistema de glucorregulación.....	3
3. Quimiosensibilidad de la célula B.....	6
3.1. Estimulación de la secreción de insulina por azúcares.....	6
3.1.1. Glucosa.....	9
3.1.2. Otros azúcares.....	11
3.2. Aminoácidos.....	12
3.3. Acidos grasos y cuerpos cetónicos.....	13
3.4. Hormonas y neurotransmisores.....	14
3.5. Fármacos.....	16
4. Mecanismos de reconocimiento del estímulo.....	18
5. Metabolismo de la glucosa por la célula B.....	22
5.1. Transporte de la glucosa.....	23
5.2. Fosforilación de la glucosa.....	24
5.3. Otros enzimas de la via glucolítica.....	26
6. Acoplamiento estímulo-secreción.....	29
6.1. Potencial de membrana y flujos iónicos en la célula B.....	29
6.2. Papel del Ca^{2+} en la secreción de insu- lina.....	30
6.2.1. Regulación de la concentración cito- plasmática de calcio.....	31
6.2.2. La calmodulina como receptor intra- celular del calcio.....	34
6.3. Papel del cAMP.....	38
6.3.1. Componentes del sistema cAMP en los islotes.....	38
6.3.1.1. Adenilato ciclasa.....	38
6.3.1.2. Fosfodiesterasa.....	39
6.3.1.3. Proteína quinasa.....	40
6.3.1.4. Fosfoproteína fosfatasa....	40
6.3.2. Acción de secretagogos sobre la producción de cAMP.....	41

6.3.3. Modo de acción del cAMP en la secreción de insulina.....	43
6.3.3.1. Estimulación de proteínas quinatas.....	43
6.3.3.2. Efecto sobre el metabolismo de la glucosa.....	44
6.3.3.3. Sistema microtúbulos y microfilamentos.....	44
6.3.3.4. Acción del cAMP sobre el flujo del Ca^{2+}	45
6.4. Metabolismo de los fosfolípidos en el acoplamiento estímulo-secreción.....	45
7. El ayuno como modelo experimental.....	49
8. Objetivos.....	51
II.- MATERIAL Y METODOS.....	53
1. Animales.....	54
2. Diseño experimental.....	57
3. Determinación de diversos parámetros bioquímicos en plasma.....	60
3.1. Lípidos.....	60
3.2. Proteínas totales.....	61
3.3. Albúmina.....	62
3.4. Nitrógeno ureico.....	62
3.5. Acido úrico.....	63
3.6. Creatinina.....	63
3.7. Iones.....	63
4. Test de tolerancia a la glucosa.....	66
4.1. Sobrecarga intravenosa de glucosa.....	66
4.2. Determinación de la glucosa.....	67
4.3. Coeficiente de asimilación de la glucosa...	67
5. Aislamiento y cuantificación de glucógeno hepático de rata.....	68

5.1. Aislamiento de glucógeno hepático.....	68
5.2. Determinación del glucógeno.....	69
5.2.1. Hidrólisis con amiloglucosidasa...	69
5.2.2. Análisis del glucógeno como glucosa.....	70
6. Técnica de la perfusión del páncreas aislado..	71
6.1. Descripción de la técnica operatoria.....	71
6.2. Descripción del sistema de perfusión.....	79
6.2.1. Circulación del líquido de perfusión.....	79
6.2.2. Oxigenación del líquido de perfusión.....	81
6.2.3. Registro de la presión de perfu- sión.....	82
6.2.4. Mantenimiento de la temperatura... 83	
6.2.5. Conexiones y cámara de perfusión.. 83	
6.2.6. Infusión de sustancias en el páncreas.....	84
6.2.7. Colector de fracciones.....	85
6.2.8. Líquido de perfusión.....	86
7. Aislamiento de los islotes de Langerhans.....	88
8. Incubación de los islotes.....	95
9. Ensayo de actividad fosforilante de la glu- cosa en extractos de islotes pancreáticos.....	96
9.1. Medio de incubación	98
9.2. Homogeneización.....	99
9.3. Ensayo.....	99
9.4. Cálculo de las actividades enzimáticas..	100
10. Determinación de proteínas.....	105
11. Extracción y valoración del contenido de in- sulina.....	105
12. Radioinmunoensayo de insulina.....	107
12.1 Preparación de insulina análisis y de marcaje.....	107

12.2.	Anticuerpos antiinsulina.....	108
12.3.	Marcaje de insulina.....	109
12.4.	Preparación de la curva estándar.....	114
12.5.	Valoración de la insulina en plasma de rata.....	115
12.6.	Valoración de la insulina en el medio de perfusión y en el medio de incuba- ción de los islotes.....	115
12.7.	Separación de las fracciones libres y ligada al anticuerpo.....	116
13.	Preparación del 2-Bromoesterato.....	119
14.	Reactivos y aparatos.....	120
14.1.	Procedencia de los reactivos.....	120
14.2.	Relación de aparatos utilizados.....	120
III.-	RESULTADOS.....	122
1.	Características de los animales: peso y consu- mo de alimento.....	123
2.	Niveles plasmáticos de diversos parámetros bioquímicos de ratas alimentadas con diferentes dietas.....	128
2.1.	Concentraciones de lípidos y de coleste- rol asociado a lipoproteínas en plasma....	128
2.2.	Niveles plasmáticos de proteínas totales, albúmina, nitrógeno ureico, ácido úrico y creatinina.....	128
2.3.	Concentraciones plasmáticas de algunos iones.....	129
3.	Test de tolerancia a la glucosa.....	137
3.1.	Niveles plasmáticos de glucosa tras una sobrecarga i.v. de glucosa en ratas ali- mentadas con diferentes dietas.....	137
3.2.	Niveles plasmáticos de insulina tras una sobrecarga i.v. de glucosa en ratas ali- mentadas con diferentes dietas.....	143

4.	Contenido de glucógeno en hígado de ratas alimentadas con dieta estándar, dieta glucosa y dieta pobre en carbohidratos.....	146
5.	Contenido de insulina del páncreas y de los islotes de Langerhans en ratas alimentadas con diferentes dietas.....	149
6.	Secreción de insulina inducida por glucosa en páncreas aislado y perfundido de ratas alimentadas con dieta estándar, dieta glucosa y dieta pobre en carbohidratos.....	153
7.	Secreción de insulina inducida por glucosa en islotes de Langerhans procedentes de ratas alimentadas con dieta estándar, dieta glucosa y dieta pobre en carbohidratos.....	155
8.	Actividades fosforilantes de la glucosa de islotes de Langerhans aislados de ratas alimentadas con dieta estándar, dieta glucosa y dieta pobre en carbohidratos.....	158
9.	Efecto del 2-Bromoestearato sobre la secreción de insulina inducida por glucosa en páncreas aislado y perfundido procedente de ratas alimentadas con dieta estándar.....	162
10.	Efecto del ayuno sobre la secreción de insulina en respuesta a la glucosa en páncreas aislado y perfundido de ratas ayunadas 96h....	165
11.	Efecto del 2-Bromoestearato sobre la secreción de insulina en páncreas aislado y perfundido de ratas ayunadas durante 96h.....	167
IV.-	DISCUSION.....	170
V.-	CONCLUSIONES.....	189
VI.-	BIBLIOGRAFIA.....	194

ABREVIATURAS

ADP: Adenosín difosfato.

A.e.: Actividad específica.

AMP: Adenosín monofosfato.

ATP: Adenosín trifosfato.

ATPasa: Adenosín trifosfatasa.

% B: Fracción de hormona unida al anticuerpo.

2-BrE: Acido 2-Bromoesteárico.

BSA: Albúmina sérica bovina.

BUN: Nitrógeno ureico.

C: Subunidad catalítica de las proteínas quinasas.

°C: Grados centígrados.

CH: Carbohidratos.

Ci: Curio.

c.p.m.: Cuentas por minuto.

db-cAMP: Dibutiril adenosín monofosfato cíclico.

DEAE-celulosa: Dietilaminoetil celulosa.

Dieta glucosa: 95'5% de glucosa.

Dieta pobre en CH: 3'2% de carbohidratos, 48'9% de grasas
y 43'4% de proteínas.

d.p.m.: Desintegraciones por minuto.

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético.

ESM: Error standard de la media.

% F: Fracción de hormona no unida al anticuerpo.

h : Hora.

HDL: Lipoproteína de densidad intermedia.
Hepes: Acido 4-(2-hidroximetil)-1-piperazinetansulfónico.
% I: Porcentaje de incorporación.
IA: Insulina de análisis.
IBMX: Isobutilmetilxantina.
IM: Insulina de marcaje.
IRI: Insulina inmunoreactiva.
i.v.: Intravenosa.
Km: Constante de Michaelis.
KRB: Krebs Ringer bicarbonato.
LDL: Lipoproteína de baja densidad.
M: Molar.
min: Minuto.
mv: Milivoltio.
n : Número de datos.
NAD⁺: Nicotinamida adenín dinucleótido oxidado.
NADH: Nicotinamida adenín dinucleótido reducido.
NADP⁺: Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato oxidado.
NADPH: Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido.
nm: Nanometro.
N.S.: No significativo.
PGE₂: Prostaglandina E₂.
Pi: Fósforo inorgánico.
pmol: 1×10^{-12} moles.
R: Subunidad reguladora de las proteínas quinasas.

RIA: Radioinmunoanálisis.

r.p.m.: Revoluciones por minuto.

s : Segundo.

sbte: Sobrenadante.

U : Unidades.

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad.

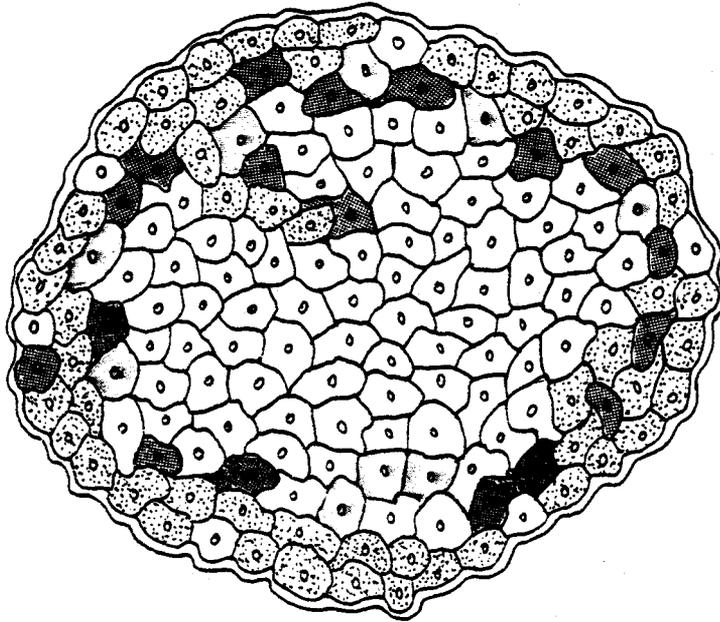
I. INTRODUCCION

1. ESTRUCTURA DEL PANCREAS ENDOCRINO

En los mamíferos, el páncreas es una glándula que tiene una doble función: exocrina y endocrina. El órgano adulto es una estructura alargada dividida en tres regiones: la cabeza, el cuerpo y la cola. Embriológicamente, se desarrolla a partir de dos divertículos del duodeno, uno que forma parte de la cabeza y el otro que forma el resto del páncreas.

La función endocrina del páncreas es realizada por los islotes de Langerhans, constituyendo del 1-2% de la masa total del órgano. Los islotes constituyen acúmulos celulares muy vascularizados e inervados, que se encuentran diseminados por todo el páncreas, con mayor número en la cola que en el cuerpo y la cabeza. Su diámetro oscila entre 50-300 μm (HELLMAN et al. 1964), con un peso seco de aproximadamente 0'6 μg , un contenido en DNA de 50 ng por islote y un promedio de 5.700 células por islote (GREEN y TAYLOR, 1972).

En los islotes de Langerhans existen al menos cuatro tipos de células: células A o productoras de glucagón, localizadas en la periferia del islote, células B o productoras de insulina y que constituyen un 50-90% del volumen celular, células D o productoras de somatostatina, localizadas por dentro de las células A, y las células PP o productoras de polipéptido pancreático (LARSON et al. 1976). (Fig. 1).



Células A  Glucagón

Células B  Insulina

Células D  Somatostatina

Células PP  Polipéptido pancreático

Fig. 1.- Esquema de la distribución celular del islote de Langerhans de rata.

2. PAPEL FUNCIONAL DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS.

SISTEMA DE GLUCORREGULACION

En los animales superiores la concentración de glucosa en sangre (entre 3'3 y 10 mmol/l) es controlada por mecanismos homeostáticos eficientes. Así, tras la ingestión de una comida rica en carbohidratos o después de un ayuno de 36-48 h no se observan grandes variaciones en la glucemia.

En 1853, Claude Bernard reconoció que la constancia de la glucosa en el "milieu interieur" o espacio extracelular se mantenía mediante un equilibrio entre el aporte del hígado o intestino y el consumo por los tejidos periféricos. Posteriormente, supuso que este equilibrio estaba regulado por el sistema nervioso central mediante un balance de fuerzas opuestas: "nerfs desassimilateurs", que estimulaban la producción de glucosa hepática, y "nerfs assimilateurs", que estimulaban la utilización de la glucosa.

Actualmente, se sabe que son los islotes de Langerhans los órganos encargados de la regulación de los niveles de glucosa sanguínea. Al mismo tiempo, el páncreas endocrino es controlado por el sistema nervioso central a través de terminaciones adrenérgicas, colinérgicas y peptídicas (EDWARDS y BLOOM, 1978) (Fig. 2).

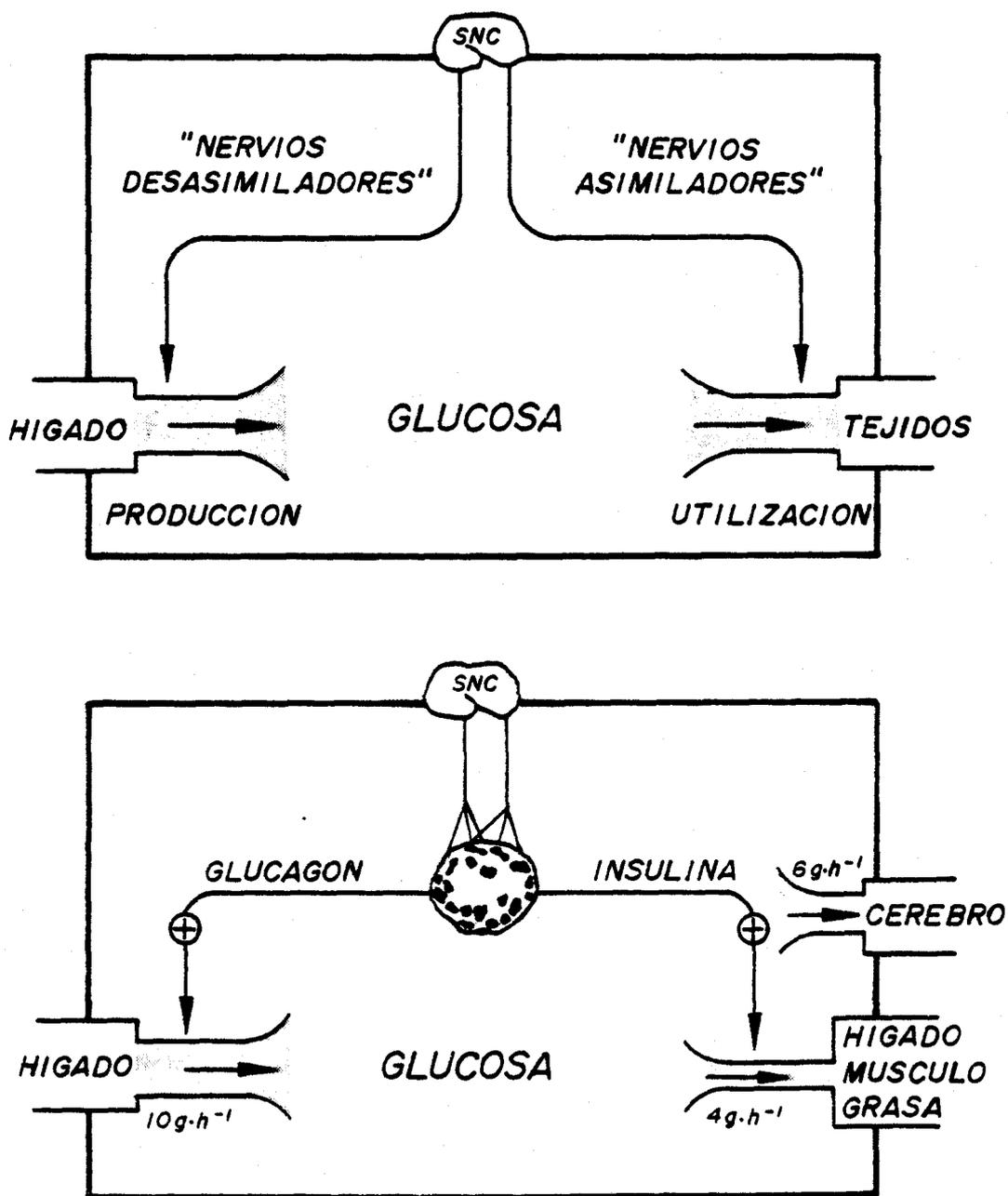


Fig. 2.- Homeostasis de la glucemia (UNGER,1981)

Superior: concepto de Claude Bernard.

Inferior: concepto actual.

Por otra parte, las hormonas liberadas por los islotes ejercen una acción local o paracrina sobre las actividades secretorias de sus células vecinas. Así, la somatostatina liberada por las células D, que están localizadas entre las células A y las células B, inhiben la secreción de ambas hormonas, glucagón (KOERKER et al., 1974) e insulina (OSORIO et al., 1976); el glucagón estimula la secreción de las células B (SAMOLS et al., 1965) y de las células D (PATTON et al., 1977); la insulina inhibe la secreción de glucagón (SAMOLS et al., 1972).

La necesidad de un sistema regulador de la glucosa circulante radica en que ésta es el principal combustible del sistema nervioso central, siendo sus necesidades energéticas del orden de 6 g de glucosa por hora. Esta cantidad puede ser aportada por la circulación sólo si la concentración de glucosa circulante excede de 2.75 mmol/l. Por otra parte, una hiperglucemia excesiva puede producir modificaciones posttranscripcionales de determinadas proteínas, lo que puede modificar su estructura y función (CERAMI et al., 1979).

3. QUIMIOSENSIBILIDAD DE LA CELULA B

La célula beta no sólo es sensible a la glucosa, sino que otros carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, cuerpos cetónicos, hormonas, etc., pueden actuar incluso a niveles considerados como fisiológicos (Fig. 3). Muchos de estos agentes provocan escasa liberación de insulina cuando se administran solos, siendo necesario concentraciones basales de glucosa para estimular la respuesta insulínica.

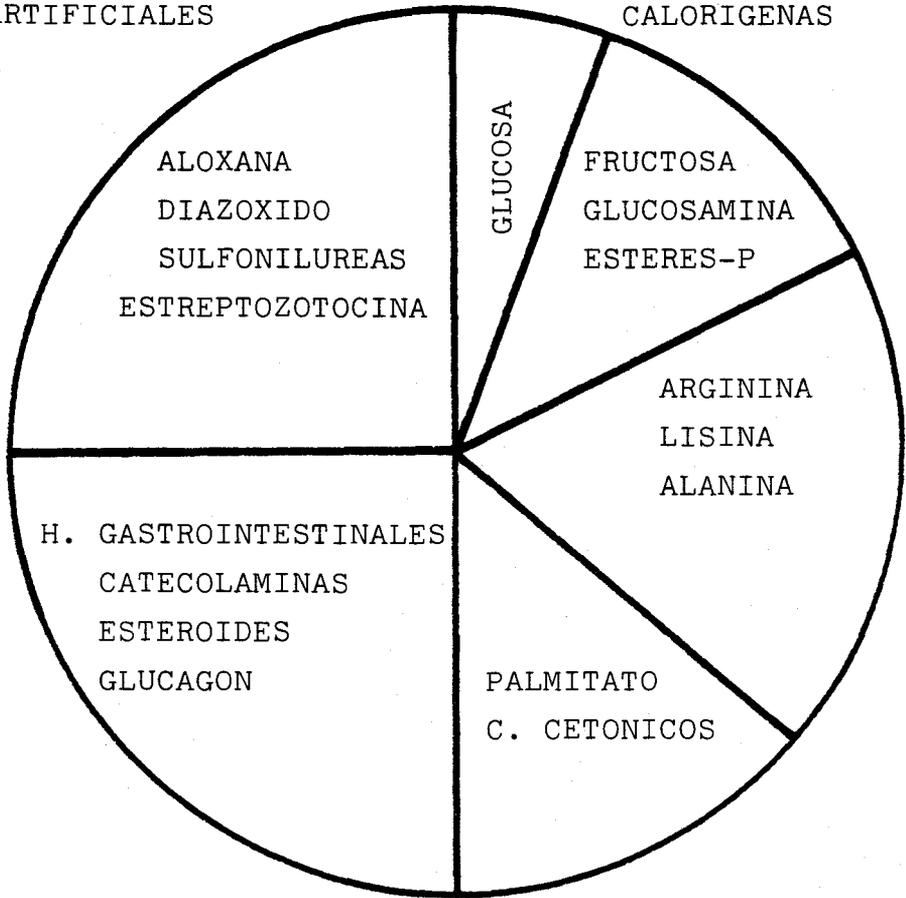
3.1. Estimulación de la secreción de insulina por azúcares

Se denominan iniciadores aquellos compuestos que estimulan la liberación de insulina "per se" y potenciadores aquellas sustancias que son inefectivas solas necesitando la presencia de un iniciador para estimular la respuesta insulínica.

En la tabla I se muestran los efectos de algunos carbohidratos y sus derivados sobre la liberación de insulina. Estas sustancias se clasifican en iniciadores, potenciadores, inhibidores e inertes (ASHCROFT, 1976).

MODIFICADORES NATURALES
Y ARTIFICIALES

SUSTANCIAS
CALORIGENAS



CELULA BETA

Fig. 3.- Quimiosensibilidad de la célula B.

TABLA I

INICIADORES

D-glucosa

D-manosa

D-gliceraldehido

Dihidroxiacetona

D-glucosamina

POTENCIADORES

D-fructosa

N-acetilglucosamina

L-gliceraldehido

D-manoheptulosa

D-glucosamina

INHIBIDORES

D-manoheptulosa

D-glucosamina

SIN EFECTO

L-glucosa

3-O-metilglucosa

2-deoxiglucosa

D-galactosa

D-ribosa

D-ribitol

D-xilitol

3.1.1 Glucosa

La D-glucosa es el más potente iniciador fisiológico de la liberación de insulina. Esta respuesta secretora de la célula B a la glucosa muestra una especificidad anómérica siendo el anómero α un estimulador más potente que el anómero β (GRODSKY et al., 1974).

Cinética de la secreción

La respuesta insulínica de la célula B a una determinada concentración de glucosa es de naturaleza bifásica. Estos estudios fueron realizados por GRODSKY et al. (1968) en páncreas perfundido de rata. Aparece una elevación en la secreción de insulina a los 0'5-1 min, retornando a los valores basales en varios minutos. A continuación, aparece un segundo pico en la secreción de insulina más constante y espaciado en el tiempo.

Varias hipótesis han sido propuestas para explicar la respuesta bifásica. Una primera hipótesis, postula la existencia de dos compartimentos para la insulina: uno pequeño y lábil a la glucosa y otro más grande que responde más lentamente a la glucosa (GRODSKY et al., 1969). La transferencia de insulina de un compartimento a otro es un paso limitante.

Otra hipótesis, sostiene que la cinética multifásica puede ser debida a una inhibición "feedback" de la secreción por la hormona liberada (PACE et al., 1977).

Una tercera hipótesis, propone que la dinámica temporal de la secreción de insulina se debe a la actuación secuencial de las dos ramas del sistema mensajero del calcio: la "rama de la calmodulina", responsable de la iniciación de la respuesta, y la "rama de la proteína quinasa C" que mantiene la secreción (ZAWALICH et al., 1983).

Dependencia de la concentración de glucosa

La respuesta insulino secretora a concentraciones crecientes de glucosa es de tipo sigmoide (ARILLA, 1979; BEDOYA et al., 1984a).

Concentraciones de glucosa por debajo de 3 mM no tienen efecto sobre la secreción de insulina. La concentración umbral es aproximadamente 5 mM y la máxima respuesta secretora se obtiene a 17 mM. La máxima sensibilidad en la respuesta insulino secretora está a una concentración de glucosa que oscila entre 5-10 mM, que coincide con los niveles de glucosa circulantes. La concentración de glucosa que produce una respuesta insulínica semimáxima es 6 mM (ASHCROFT et al., 1972a).

La naturaleza sigmoidea de la curva dosis-respuesta para la secreción de insulina inducida por glucosa

ha sido atribuida a una distribución gaussiana de umbrales para la estimulación entre las células B (GRODSKY, 1975).

3.1.2. Otros azúcares

La D-manosa es un potente estimulador de la secreción de insulina "per se", con una cinética de liberación de tipo bifásico, una concentración umbral algo más elevada que la de la glucosa (10 mM) y una respuesta de tipo sigmoide desplazada hacia la derecha (ZAWALICH et al., 1977a).

El anómero α de la D-manosa es un estimulador de la secreción de insulina más efectivo que el anómero β ; la fosforilación de la D-manosa por la glucoquinasa presenta la misma preferencia anomérica (MEGLASSON y MATSCHINSKY, 1984). La velocidad máxima de metabolización de la manosa por los islotes es igual a la de la glucosa, pero la concentración necesaria para alcanzar la velocidad semimáxima es mayor (ZAWALICH et al., 1977a).

La D-fructosa "per se" no estimula la secreción de insulina, ni a concentraciones por encima de 50 mM. Sin embargo, puede potenciar la secreción de insulina en presencia de una concentración basal de glucosa (ZAWALICH et al., 1977a). Por otra parte, la fructosa es poco metabolizada por los islotes.

El D-gliceraldehido y la dihidroxiacetona aumentan la secreción de insulina "per se" (HELLMAN et al., 1974a).

La N-acetilglucosamina estimula la secreción de insulina con una concentración umbral de 10 mM, una respuesta semimáxima a 15-17 mM y una respuesta máxima a 20 mM (ZAWALICH, 1979). Además, la N-acetilglucosamina es un potenciador de la secreción de insulina inducida por la glucosa y el gliceraldehido (HELLMAN et al., 1974a).

El sorbitol es un potenciador de la secreción de insulina en islotes de rata (MALAISSE et al., 1974a), mientras que la L-glucosa, la galactosa, la 3-O-metilglucosa, la ribosa, el ribitol y el xilitol no tienen efecto alguno (HEDESKOV, 1980).

La mannoheptulosa inhibe la respuesta insulino secretora a la glucosa, por inhibición de su fosforilación (ZAWALICH et al., 1977b).

En general, se puede afirmar que existe una acentuada correlación entre la capacidad insulino secretora de los azúcares descritos y la capacidad que tiene el islote de Langerhans para metabolizarlos.

3.2. Aminoácidos

Hay determinados aminoácidos que estimulan la liberación de insulina. La capacidad insulino secretora de cada aminoácido varía según la especie. En el hombre el

más potente es la arginina, seguido de lisina y leucina (FAJANS et al., 1972).

La arginina se comporta como un potenciador de la acción insulino secretora de la glucosa, dando lugar a una liberación mayor que la obtenida con glucosa sola (ARILLA et al., 1979).

La L-glutamina no estimula la liberación de insulina en presencia o ausencia de glucosa (MALAISSE et al., 1980), pero potencia la secreción de insulina inducida por la L-leucina (SENER et al., 1981).

3.3. Acidos grasos y cuerpos cetónicos

Los lípidos y sus derivados son capaces de modificar la secreción de insulina por la célula B. Los ácidos grasos de cadena corta (propionato, butirato y octanato) o larga (palmitato y oleato) y los cuerpos cetónicos (acetoacetato y β -hidroxibutirato) estimulan la secreción de insulina en presencia de concentraciones basales de glucosa (GOBERNA et al., 1974; BIDEN y TAYLOR, 1983). El hecho de que el palmitato, el β -hidroxibutirato y el acetoacetato no produzcan un aumento de la secreción de insulina en ausencia de glucosa parece indicar que el mecanismo estimulador es dependiente de la glucosa.

3.4. Hormonas y neurotransmisores

Existe un gran número de hormonas que intervienen en la regulación de la secreción de insulina, bien por un mecanismo directo o indirecto. La mayor parte de los trabajos están realizados a dosis farmacológicas siendo cuestionable por tanto la validez de los resultados desde un punto de vista fisiológico.

Entre las hormonas que inhiben la secreción de insulina destaca la somatostatina (TAMARIT et al., 1974a; OSORIO et al., 1976), que ejerce un efecto paracrino sobre la célula B. Por el contrario, el glucagón estimula la secreción de insulina (SAMOLS et al., 1965).

La hormona adrenocorticotropa (ACTH) estimula la adenilato ciclasa de los islotes de Langerhans y la secreción de insulina (KUO et al., 1973).

La calcitonina, cuya función es disminuir los niveles de calcio en sangre, es capaz de inhibir la segunda fase de la secreción de insulina mediada por glucosa, probablemente por la acción de esta hormona sobre el calcio extracelular (TAMARIT, et al., 1976).

Se ha demostrado que las hormonas gastrointestinales participan en el proceso de secreción de la insulina ya que tanto la glucosa como los aminoácidos provocan una liberación mayor cuando se administran por vía oral que cuando se hace por vía intravenosa (McINTYRE et al.,

1965). La gastrina, secretina y pancreozimina potencian la secreción de insulina mediada por glucosa (GOBERNA, 1972). La pancreozimina es la de acción más potente y estimula tanto la secreción de insulina como la de glucagón (FUSSGANGER et al., 1969).

Las hormonas esteroideas no tienen una acción directa sobre la función del islote. Después de un tratamiento prolongado con esteroides aparece una hipertrofia en los islotes de Langerhans, con una respuesta insulínica acentuada a la glucosa (GOBERNA et al., 1971).

La acetil colina incrementa la secreción de insulina a concentraciones basales de glucosa y estimula la adenilato ciclasa de los islotes (KUO et al., 1973).

Las catecolaminas a altas concentraciones inhiben la secreción de insulina en respuesta a la glucosa (CERASI et al., 1972). La adrenalina facilita la salida de calcio al exterior y el desplazamiento del calcio intracelular a los lugares de reserva (BRISSEY y MALAISSE, 1973). La respuesta de la célula B a la administración de glucagón, teofilina, db-cAMP, tolbutamida es también inhibida por la adrenalina.

La serotonina es un inhibidor de la secreción de insulina (TAMARIT et al., 1974b).

El efecto de las prostaglandinas sobre la secreción de insulina también ha sido estudiado, encontrándose discrepancias entre los resultados "in vivo" e "in vitro".

La mayoría de los estudios "in vivo" indican que las prostaglandinas inhiben la liberación de insulina (ROBERTSON, 1979). Sin embargo, MATSUYAMA y col. (1983) han observado que la PGD_2 estimula la secreción de insulina en páncreas perfundido de rata, aunque queda por confirmar si su vía de actuación es de modo directo o indirecto.

3.5. Fármacos

La aloxana y la estreptozotocina ejercen un efecto citotóxico selectivo sobre la célula B, pudiéndose conseguir una diabetes experimental (GOBERNA, 1975).

La aloxana inhibe la secreción de insulina en respuesta a la glucosa (BORG, 1981). Asimismo, ejerce un efecto inhibitor sobre la utilización de la glucosa, siendo anulado este efecto mediante una incubación previa con una concentración alta de glucosa (BORG et al., 1979).

El diazóxido inhibe la secreción de insulina (MILNER y HALES, 1969), debido a una disminución de la captación de calcio por la célula B (MALAISSE-LAGAE y MALAISSE, 1971).

La acción hipoglucemiante de las sulfonilureas (tolbutamida y glibenclamida) es debido a su efecto sobre el páncreas endocrino, pero su modo de acción a nivel molecular no está bien definido. La acción de estos fármacos

sobre la secreción de insulina es glucosa independiente, observándose una potenciación sólo a concentraciones basales de glucosa (CERASI y KAISER, 1983). Por otra parte, se ha comprobado que las sulfonilureas son potentes inhibidores de la fosfodiesterasa y que aumentan los niveles de cAMP en presencia de glucosa (GRILL y CERASI, 1978). También actúan sobre el metabolismo del Ca^{2+} (GYLFE et al., 1984).

Las metilxantinas (teofilina, cafeína e isobutilmetilxantina) estimulan la secreción de insulina en presencia de glucosa (BORG, 1981). Actúan inhibiendo la fosfodiesterasa del islote y por tanto aumentando en segundo término los niveles intracelulares de cAMP (ORTIZ, 1980). Existe un paralelismo entre la eficacia en la inhibición de la fosfodiesterasa y la capacidad de potenciar la secreción de insulina, siendo el IBMX el más potente de las metilxantinas.

4. MECANISMOS DE RECONOCIMIENTO DEL ESTIMULO

Como hemos visto en el apartado anterior, la célula B es sensible a una amplia variedad de compuestos: carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, cuerpos cetónicos, hormonas y drogas. Tiene una especial importancia el estudiar los mecanismos por los que la célula B reconoce a los azúcares como señal (reconocimiento del estímulo) para poner en marcha los mecanismos de secreción insulínica.

Se define como glucosensor a la especie molecular que por su capacidad de unión a la glucosa confiere a la célula B la sensibilidad a los cambios en la concentración extracelular de glucosa.

Se han propuesto dos modelos de glucosensor: modelo del locus regulador y modelo del locus sustrato (RANDLE et al., 1968).

Hipótesis del "locus regulador"

Según esta hipótesis, el glucosensor sería una proteína unida a la membrana y capaz de unirse a la glucosa y a otros azúcares. La combinación del azúcar con el receptor induce un cambio conformacional en el receptor que pone en marcha los mecanismos que conducen a la síntesis y liberación de insulina.

Un primer dato experimental en apoyo de esta hipótesis fue la demostración de la existencia de un sistema transportador de la glucosa en la membrana de la célula B que presentaba especificidad α -anomérica (HELLMAN et al., 1971). Se sugirió que este transportador podría ser el glucorreceptor. Sin embargo, posteriormente se comprobó que análogos estructurales de la glucosa, como la 3-O-metilglucosa, la 5-tioglucona y la 2-deoxiglucosa, que son transportados por el mismo sistema, pero no son metabolizables, no estimulaban la secreción de insulina (HELLMAN et al., 1973 a y b).

Un segundo dato experimental que apoya este modelo es el hecho de que la glucosa (16'7 mM) activa la adenilato ciclasa del islote e incrementa los niveles de cAMP (CAPITO y HEDESKOV, 1977; ORTIZ, 1980). Sin embargo, esto no parece ser cierto porque los niveles elevados de cAMP constituyen una condición necesaria pero no suficiente para estimular la secreción de insulina.

Otra evidencia que apoya esta hipótesis está en que la floretina inhibe la secreción de insulina inducida por la glucosa, pero no afecta la velocidad de utilización de glucosa (ASHCROFT y NILO, 1978). El hecho de que ciertos agentes inhiban la secreción de insulina sin afectar el metabolismo de la glucosa en el islote pudiera ser debido a que actúan sobre algún componente de la

maquinaria secretora distinto del sistema de reconocimiento de la glucosa.

Hipótesis del "locus para el sustrato"

Según este modelo , el metabolismo de la glucosa dentro de la célula B proporciona una serie de intermediarios metabólicos que actúan como señales intracelulares de la síntesis y liberación de la insulina.

Esta hipótesis tiene su base experimental en el hecho de que sólo los azúcares que son metabolizados en el islote estimulan la secreción de insulina. Se ha demostrado que existe una estrecha correlación entre la velocidad de oxidación de los azúcares y su capacidad insulino secretora: glucosa > manosa > fructosa = N-acetilglucosamina > galactosa.

Por otra parte, tanto la estimulación de la secreción de insulina como el metabolismo de la glucosa presentan especificidad anomérica. La α -D-glucosa es mejor estimulador de la secreción (GROSKY et al., 1974) y es mejor metabolizada por la célula B (IDAHL et al., 1976).

La manoheptulosa, que inhibe la fosforilación de la glucosa, y el iodoacetato, otro inhibidor de la glicolisis, bloquean la liberación de la insulina en respuesta a la glucosa (ZAWALICH et al., 1977b).

Por último, el D-gliceraldehído, que entra en la vía glucolítica a nivel de las triosas fosfato, estimula

la secreción de insulina y su efecto no es anulado por la manoheptulosa (ASHCROFT et al., 1973).

Todos estos datos experimentales apoyan la hipótesis del locus sustrato. De acuerdo con ella, el glucosensor es un sistema enzimático que controlaría la metabolización de la glucosa.

Estudios recientes han identificado el sistema sensor de la glucosa en el islote. Con bastante probabilidad dicho sistema sensor es la glucoquinasa, la enzima que fosforila la glucosa y que controla el flujo a través de la vía glucolítica en la célula B en el rango fisiológico de concentraciones extracelulares de glucosa.

Diversos argumentos apoyan esta idea: 1) dicha enzima presenta preferencia α -anomérica, similar a la de secreción de insulina y a la de la vía glucolítica (MEGLASSON y MATSCHINSKY, 1984), 2) es inhibida específicamente por la manoheptulosa que también bloquea la metabolización de la glucosa en la célula B y la respuesta insulino secretora (ZAWALICH et al., 1977b) y 3) en condiciones metabólicas, como el ayuno, en las que la secreción de insulina en respuesta a la glucosa está bloqueada, la actividad glucoquinásica sufre una disminución adaptativa (MALAISSE et al., 1976 ; BURCH et al., 1981; BEDOYA et al., 1984b).

5. METABOLISMO DE LA GLUCOSA POR LA CELULA B

La glucosa en la célula B puede seguir cuatro caminos diferentes: 1) almacenarse en forma de glucógeno, 2) transformarse en sorbitol por la vía del poliol, 3) ser degradada por el ciclo de las pentosas fosfato, y 4) metabolizarse por la vía glucolítica y ciclo del ácido cítrico.

Aunque los islotes poseen los sistemas enzimáticos necesarios para la síntesis y degradación del glucógeno, parece ser que el metabolismo del glucógeno juega un papel mínimo en estas células (MALAISSE et al., 1977; FONTELA et al., 1984). También, la formación de sorbitol (MALAISSE et al., 1974a) y el metabolismo de la glucosa en el ciclo de las pentosas fosfato son vías poco importantes (HEDESKOV y CAPITO, 1975).

La capacidad insulino secretora de la glucosa está ligada a su metabolización por la vía glicolítica y el ciclo del ácido cítrico en la célula B pancreática. Así, inhibidores de la glicolisis como la manoheptulosa (inhibidor de la fosforilación de la glucosa) o el iodoacetato (inhibidor de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa) bloquean la secreción de insulina (ZAWALICH et al., 1977b).

La curva que relaciona concentraciones crecientes de glucosa y su metabolismo en la célula B, medido como

el consumo de oxígeno, la oxidación de la glucosa, el flujo a través de la vía glicolítica y la concentración de metabolitos, es de tipo sigmoideo (SENER y MALAISSE, 1984). Esta característica coincide con la cinética de secreción de la insulina en respuesta a la glucosa.

5.1. Transporte de la glucosa

Como hemos dicho anteriormente, la glucosa tiene que ser metabolizada por la célula B para estimular la secreción de insulina. La D-glucosa, pero no la L-glucosa, es transportada a través de la membrana plasmática por un transportador específico de alta capacidad igualándose rápidamente las concentraciones extra e intracelular de glucosa (HELLMAN et al., 1971).

La captación de glucosa es un proceso saturable, con una Km de aproximadamente 50 mM (HELLMAN et al., 1971). El hecho de que la α -3-O-metil-D-glucosa proteja a los islotes de la aloxana más eficientemente que el anómero β , indica una especificidad α -anomérica para el transporte de la glucosa (ROSSINI et al., 1975).

La floricina y floretina que inhiben el transporte de la glucosa no modifican el efecto de la glucosa sobre la secreción de insulina, lo que indica que el transporte de la glucosa no es un factor limitante para su metabolización por la célula B (ASHCROFT y NILO, 1978).

5.2. Fosforilación de la glucosa

Los islotes de Langerhans poseen un doble sistema enzimático para fosforilar la glucosa: hexoquinasa (ATP-D hexosa 6-fosfotransferasa, EC 2.7.1.1.) que tiene una alta afinidad por la glucosa (K_m 50-200 μ M) y glucoquinasa (ATP-D glucosa 6-fosfotransferasa, EC 2.7.1.1.), con una baja afinidad hacia glucosa ($K_m \sim 10$ mM) (ASHCROFT y RANDLE, 1970; MALAISSE et al., 1976 ; TRUS et al., 1981; BEDOYA et al., 1984b). La hexoquinasa es inhibida alostéricamente por su producto, glucosa 6-fosfato ($K_i = 0.13$ mM), y por glucosa 1,6-bifosfato ($K_i = 0.2$ mM) (GIROIX et al., 1984); representa aproximadamente del 80-90% de la actividad fosforilante total de la glucosa en homogenado de islotes.

Por el contrario, la glucoquinasa no es inhibida por glucosa 6-fosfato (MALAISSE et al., 1976) y representa sólo del 20-30% de la actividad fosforilante total de la glucosa. Ha sido parcialmente purificada, mostrando un perfil cromatográfico similar al de la glucoquinasa hepática, así como una cooperatividad positiva hacia su sustrato, la glucosa (MEGLASSON et al., 1983; BEDOYA et al., 1985).

El ayuno inhibe tanto la actividad glucoquinásica como la hexoquinásica, siendo esta inhibición mayor para la glucoquinasa (BURCH et al., 1981; BEDOYA et al., 1984b).

La concentración de glucosa en el exterior e interior del islote es del orden de 5-7'5 mM; en estas condiciones la actividad hexoquinasa estaría completamente saturada mientras que la glucoquinasa estaría al 50% de su velocidad máxima. A concentraciones fisiológicas de glucosa, la enzima que controla el flujo a través de la vía glucolítica es la glucoquinasa y no la hexoquinasa ya que ésta se encuentra completamente saturada.

Por otra parte, debido a la baja K_i de la hexoquinasa para la glucosa 6 fosfato y a que la concentración de glucosa 6 fosfato intraislote es del orden de 0'35 mM, cuando la concentración de glucosa extracelular es de 7'5 mM (ASHCROFT et al., 1970), la actividad hexoquinasa está inhibida en un 60-70% a concentraciones fisiológicas de glucosa extracelular.

Existe una tercera enzima con capacidad para fosforilar la glucosa, se trata de la N-acetil glucosamina quinasa (ATP: 2-acetamido-2-deoxi-D-glucosa 6-fosfotransferasa, EC 2.7.1.59) con una elevada K_m para la glucosa ($K_m > 100$ mM) (DAVAGNINO y URETA, 1980).

También, ha sido identificada glucosa-6-fosfatasa (D-glucosa 6 fosfohidrolasa, EC 3.1.1.3.9.) en islotes de ratón y hamster (TALJEDAL, 1969). Esta enzima podría regular también la fosforilación de la glucosa, dada su baja K_m para la glucosa 6-fosfato (1 mM) y su inhibición por la glucosa (K_m 10 mM) (ASHCROFT y RANDLE, 1970).

5.3. Otros enzimas de la vía glucolítica

La glicolisis es la principal vía utilizada por la glucosa para su oxidación. La enzima que actúa tras la fosforilación de la glucosa es la fosfoglucoisomerasa (D-glucosa-6 fosfato cetona isomerasa, EC 5.3.1.9.), se caracteriza por presentar especificidad anomérica por la α -D-glucosa (MALAISSE et al., 1983).

La fosfofructoquinasa (ATP: D-fructosa 6 fosfato, 1 fosfotransferasa, EC 2.7.1.11) ha sido estudiada por MALAISSE y col. (1976) . El ATP actúa como un efector positivo hasta una concentración de 0'3 mM; por encima de ella, actúa como efector negativo. El citrato 5 mM inhibe la fosfofructoquinasa, el grado de inhibición se incrementa del 34 al 66% con respecto a los controles, cuando la concentración de ATP se eleva de 0'3 a 3 mM. El AMP 0'1 mM no la activa a bajas concentraciones de ATP (0'05-0'3 mM), pero impide la inhibición por elevadas concentraciones de ATP.

El ayuno produce un descenso en la actividad de la fosfofructoquinasa (BURCH et al., 1981), sin modificar su modulación por ATP o AMP (MALAISSE et al., 1976) .

Recientemente, se ha descrito un nuevo modulador para este enzima, la fructosa 2,6-bifosfato (MALAISSE et al., 1982a). La glucosa produce un incremento en el contenido de fructosa 2,6-bifosfato de los islotes y de

las células B purificadas, activándose la fosfofructoquinasa (MALAISSE et al., 1982b; SENER et al., 1984); la curva dosis-respuesta es una hipérbola en los islotes, con una respuesta semimáxima a glucosa 6'2 mM, y un sigmoide en las células B purificadas.

No se ha detectado actividad de fructosa 1,6 difosfatasa (SENER y MALAISSE, 1978), por lo que no existe gluconeogénesis y el ciclo fútil fructosa 6 fosfato/fructosa 1,6-bifosfato no puede actuar como regulador de la glucosa.

ASHCROFT y RANDLE (1970) han estudiado la actividad de sistemas enzimáticos del metabolismo de la glucosa que pueden producir nucleótidos de piridina en estado reducido. Estos enzimas son: isocitrato deshidrogenasa (treo Ds-isocitrato: NADPH oxidorreductasa EC 1.1.1.1.42), piruvato carboxilasa (2-oxidoacidcarboxy-liasa EC 4.1.1.1.) y enzima málico (L-malato: NADP⁺ oxidorreductasa, dexcarboxilante de oxalacetato, EC 1.1.1.40.).

En la fig. 4, se muestran las principales etapas de la vía glucolítica.

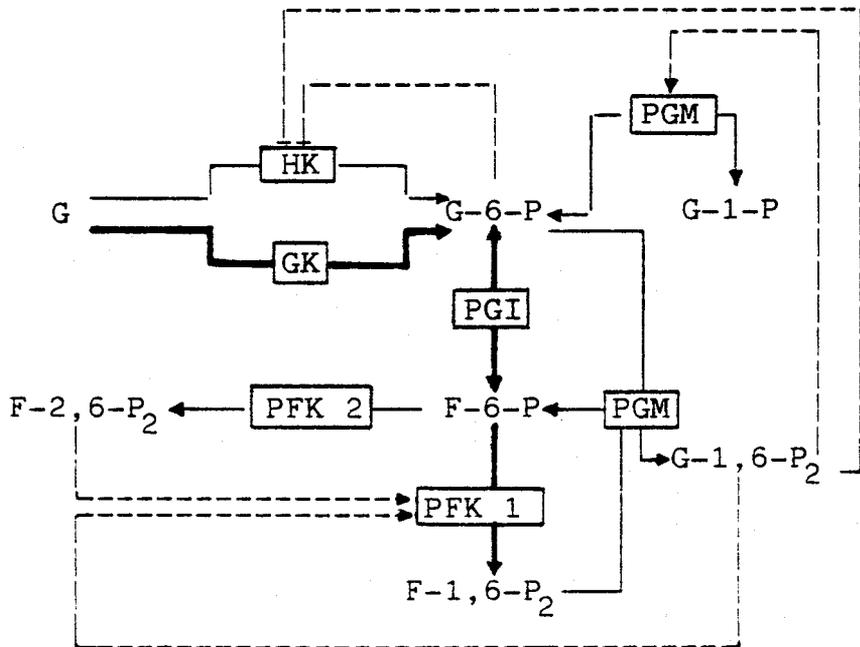


Fig. 4.- Representación esquemática de las principales etapas del metabolismo de la glucosa en islotes pancreáticos. La activación e inhibición de enzimas (GK:glucoquinasa; HK:hexoquinasa; PGI:fosfoglucoisomerasa; PGM:fosfoglucomutasa; PFK 1:fosfofructoquinasa; PFK 2:fructosa 6 fosfato,2-quinasa) están indicadas mediante líneas discontinuas. La ruta metabólica principal está indicada por línea gruesa y las rutas secundarias por líneas finas.

6. ACOPLAMIENTO ESTIMULO-SECRECION

6.1. Potencial de membrana y flujos iónicos en la célula B

Los iones desempeñan un papel importante en el acoplamiento estímulo-secreción. Se ha demostrado, que durante el proceso de secreción de la insulina se altera la permeabilidad de la membrana plasmática de la célula B para el Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^- , bicarbonato y fosfato (HENQUIN y LAMBERT, 1976; CAMPILLO et al., 1978; SEHLIN, 1978; HENQUIN, 1980).

Algunas células secretoras, como las cromafines, adenohipofisarias y pancreáticas, poseen canales iónicos voltaje dependientes, son células excitables con capacidad para generar potenciales de acción y su potencial de membrana se modifica por secretagogos.

Utilizando microelectrodos de alta resistencia se ha observado que el potencial de membrana de la célula B es estable y está comprendido entre -60 y -70 mV (HENQUIN, y MEISSNER, 1982). Una elevación en la concentración extracelular de D-glucosa produce en menos de un minuto una despolarización de la membrana de 10-15 mV conduciendo el potencial de membrana a un valor umbral (-35, -40 mV), a partir del cual aparecen potenciales de acción (espigas) por apertura de canales de calcio dependientes de voltaje. Otros azúcares que inducen cambios similares

en el potencial de membrana son la D-manosa y el D-gliceraldehido, pero no la D-manoheptulosa, la 3-O-metilglucosa, 2-deoxiglucosa y L-glucosa.

Como consecuencia de la metabolización de la glucosa se bloquean los canales de K^+ , disminuyendo la salida de K^+ y por lo tanto se despolariza la membrana (ASHCROFT et al., 1984). Esta despolarización activa los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, entrando calcio en la célula, que inicia una actividad eléctrica. El aumento de Ca^{2+} citoplasmático en las cercanías de la membrana activa la conductancia al K^+ (calcio dependiente) por lo que la membrana se repolariza de nuevo.

6.2. Papel del Ca^{2+} en la secreción de insulina

La estimulación de la secreción de insulina por glucosa tiene lugar en presencia de cantidades suficientes de Ca^{2+} extracelular (WOLLHEIM y SHARP, 1981) de forma que, en ausencia de Ca^{2+} extracelular ambas fases de secreción (primera y segunda) están disminuidas (GRODSKY et al., 1968). Sin embargo, WOLLHEIM y col. (1980) han demostrado que la entrada de Ca^{2+} en la célula B sólo es importante para la segunda fase de secreción, mientras que la glucosa inicia la primera fase de liberación utilizando el calcio intracelular.

Se ha comprobado que la glucosa produce una acumulación de calcio dentro de la célula B (DELEERS et al., 1985). La curva que relaciona la concentración extracelular de glucosa y la captación de calcio también es de tipo sigmoideo. Esta acumulación de calcio es inhibida por la manoheptulosa (MALAISSE et al., 1979).

6.2.1. Regulación de la concentración citoplasmática de calcio

La concentración extracelular de Ca^{2+} necesaria para la secreción de insulina es del orden milimolar ($\sim 10^{-3}$ M). Sin embargo, la concentración de Ca^{2+} en el interior de la célula B es submicromolar ($\sim 10^{-7}$ M). Este gradiente de concentración se mantiene gracias a sistemas de transporte localizados en la membrana plasmática, la membrana mitocondrial, la membrana del retículo endoplasmático y probablemente en los gránulos de secreción. Un cuarto sistema para regular la concentración intracelular de calcio, de manera rápida y reversible, se basa en su unión a proteínas específicas (Fig. 5).

A nivel de membranas plasmáticas, se conocen dos mecanismos para sacar el calcio de la célula. Un intercambio $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ (JANJIC y WOLLHEIM, 1983) que utiliza la energía procedente del gradiente de sodio creado por la bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, y una ATPasa dependiente de calcio

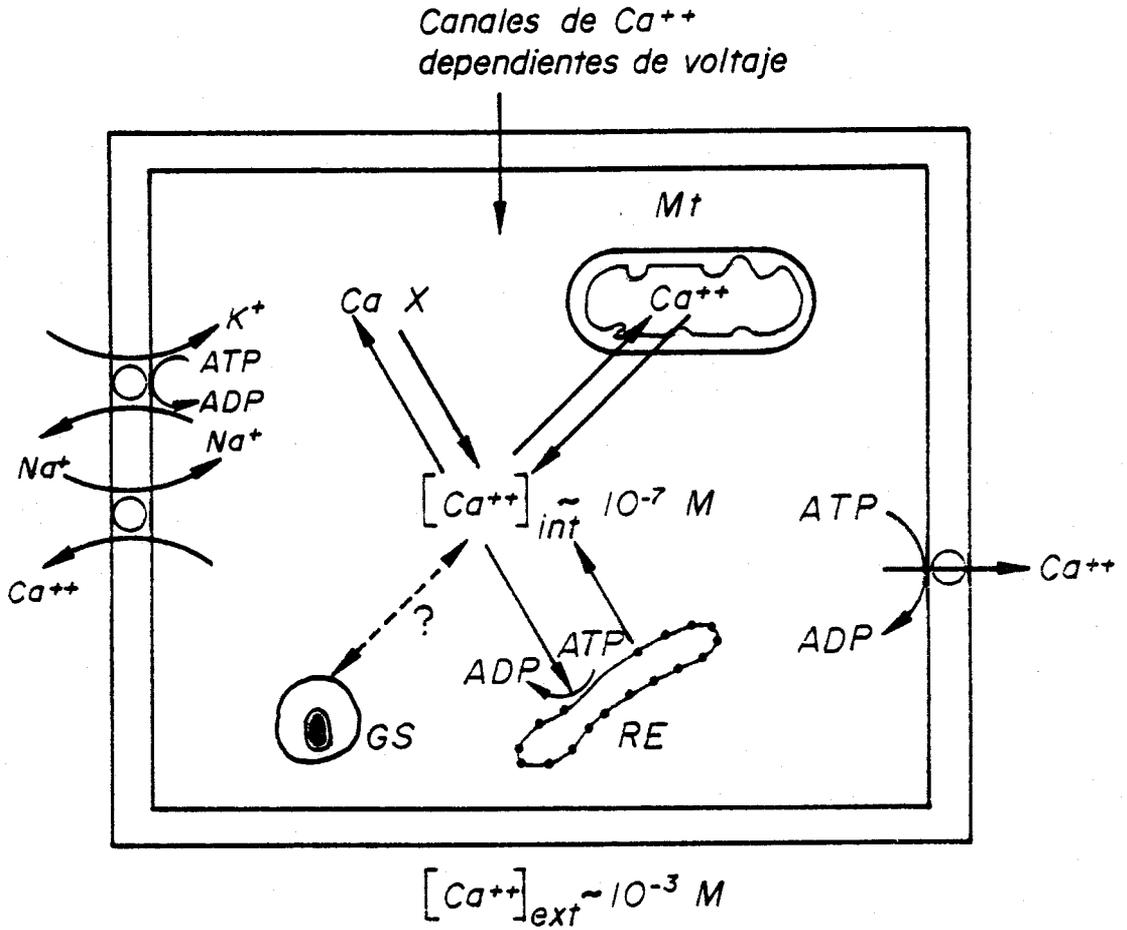


Fig. 5.- Sistemas de regulación de la concentración intracelular de calcio en la célula B (CaX: calcio unido a proteínas; Mt:mitocondria; RE:retículo endoplásmico; GS:gránulos secretorios) (PRENTKI y WOLLHEIM,1984).

(KOTAGAL et al., 1983). El intercambio Na^+ - Ca^{2+} no está acoplado directamente a la hidrólisis del ATP y la bomba de calcio sí.

Por otra parte, el calcio tiende a entrar en la célula, por difusión pasiva, a favor de un gradiente de concentración y de un gradiente eléctrico. O bien, a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (ATWATER et al., 1981).

El transporte de calcio a nivel de mitocondrias, también está acoplado a la hidrólisis del ATP. Puede ser inhibido por la 3-isobutil-1-metil-xantina y el fosfoenolpiruvato (SUGDEN y ASHCROFT, 1978). Debido a que este metabolito de la glucosa ejerce efectos tóxicos sobre las mitocondrias de hígado (ROOS et al., 1978) y de insulinoma (PRENTKI et al., 1983), su papel en el control de la captación de calcio por mitocondrias se ha cuestionado.

A nivel de retículo endoplásmico, el transporte de calcio también es un proceso dependiente de energía. Es estimulado por K^+ y tiene una K_m para el Ca^{2+} de $1.5 \mu\text{M}$, no siendo afectado por calmodulina y cAMP (COLCA et al., 1983).

Los gránulos secretorios de insulina, a diferencia de las mitocondrias y microsomas, son incapaces de acumular Ca^{2+} , por lo que se puede decir, que no participan en la regulación de la concentración citoplasmática de calcio (BOROWITZ y MATTHEWS, 1980).

6.2.2. La calmodulina como receptor intracelular del calcio

La calmodulina es una proteína unidora de calcio que KAKUCHI y YAMAZAKI (1970) y CHEUNG (1970) descubrieron independientemente como una proteína termoes- table que activaba a una fosfodiesterasa de cerebro (Fig. 6).

La calmodulina representa el principal receptor intracelular de calcio, conteniendo cuatro sitios de unión al calcio. Es una proteína filogenéticamente muy conservada de manera que, en todos los organismos de donde se ha aislado, la calmodulina presenta similares propiedades físicas, químicas y biológicas. Su estructura varía muy poco de una especie a otra, de forma que, de los 148 aminoácidos no más de siete son diferentes .

Esta proteína regula intracelularmente muchos sistemas enzimáticos dependientes de calcio (STEVENS, 1983). El sistema Ca^{2+} -calmodulina actúa al menos por tres caminos diferentes: 1) a través de la interacción directa con la enzima a regular, 2) a través de la fosforilación por quinasas dependientes de Ca^{2+} -calmodulina y 3) como una subunidad integral del enzima.

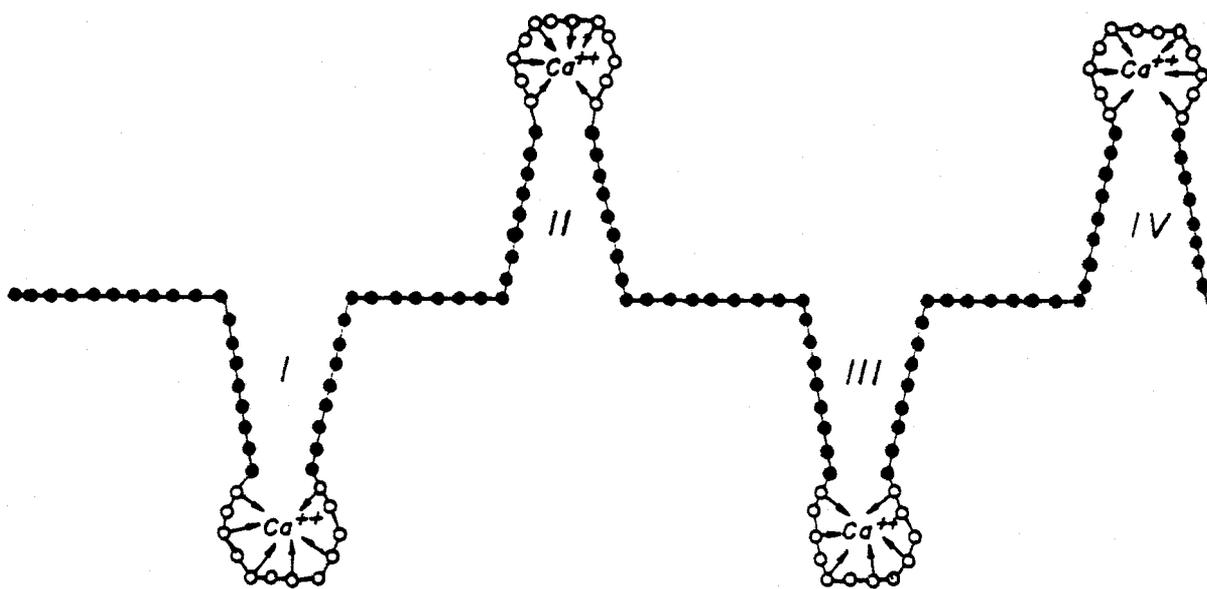


Fig. 6.- Representación esquemática de la calmodulina
(STEVENS, 1983).

En los islotes pancreáticos se ha descrito la presencia de calmodulina (SUGDEN et al., 1979a). Al mismo tiempo, se ha comprobado que inhibidores de la calmodulina en otros tejidos, como la trifluoperazina y la pimozida, inhiben la secreción de insulina en respuesta a la glucosa (GAGLIARDINO et al., 1980; HENQUIN, 1981).

El hecho de que la trifluoperazina no inhiba la metabolización de la glucosa (VALVERDE et al., 1981) indica que el posible modo de acción de la calmodulina en la secreción de insulina sea sobre el acoplamiento estímulo-secreción. Así, se ha demostrado que la calmodulina activa a: 1) la adenilato ciclasa del islote (VALVERDE et al., 1979), 2) una ATPasa dependiente de calcio, regulando el flujo de calcio a través de la membrana plasmática (PERSHADSINGH et al., 1980), 3) una proteína quinasa independiente de cAMP, fosforilándose proteínas endógenas del islote (HARRISON y ASHCROFT, 1982) y 4) afecta al sistema microtúbulos-microfilamentos favoreciendo el movimiento de los gránulos de secreción en la célula B (MARCUM et al., 1978).

El posible modo de acción de la calmodulina en la secreción de insulina es esquematizada en la fig. 7 .

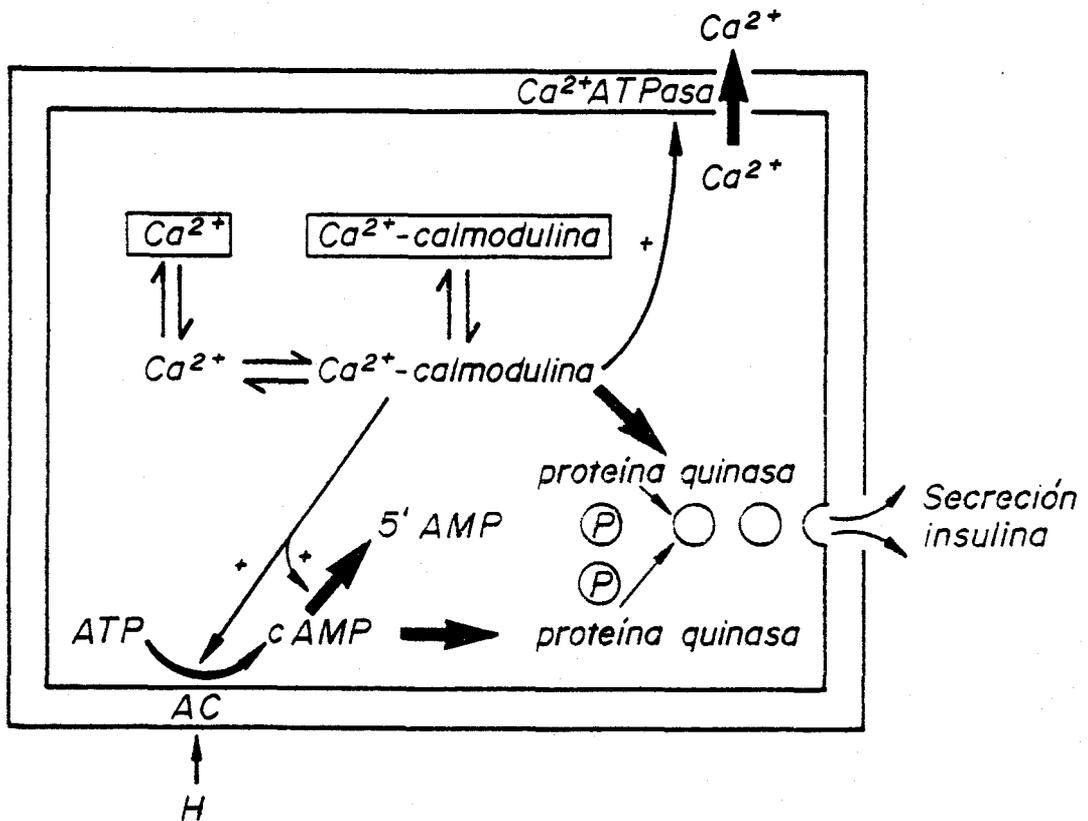


Fig. 7.- Posible modo de acción de la calmodulina en la secreción de insulina (H:hormona; AC: adenilato ciclasa; P:fosforilación de proteínas; +:estimulación) (TOMLINSON et al.,1982).

6.3. Papel del cAMP

La idea de que el cAMP pudiera actuar en la célula B pancreática como un segundo mensajero surgió con los estudios realizados por SAMOLS y col. (1965), en los cuales se observaba que el glucagón estimulaba la secreción de insulina. En 1972, CERASI y LUFT postularon que la glucosa actuaba en la célula B a través de un receptor específico de membrana, conduciendo a una activación de la adenilato ciclasa, incremento en la producción de cAMP y estimulación de la liberación de insulina. Posteriormente, se consideró el cAMP como una señal para la liberación de insulina y actualmente se cree que actúa como un modulador de la respuesta metabólica y secretoria a secretagogos (MALAISSE y MALAISSE-LAGAE, 1984).

6.3.1. Componentes del sistema cAMP en los islotes

6.3.1.1. Adenilato ciclasa

La adenilato ciclasa es un enzima que cataliza la formación de cAMP a partir de ATP. Se encuentra localizada en la membrana plasmática de las células A y B de los islotes de Langerhans (HOWELL y WHITFIELD, 1972) y su actividad es potenciada por calmodulina en presencia de calcio (VALVERDE et al., 1979). La Km para el ATP está en el rango 10-40 μ M.

Diversos autores han demostrado que la glucosa incrementa los niveles de cAMP en el islote pero no parece tener un efecto directo sobre la actividad de adenilato ciclasa (HOWELL y MONTAGUE, 1973; THAMS et al., 1984). Sin embargo, CAPITO y HEDESKOV (1977) han observado que la glucosa (17 mM), el fosfoenolpiruvato (10 μ M) y el piruvato (10 μ M) incrementan la actividad adenilato ciclasa en un 40-50%.

Por otra parte, los agentes α -adrenérgicos inhiben la liberación de insulina siendo este efecto causado por una inhibición de la adenilato ciclasa (NAKAKY et al., 1981). Como en otros tejidos, la adenilato ciclasa es regulada por nucleótidos y nucleósidos (HOWELL y MONTAGUE, 1973).

6.3.1.2. Fosfodiesterasa

Existen al menos dos formas del enzima con diferentes K_m para el cAMP. CAPITO y HEDESKOV (1974) han encontrado en islotes de ratón dos K_m para este enzima (6 μ M y 260 μ M). La mayor actividad de este enzima (70%) se encuentra en la fracción soluble, siendo su pH óptimo 8'2.

La fosfodiesterasa es inhibida por teofilina, cafeína, 3-isobutilmetilxantina y sulfonilurea, y activada por imidazol (ASHCROFT et al., 1972b).

6.3.1.3. Proteína quinasa

La activación de la proteína quinasa dependiente de cAMP implica la disociación del holoenzima inactivo en su subunidad reguladora R y catalítica C (ROSEN y ERLINCHMAN, 1975), según la ecuación:



La mayoría de la actividad se encuentra en la fracción soluble. La Km para el cAMP es de 1.11×10^{-8} M.

En los islotes de Langerhans existen tres clases de proteínas quinasas. Una dependiente de cAMP (MULLER y SHARP, 1974; SUGDEN et al., 1979b), otra activada por Ca^{2+} y calmodulina (CHRISTIE y ASHCROFT, 1985) y una tercera activada por Ca^{2+} y fosfolípidos (LORD y ASHCROFT, 1984). Cada una tiene sustratos endógenos específicos que son fosforilados en el interior del islote en respuesta a un estímulo.

6.3.1.4. Fosfoproteína fosfatasa

La actividad fosfoproteína fosfatasa ha sido estudiada en los islotes, encontrándose una alta actividad de este enzima en la fracción soluble y en la particulada (MULLER y SHARP, 1974). Su actividad es estimulada por cAMP y Ca^{2+} .

6.3.2. Acción de secretagogos sobre la producción de cAMP

El efecto de la glucosa sobre la acumulación de cAMP ha sido ampliamente estudiado por numerosos autores; a pesar de ello, los resultados obtenidos son contradictorios. Así, HOWELL y MONTAGUE (1973) no encontraron modificaciones significativas en el contenido de cAMP al incubar islotes aislados de rata a concentraciones de glucosa que estimulan la secreción de insulina. Por el contrario, BOUMAN y col. (1979) observaron un rápido aumento del contenido de cAMP (2-3 min), alcanzándose un nivel máximo a los 15 min que permanecía hasta los 30 min. La secreción de insulina aumenta después del rápido aumento de cAMP y el patrón bifásico de secreción coincide con cambios paralelos en los niveles intracelulares de cAMP (ZAWALICH et al., 1975).

Existe un gran paralelismo entre la capacidad de un azúcar para ser metabolizado por los islotes y el poder que posee para incrementar los niveles de cAMP. De esta forma, la glucosa (CAPITO y HEDESKOV, 1974), el D-gliceraldehido y la dihidroxiacetona (HELLMAN et al., 1974b), y la manosa (GRILL y CERASI, 1976) elevan los niveles de cAMP; mientras que azúcares no metabolizables, como L-glucosa y 3-O-metilglucosa, no lo hacen (GRILL y CERASI, 1976). Por otra parte, el hecho de que la mannoheptulosa, conocido inhibidor de la fosforilación de la glucosa, inhiba la elevación del contenido cAMP in-

ducida por glucosa (GRILL y CERASI, 1976) y de que el piruvato y fosfoenolpiruvato estimulen la adenilato ciclasa (CAPITO y HEDESKOV, 1977) indica que la acumulación de cAMP en los islotes es debida al metabolismo de la glucosa y no a la glucosa en sí.

La D-manosa, que es capaz de estimular la secreción de insulina en ausencia de glucosa, también es capaz de estimular los niveles de cAMP, pero presenta una concentración umbral más elevada. La D-galactosa y la D-fructosa que no estimulan la secreción de insulina "per se", pero potencian la acción secretagoga de la D-glucosa, sólo elevan el contenido insular de cAMP en presencia de glucosa.

GRILL y CERASI (1975) han demostrado que los niveles de cAMP intraislote se incrementan preferentemente por el α -anómero de la glucosa, que es el mejor estimulador de la secreción de insulina.

El ayuno prolongado bloquea la secreción de insulina y la estimulación de cAMP inducida por glucosa en islotes aislados de rata (ORTIZ, 1980).

Por último, es bien conocido el hecho de que la teofilina y la isobutilmetilxantina, conocidos inhibidores de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, estimulan la secreción de insulina en presencia de glucosa. Esto sugiere que el efecto de las metilxanti-

nas sobre la liberación de insulina está relacionado con un aumento en el contenido de cAMP en el islote, secundario a una inhibición de la fosfodiesterasa.

En resumen, estos hechos parecen indicar que el cAMP juega un papel importante en el mecanismo de secreción de insulina, aunque una elevación en el contenido de cAMP es una condición necesaria, pero no suficiente, para estimular la secreción de insulina, ya que las metilxantinas necesitan una concentración umbral de glucosa para estimular la secreción de insulina.

6.3.3. Modo de acción del cAMP en la secreción de insulina

6.3.3.1. Estimulación de proteínas quinasas

En casi todos los tejidos de mamíferos la acción del cAMP está relacionada con la activación de enzimas denominadas proteínas quinasas dependientes de cAMP. Los islotes pancreáticos poseen proteínas quinasas dependientes de cAMP con propiedades similares a las del resto de los tejidos estudiados (SUGDEN et al., 1979b).

Compuestos que aumentan el contenido de cAMP y estimulan la secreción de insulina, incrementan también la actividad de las proteínas quinasas en homogenados de islote, mientras que el diazóxido o la adrenalina, que disminuyen el contenido de cAMP e inhiben la secre-

ción de insulina, descienden la actividad de las proteínas quinasas (MONTAGUE y HOWELL, 1973).

Una vez activada la proteína quinasa, actuaría fosforilando alguno de los componentes del sistema secretorio (proteína microtubular, proteínas específicas de los gránulos secretorios y membrana plasmática) y disparando la respuesta insulínica.

6.3.3.2. Efecto sobre el metabolismo de la glucosa

Ha sido demostrado que el glucagón y la teofilina que elevan el contenido de cAMP, estimulan la glucogenólisis en islotes de ratones obesos hiperglucémicos (IDAHL y HELLMAN, 1971). Sin embargo, a concentraciones altas de glucosa, ni la teofilina ni el db-cAMP tienen efecto sobre la captación, utilización y oxidación de la glucosa (MALAISSE et al., 1974b).

6.3.3.3. Sistema microtúbulos y microfilamentos

LACY et al. (1968) demostraron que la colchicina, inhibidor de la función microtubular, inhibía también la secreción de insulina. El sistema microtubular actuaría transportando los gránulos que contienen insulina desde el aparato de Golgi hasta la membrana plasmática. Se ha descrito que una proteína del sistema microtubular (tubulina) es activada por proteínas quinasas dependientes de cAMP (RASMUSSEN, 1970).

6.3.3.4. Acción del cAMP sobre el flujo del Ca^{2+}

En ausencia de Ca^{2+} extracelular no hay respuesta secretoria a la glucosa. Esta respuesta se restablece en parte en presencia de db-cAMP o teofilina. Parece ser que el cAMP promueve la movilización de calcio desde los orgánulos intracelulares almacén hasta el "pool" citoplasmático (SIEGEL et al., 1980). Este Ca^{2+} ionizado citoplasmático sería el que activaría el proceso secretorio en la célula B.

Sin embargo, HENQUIN y MEISSNER (1983) han mostrado recientemente que el db-cAMP incrementa la entrada de Ca^{2+} y la actividad eléctrica en la célula B, por lo que el cAMP puede modular la permeabilidad de los canales de calcio facilitando la entrada de calcio en la célula B.

6.4. Metabolismo de los fosfolípidos en el acoplamiento estímulo-secreción

Se ha demostrado que en gran cantidad de tejidos la activación de los receptores de membrana conlleva a un aumento en la hidrólisis de los fosfatidilinositoles (MICHELL, 1975; BERRIDGE, 1984).

En los islotes pancreáticos la carbamilcolina (BEST y MALAISSE, 1983a), mediante su unión a un receptor muscarínico y la glucosa (BEST y MALAISSE, 1983b), por un mecanismo todavía desconocido, activan a una fosfolipasa C

(PLC) que hidroliza al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIn 4,5 Pi) dando inositol 1,4,5-trifosfato (InP₃) y diacilglicerol (DG). El InP₃ actúa liberando calcio del retículo endoplásmico (STREB et al., 1983; BIDEN et al., 1984) y el DG activa a una proteína quinasa dependiente de Ca y fosfolípidos (proteína quinasa C) (TAKAI et al., 1979; HUBINONT et al., 1984).

El DG es sustrato de la DGlipasa que produce ácido monoglicérico (MG) y ácido araquidónico (AA) (SCHREY y MONTAGUE, 1983). Este último compuesto también se obtiene por la acción de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) sobre el fosfatidilinositol (PIn) o el ácido fosfatídico (PA₁) (LAYCHOCK, 1982) y sirve como sustrato para la síntesis de prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) y leucotrienos (LT), que modulan la liberación de insulina (EVANS et al., 1983; METZ et al., 1984).

El InP₃ es rápidamente defosforilado a inositol bifosfato (InP₂), a inositol monofosfato (InP) y a inositol (In) que se recombina con el PA₁ para formar fosfatidilinositol (PIn). El PIn se fosforila mediante quinasas específicas localizadas en la membrana celular a fosfatidilinositol 4-fosfato (PIn4Pi) y a fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIn 4,5 Pi).

Este conjunto de reacciones (hidrólisis+síntesis) constituye el ciclo de los fosfoinositidos (Fig. 8).

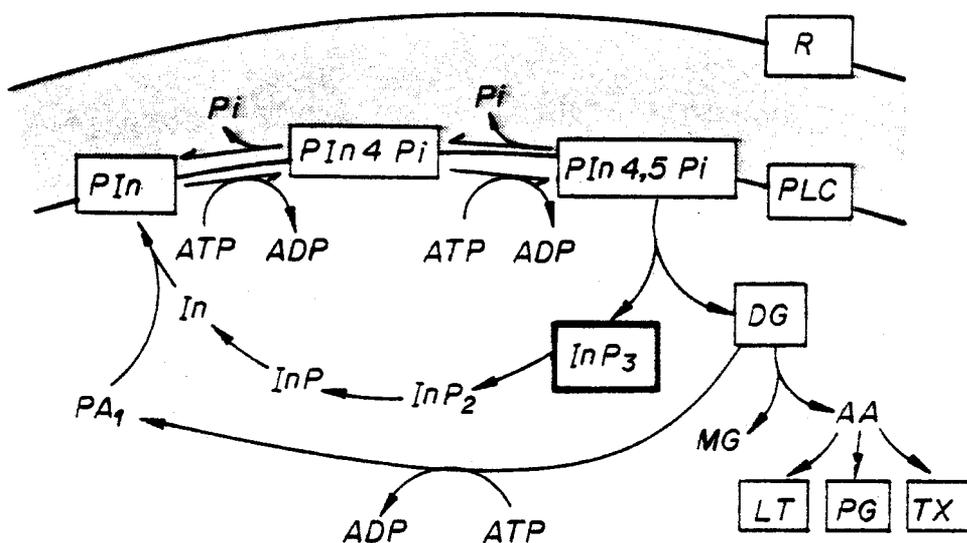


Fig. 8.- Representación esquemática del recambio de fosfolípidos de membranas (R:receptor; PLC: fosfolipasa C; PI(4,5)P₂:fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; PI(4)P:fosfatidilinositol 4-fosfato; PI:fosfatidilinositol; DAG:diacilglicerol; IP₃:inositol 1,4,5-trifosfato; IP₂:inositol bisfosfato; IP₁:inositol monofosfato; In:inositol; PA₁:ácido fosfatídico; MG:ácido monoglicérico; AA:ácido araquidónico; LT:leucotrienos; PG:prostaglandinas; TX:tromboxanos).

El ácido fosfatídico actúa como un ionoforo endógeno. La actividad ionoforética es incrementada cuando los islotes se estimulan con glucosa (DUNLOP y LARKINS, 1984).

Hasta el momento se desconoce si los productos de la hidrólisis del $\text{PIn}_{4,5}\text{Pi}$, DG y InP_3 , actúan concertadamente en la estimulación de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa.

ZAWALICH y col. (1983) han propuesto que la dinámica bifásica de la secreción de insulina se debe a la actuación secuencial de las dos ramas del sistema mensajero del calcio. La iniciación de la respuesta se debería a un aumento de la concentración citoplasmática de calcio producida por la liberación de calcio de los depósitos intracelulares (retículo endoplásmico), debida a la acción del InP_3 . Este aumento de la concentración citoplasmática de calcio activaría la llamada "rama de la calmodulina" (RASMUSSEN y BARRETT, 1984), produciéndose la activación de proteínas quinasas dependientes de calcio y calmodulina (CHRISTIE y ASHCROFT, 1985).

El mantenimiento de la secreción estimulada dependería de la activación de la "rama de la proteína quinasa C" por el DG.

7. EL AYUNO COMO MODELO EXPERIMENTAL

El hecho de que el ayuno inhiba la secreción de insulina (JOOST y BECKMAN, 1980) y de que linearice la cinética sigmoidea de la respuesta insulínica a la glucosa (ARILLA, 1979) hace que sea un interesante modelo experimental.

Por otra parte, los islotes procedentes de animales ayunados se caracterizan por un metabolismo de la glucosa descendido con disminución en la actividad fosforilante de la glucosa (HEDESKOV y CAPITO, 1974; MALAISSE et al., 1976; BEDOYA et al., 1984b) y un descenso asimismo, en el contenido intracelular de cAMP (ORTIZ, 1980).

Puesto que otros enzimas de la vía glucolítica como fosfofructoquinasa, fosfoglucoisomerasa y gliceraldehido 3P-deshidrogenasa están menos afectadas por el ayuno (MALAISSE et al., 1976 ; BURCH et al., 1981), lo más probable es que el ayuno provoque un bloqueo en las etapas previas de la glucolisis y concretamente en las actividades fosforilantes de la glucosa, lo que produciría un bloqueo del flujo glucolítico.

El hecho de que inhibidores de la fosfodiesterasa o el db-cAMP desbloqueen la secreción de insulina en el ayuno, con la aparición del sigmoide característico (GOBERNA et al., 1978), sugiere que esta situación meta-

bólica afecta al sistema cAMP. En apoyo de esto, HOWELL y col.(1973), demostraron que la actividad adenilato ciclasa y la proteína quinasa dependiente de cAMP están disminuidas en el ayuno.

Por tanto, el ayuno produce efectos sobre el sistema adenilato ciclasa-cAMP, además del efecto conocido sobre el glucosensor.

8. OBJETIVOS

En el momento actual se desconoce el origen de la diabetes no insulín dependiente (NIDDM), pero conocemos una serie de factores exógenos que pueden desencadenarla, siendo la alimentación y el sobrepeso uno de los más importantes. Ello es debido a un fallo en la capacidad adaptativa de la célula B a cambios ambientales fundamentalmente alimentarios.

El objetivo fundamental de este trabajo es estudiar la influencia de dietas de composición variable en carbohidratos, lípidos y proteínas sobre la funcionalidad de la célula B del páncreas endocrino.

Hemos utilizado ratas Wistar alimentadas durante largo tiempo con tres tipos de dietas: dieta estándar, dieta pobre en glúcidos (rica en proteínas y grasas) y dieta rica en carbohidratos ("dieta glucosa"). Para alcanzar dicho objetivo, se realizaron diversos estudios a diferentes niveles:

- a) Animal "in vivo": se estudió el efecto de diferentes dietas sobre parámetros metabólicos: glucemias, curvas de asimilación de la glucosa por vía intravenosa, insulinemias, etc.
- b) Páncreas aislado. Estudio de la dinámica secretoria del páncreas aislado y perfundido en respuesta a la glucosa de animales alimentados con diferentes dietas; también se analizó el contenido de insulina.

c) Islotes aislados: se estudió la actividad fosforilante de la glucosa en homogenado de islotes procedentes de animales sometidos a diferentes tipos de dieta.

II. MATERIAL Y METODOS

1. ANIMALES

Para la realización del presente trabajo se utilizaron ratas Wistar macho de peso comprendido entre 200-250 g, correspondiente a 9 semanas de edad. Los animales se dividieron en cuatro grupos:

- 1) Ratas controles alimentadas hasta el momento de su sacrificio con una dieta estándar, laboratorio.
- 2) Ratas sometidas a ayuno total durante 96 h.
- 3) Ratas alimentadas 10 días antes de su sacrificio con una dieta rica en carbohidratos.
- 4) Ratas alimentadas 10 días antes de su sacrificio con una dieta pobre en carbohidratos.

Todos los animales tenían libre acceso al agua.

La composición de las distintas dietas se detalla en la tabla II.

En la fig. 9, se representan los pesos medios de ratas desde el nacimiento hasta los 90 días de edad.

TABLA IICOMPOSICIÓN DE LAS DIETAS (g/100 g)

	<u>Dieta estándar</u>	<u>Dieta glucosa</u>	<u>Dieta pobre en carbohidratos</u>
Proteínas	19	-	43'4
Fibras	26	-	-
Carbohidratos	42	-	3'2
Grasas	8'5	-	48'9
Sales minerales	2'9	2'9	2'9
Vitaminas	1'6	1'6	1'6
Glucosa	-	95'5	-
	% de calorías totales		
Proteínas	23'7	-	27'7
Grasas	52'4	-	70'2
Carbohidratos	23'8	100	2'0

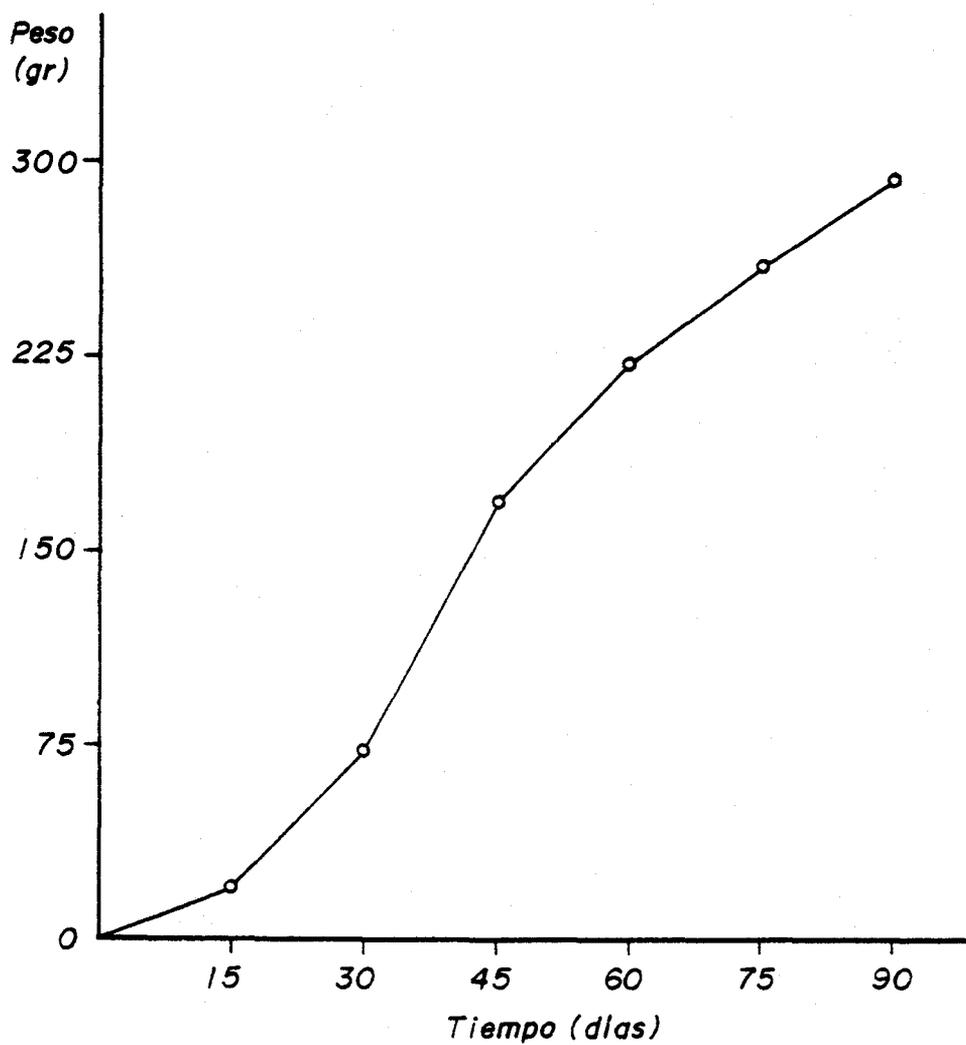


Fig.9.- Curva de crecimiento ponderal de ratas Wistar macho.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

GRUPO I: Animales controles, alimentados con dieta estándar

- I₁: Determinación de diferentes parámetros bioquímicos en plasma.
- I₂: Glucemia e insulinemia en condiciones basales, y tras una sobrecarga de glucosa.
- I₃: Determinación de glucógeno hepático.
- I₄: Contenido de insulina del páncreas y de los islotes.
- I₅: Actividad fosforilante de la glucosa ensayada a 0'5 y 25 mM glucosa.
- I₆: Secreción de insulina inducida por glucosa 2'75 y 16'7 mM en islotes pancreáticos.
- I₇: Secreción de insulina en respuesta a la glucosa en páncreas perfundido.

GRUPO II: Animales alimentados con dieta estándar. Acción del 2-Bromoestearato

- II₁: Secreción de insulina inducida por glucosa 2'75 y 16'7 mM en presencia de 2-Bromoestearato 0'25 mM en páncreas perfundido.

II₂: Cinética de secreción de insulina en respuesta a la glucosa en presencia de 2-Bromoestearato 0'25 mM en páncreas perfundido.

GRUPO III: Animales ayunados durante 96 h

III₁: Secreción de insulina en respuesta a la glucosa 2'75 y 16'7 mM en páncreas perfundido.

III₂: Cinética de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa en páncreas perfundido.

GRUPO IV: Animales ayunados durante 96 h. Efecto del 2-Bromoestearato

IV₁: Secreción de insulina en respuesta a glucosa 2'75 y 16'7 mM en presencia de 2-Bromoestearato 0'25 mM en páncreas perfundido.

IV₂: Cinética de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa en presencia de 2-Bromoestearato 0'25 mM en páncreas perfundido.

GRUPO V: Animales alimentados con una dieta rica en carbohidratos

V₁: Determinación de diferentes parámetros bioquímicos en plasma.

V₂: Glucemia e insulinemia en condiciones basales y tras una sobrecarga de glucosa.

V₃: Determinación de glucógeno hepático.

V₄: Contenido de insulina del páncreas de los islotes.

V₅: Actividades fosforilantes de la glucosa ensayadas a glucosa 0'5 y 25 mM.

V₆: Secreción de insulina en respuesta a la glucosa en islotes.

V₇: Secreción de insulina inducida por glucosa en páncreas perfundido.

GRUPO VI: Animales alimentados con una dieta pobre en hidratos de carbono

VI₁: Determinación de diferentes parámetros bioquímicos en plasma.

VI₂: Glucemia e insulinemia en condiciones basales y tras una sobrecarga de glucosa.

VI₃: Determinación de glucógeno hepático.

VI₄: Contenido de insulina del páncreas y de los islotes.

VI₅: Actividad fosforilante de la glucosa ensayada a glucosa 0'5 y 25 mM.

VI₆: Secreción de insulina en respuesta a la glucosa en islotes.

VI₇: Secreción de insulina inducida por la glucosa en páncreas perfundido.

3. DETERMINACION DE DIVERSOS PARAMETROS BIOQUIMICOS EN PLASMA

3.1. Lípidos

Triglicéridos

La determinación de los triglicéridos en plasma se realizó mediante la hidrólisis enzimática de éstos y de terminación enzimática subsiguiente del glicerol formado por el método de la gliceroquinasa (reacción colorimétrica). La absorbancia de la reacción se mide a 500 nm.

Colesterol

La mayoría de los métodos utilizados para determinar la concentración de colesterol en suero son colorimétricos y están basados en la clásica reacción de LIEBERMANN (1885).

Recientemente, se ha utilizado un método enzimático (método de CHOD PAD), en el que una esterase hidroliza los esteres de colesterol en suero a colesterol libre. Este compuesto, es oxidado produciéndose H_2O_2 que es utilizado para formar un compuesto coloreado. La absorción de la reacción se mide a 500 nm.

HDL-colesterol

El método utilizado para la determinación de las HDL-colesterol se basa en la adición de ácido fosfotung-

tico e iones de magnesio a la muestra, provocando la precipitación de las VLDL y LDL. El sobrenadante de la centrifugación contiene las HDL, cuya concentración de colesterol es determinada enzimáticamente mediante el método del CHOD-PAD.

Las LDL-colesterol se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$\text{LDL-colesterol} = \text{colesterol total} - \frac{\text{triglicéridos}}{5} - \text{HDL-colesterol}$$

Las siguientes determinaciones se realizaron en un autoanalizador Technicon Smac-20, según las técnicas que se describen brevemente a continuación.

3.2. Proteínas totales

El método utilizado para la determinación de proteínas se basa en el trabajo de SKEGGS y HOCHSTRASSER (1964), quienes automatizaron la técnica manual de WEICHSELBAUM (1946). En ésta, se añade a la muestra el reactivo de Biuret combinándose las proteínas de la muestra con el cobre del Biuret dando lugar a un complejo púrpura. El reactivo también contiene tartrato sódico-potásico, que actúa como agente complejante, y yoduro potásico que previene la autorreducción. La absorbancia de la reacción se mide a 550 nm.

3.3. Albúmina

La determinación de los niveles plasmáticos de albúmina está basada en el trabajo de DOUMAS y col. (1971) quienes automatizaron el método manual original de RODKEY (1965). Este introdujo verde de bromocresol como colorante específico para la albúmina. A pH 7'0, el verde de bromocresol se combina con la albúmina y forma un complejo estable. Es una técnica colorimétrica que determina la concentración de albúmina en función de la disminución de la absorbancia por disminución del verde de bromocresol libre.

3.4. Nitrógeno ureico (BUN)

Los métodos utilizados para la determinación del BUN pueden clasificarse en dos tipos: métodos basados en la reacción con diacetilmonosina o compuestos similares y las técnicas que emplean ureasa. En 1965, MARSH y col. presentaron dos métodos, uno manual y otro automatizado, para la determinación directa de urea basados en la diacetilmonosina. Ambos métodos resultan altamente sensibles debido al uso combinado de tiosemicarbazida e iones férricos. La técnica utilizada por el autoanalizador es una modificación de la descrita por MARSH y col.

3.5. Acido úrico

El primer método cuantitativo para la determinación de ácido úrico en suero fue descrito por FOLIN y DENIS (1912). El principal inconveniente que tenía este método, era la turbidez final que ocasionaba haciendo dificultosa la medición del color.

La técnica utilizada en el autoanalizador es la de la uricasa, está basada en los trabajos de LEON y col. (1978). En ésta, la enzima uricasa cataliza la oxidación del ácido úrico dando H_2O_2 ; este producto formado es medido por acoplamiento oxidativo de dos compuestos en presencia de peroxidasa, formándose un complejo coloreado. La absorción de la reacción es medida a 570 nm.

3.6. Creatinina

La técnica para la determinación de creatinina está basada en la reacción del ácido pícrico con la creatinina en medio alcalino, descrita en el método original de JAFFE (1886). Este método ha sido automatizado por CHASSON y col. (1960).

3.7. Iones

Sodio

La técnica utilizada para la determinación cuantitativa del sodio en plasma es un procedimiento directo po-

tenciométrico, usando electrodos de vidrio selectivos para el ión sodio. Este método está basado en el trabajo original de RAO y col. (1973), modificado por VANKO y MEOLA (1973). El electrodo selectivo para los iones sodio responde a dichos iones de acuerdo con la ecuación de Nernst.

Potasio

El método utilizado para la determinación del potasio es igual al descrito para el sodio, utilizando electrodos selectivos para el ión potasio. Está basado en el trabajo original de RAO y col. (1973). También responde al sodio de acuerdo con la ecuación de Nernst.

Cloro

El método utilizado por el autoanalizador para la determinación cuantitativa de iones cloruros en plasma es un procedimiento colorimétrico. Este método está basado en el método manual de ZALL y col. (1956) automatizado posteriormente por MORGENSTERN y col. (1973).

Calcio

El método para la determinación del calcio está basado en los trabajos de GITELMAN (1967), quien modificó el procedimiento automatizado de KESSLER y WOLFMAN (1964) incorporando la 8-hidroxiquiloneina para eliminar las virtuales interferencias del magnesio. La técnica del

calcio utiliza un complejo coloreado llamado "cresofta-leína-complexona" que tiene la propiedad de unir los iones calcio en un medio alcalino. El producto de esta interacción es un complejo de calcio coloreado en rosa con una absorbancia máxima a 570 nm.

Fósforo inorgánico

El método para la determinación del fósforo inorgánico está basado en la técnica primitiva de DALY y ERTINGSHAUSEN (1972), modificada para el autoanalizador por AMADOR y URBAN (1972). El procedimiento original estaba basado en la reducción de un complejo de fosfomolibdato. El uso de agentes reductores como el cloruro de estaño y el ácido aminonaftosulfónico para este propósito es bien conocido. La técnica de AMADOR y URBAN está basada en que el complejo de fosfomolibdato no reducido absorbe la luz ultravioleta.

4. TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA

4.1. Sobrecarga intravenosa de glucosa

Las muestras de sangre heparinizada se extrajeron de la vena yugular. Primero, se tomó una muestra de sangre como referencia o basal y a continuación, se inyectó una sobrecarga de glucosa al 33% lentamente. La dosis empleada fue de 0'5 g/Kg peso del animal.

Se extrajo sangre a los siguientes tiempos: 5, 15, 30 y 60 min después del final de la sobrecarga. Después de cada toma de sangre se inyectó aproximadamente un ml de suero fisiológico con el fin de mantener constante el volumen sanguíneo.

Todas las muestras obtenidas se centrifugaron a 4°C inmediatamente. Los plasmas se separaron y dividieron en dos clases de tubos según su posterior empleo: uno para la determinación de glucosa y otro para la de insulina.

Las muestras destinadas a la valoración de insulina se congelaron a -20°C hasta el momento de su análisis. La determinación de insulina se realizó mediante la técnica de radioinmunoanálisis descrita en el apartado 12 de Material y Métodos.

4.2. Determinación de la glucosa

La determinación de la concentración de glucosa en plasma se realizó mediante el método enzimático de la glucosa oxidasa (KESTON, 1956).

El fundamento de esta técnica consiste en que la glucosa en presencia de la glucosa oxidasa es convertida a ácido glucónico con la producción de peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno oxida a la ortodianisidina en presencia de peroxidasa dando un complejo de color verde, midiendo su intensidad por espectrofotometría a 420 nm.

4.3. Coefficiente de asimilación de la glucosa

El comportamiento del descenso glucémico tras una sobrecarga intravenosa de glucosa es de tipo exponencial. El coeficiente angular o pendiente de la recta semilogarítmica fue definido por CONARD (1953) como "coeficiente de asimilación de la glucosa".

Por tanto, el valor del coeficiente de asimilación de la glucosa (K) se puede calcular representando gráficamente el logaritmo decimal de los valores de la concentración de glucosa frente al tiempo.

5. AISLAMIENTO Y CUANTIFICACION DE GLUCOGENO HEPATICO DE RATA

5.1. Aislamiento de glucógeno hepático

El glucógeno se puede aislar de los tejidos animales por digestión de éstos con una solución concentrada de KOH, en la cual el glucógeno es estable (GOOD et al., 1933). Se separa después de proteínas y otros metabolitos solubles por su propiedad de precipitar con alcohol etílico .

El aislamiento del glucógeno implica las siguientes etapas:

a) Digestión del tejido

Se partió de 0'3 g de hígado. El tejido se digirió en una solución de KOH al 30% caliente durante 30 min. El extracto resultante se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 10 min, en una centrífuga de mesa refrigerada. El sobrenadante se recogió con cuidado.

Previo a la adición de alcohol, se añadió 100 μ l de SO_4Na_2 15%, con el fin de facilitar la formación y precipitación del glucógeno sólido.

b) Precipitación alcohólica

Se añadió 2 volúmenes de alcohol etílico por cada volumen de sobrenadante, para obtener una concentración

final de etanol del 66%, óptima para la precipitación del glucógeno.

Después de mezclar bien ambos componentes, se guardó a una temperatura de 4°C durante 3-24 h. Habitualmente, se deja precipitar durante la noche. El glucógeno precipita en forma de partículas blancas. Se separó por centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 10 min el glucógeno (precipitado) y se desechó el sobrenadante.

c) Lavado del glucógeno

Junto con el glucógeno, precipitaron también otras sustancias. Para purificar parcialmente el glucógeno, se disuelve el precipitado en 1 ml de H₂O destilada fría, y se repite de nuevo la precipitación alcohólica. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores. El precipitado se disolvió en 1 ml de H₂O fría.

5.2. Determinación del glucógeno

5.2.1. Hidrólisis con amiloglucosidasa

Consiste en transformar el glucógeno en D-glucosa, incubándolo a pH 5, en presencia de amilo (α -1,4- α -1,6) glucosidasa durante 1 h a 37°C.

A 500 μ l de la disolución final de glucógeno (glucógeno + 1 ml de H₂O destilada) se le añadió 100 μ l de

amiloglucosidasa (5 mg/ml de tampón acetato 1 M, pH 5).
Se incubó durante 1 h a una temperatura de 37°C.

5.2.2. Análisis del glucógeno como glucosa

Al cabo de este tiempo de incubación se tomaron 25 μ l y 100 μ l de la disolución, diluyéndolos en un volumen final de 500 μ l de H₂O destilada y se determinó la glucosa. Para el análisis del glucógeno como glucosa, se utilizó el método de la glucosa oxidasa.

6. TECNICA DE LA PERFUSION DEL PANCREAS AISLADO

6.1. Descripción de la técnica operatoria

Se han descrito dos métodos fundamentales de perfusión. Uno que incluye páncreas, estómago y duodeno (GRODSKY et al., 1963) y el otro modelo, descrito por SUSSMAN et al., (1966), que incluye páncreas y duodeno.

Nuestros trabajos se han llevado a cabo con el modelo de SUSSMAN (1966) modificado por GOBERNA (1968) y por nosotros en la actualidad.

El páncreas se perfunde a través de los vasos propios introduciendo una cánula en la aorta abdominal por la que se hace pasar el medio de perfusión oxigenado. El efluído que sale por la vena porta se recoge fraccionadamente mediante un colector de fracciones.

Los animales se anestesiaron con pentotal sódico inyectado intraperitonealmente a una dosis de 4mg/100g de peso. Una vez anestesiada la rata, se practicó una laparotomía media seguida de dos incisiones laterales para conseguir un campo operatorio amplio. A continuación, se desplazó hacia la derecha del animal las asas intestinales y hacia abajo la grasa epididimaria, apareciendo el colon descendente cuya porción distal está unida a la pared abdominal posterior por una película de mesenterio. Se hizo una ligadura doble en dicha porción del colon y posteriormente, se disecó el borde derecho del colon descendente cortando el epiplon y despegándolo de las asas a que está unido hasta hacerse

visible la arteria mesentérica superior. A continuación, se hizo lo mismo en el borde izquierdo del colon descendente y en el borde superior del transverso, quedando totalmente disecada la arteria mesentérica superior y apreciándose asimismo la arteria cólica superior que irriga el colon descendente, la cual se seccionó posteriormente entre dos ligaduras.

Desplazando las asas hacia la izquierda, se localizó el duodeno en cuya porción distal, en el primer ojal que queda entre los vasos arqueados, se hizo una ligadura doble; seccionando a continuación el duodeno-yeyuno. En ese momento, la arteria mesentérica superior se ligó lo más distalmente posible y a continuación se cortó por debajo de la ligadura. Cortando el colon distal por encima de la ligadura que se hizo anteriormente, se pueden retirar todas las asas intestinales y el colon del campo operatorio (Fig. 10).

El siguiente objetivo fue liberar el páncreas del bazo. Tirando con unas pinzas de la curvatura mayor del estómago se puede cortar fácilmente una fina película de epiplon que recubre el páncreas y se extiende entre el bazo, estómago y duodeno. Tirando del borde externo del bazo se pueden ver los vasos esplénicos en número variable, siendo tres los más importantes. Se hicieron tres ligaduras dobles, se cortaron y se retiró el bazo de la cavidad abdominal.

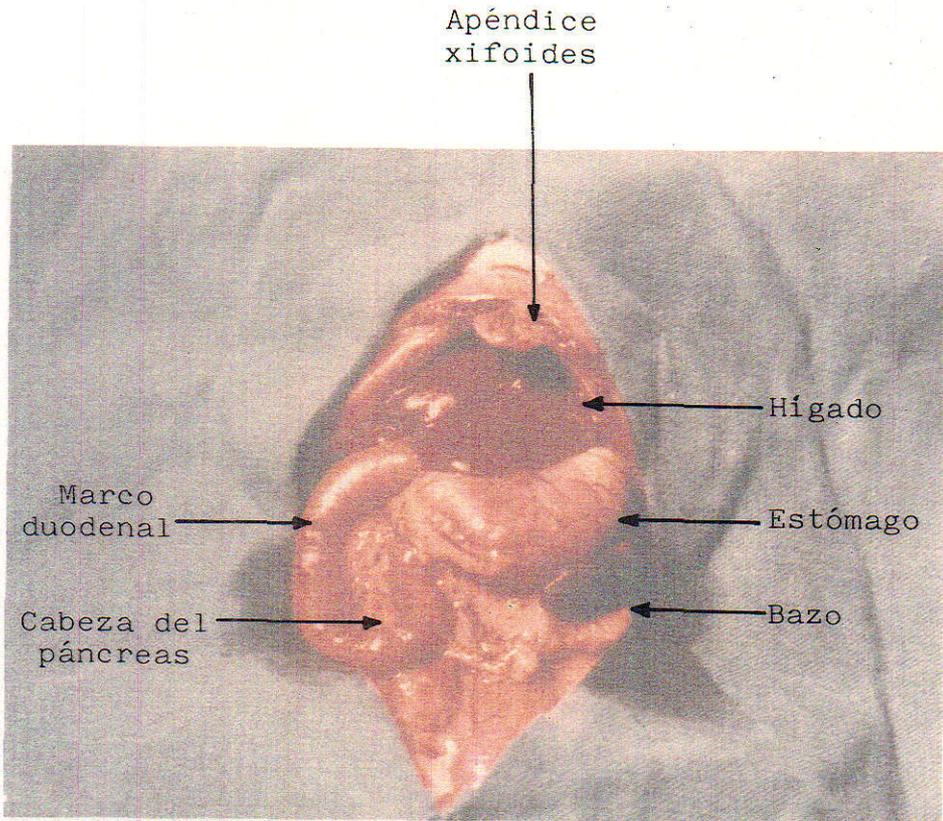


Fig. 10.- Exposición del marco duodenal tras la retirada del paquete intestinal.

La arteria gástrica, situada en la cara posterior del estómago, está cubierta por una lengüeta hepática que permanece unida al estómago por un fino ligamento que hay que seccionar. Se hicieron dos ligaduras en dicha arteria cortándola seguidamente. La ligadura del esófago es facilitada al seccionar el epiplon que le une a las lengüetas hepáticas y a la curvatura menor del estómago. Tras esto, se seccionó el esófago distalmente a dicha ligadura.

Por transparencia, se aprecia una zona rica en grasa, que se extiende unida a la parte proximal del cuerpo pancreático y una zona que le mantiene unida al antro pilórico, diferenciándose del tejido pancreático por el color rosado que presenta este último. Se debe separar toda esta grasa del páncreas, para lo cual son suficientes tres o cuatro ligaduras, la última de las cuales, se hace a través de un pequeño ojal que hay entre antro y duodeno. Tras hacer estas ligaduras, se cortó distalmente a ellas, quedando el páncreas libre de grasa, que permanece unida al estómago. A continuación, se hizo una ligadura entre estómago y duodeno, seccionando proximalmente a ella y retirando así el estómago de la cavidad abdominal.

Desplazando el duodeno hacia la izquierda, se aprecia la cara posterior de la cabeza del páncreas por donde discurre el colédoco, el cual se encuentra íntimamente

relacionado con la vena porta y con la arteria hepática que se dirige hacia el hilio hepático. Con una pinza muy fina se disecó la porta separándola del colédoco y de la arteria hepática, y se hizo una ligadura que servirá posteriormente de referencia para cortar la porta, permaneciendo así cerrado el flujo a través de la arteria hepática. Los mayores peligros en este paso consisten en desgarrar la porta o en ligar la arteria pancreático-duodenal superior, pues la ligadura de la hepática se hace muy próxima a ellas.

Posteriormente, el pedículo renal izquierdo, arteria, vena, uréter y arteria suprarrenal se seccionaron entre dos ligaduras. De esta manera y mediante disección roma, se apreció la aorta abdominal, requiriéndose una nueva ligadura para liberarla del tejido paraaórtico de este lado hasta el diafragma. La arteria renal derecha se visualizó por transparencia a través de la vena cava inferior, excluyéndola de la circulación tras una ligadura doble entre su salida de la aorta y la citada vena. Posteriormente, se ligó todo el tejido paraaórtico de este lado hasta el diafragma.

En la aorta abdominal se hizo una ligadura distalmente a la salida de la mesentérica superior y ambas renales, dejándola preparada para la última fase del aislamiento del páncreas.

Posteriormente, se abrió el tórax del animal y se pinzó la aorta a nivel del cayado; se disecó, se separó la vena cava y se hizo una incisión transversal en la aorta torácica lo más distal posible que permitiera la introducción de una cánula a través de la cual fluiría el líquido de perfusión. La cánula queda anudada a la pared aórtica mediante una ligadura.

Si la perfusión se realiza con normalidad el hígado palidece al ser sustituida la sangre por el líquido de perfusión (Fig. 11). En ese momento, se busca la ligadura que se hizo en la arteria hepática y se secciona distalmente a ésta. Esta sección también incluye a la porta, a través de la cual sale el líquido de perfusión.

Tras haber liberado la aorta de los músculos prevertebrales y diafragma, se introduce el páncreas en la cámara de perfusión (Fig. 12).

A los pocos minutos, el páncreas estabiliza su presión arterial entre 10 y 20 mm de Hg, al tiempo que se inician movimientos peristálticos en el duodeno. En este momento, se inicia el experimento de perfusión.

Al terminar la perfusión se controla la viabilidad del páncreas observando el aumento de la presión arterial tras un pulso de adrenalina, que puede elevarla hasta 100 mm de Hg o más.

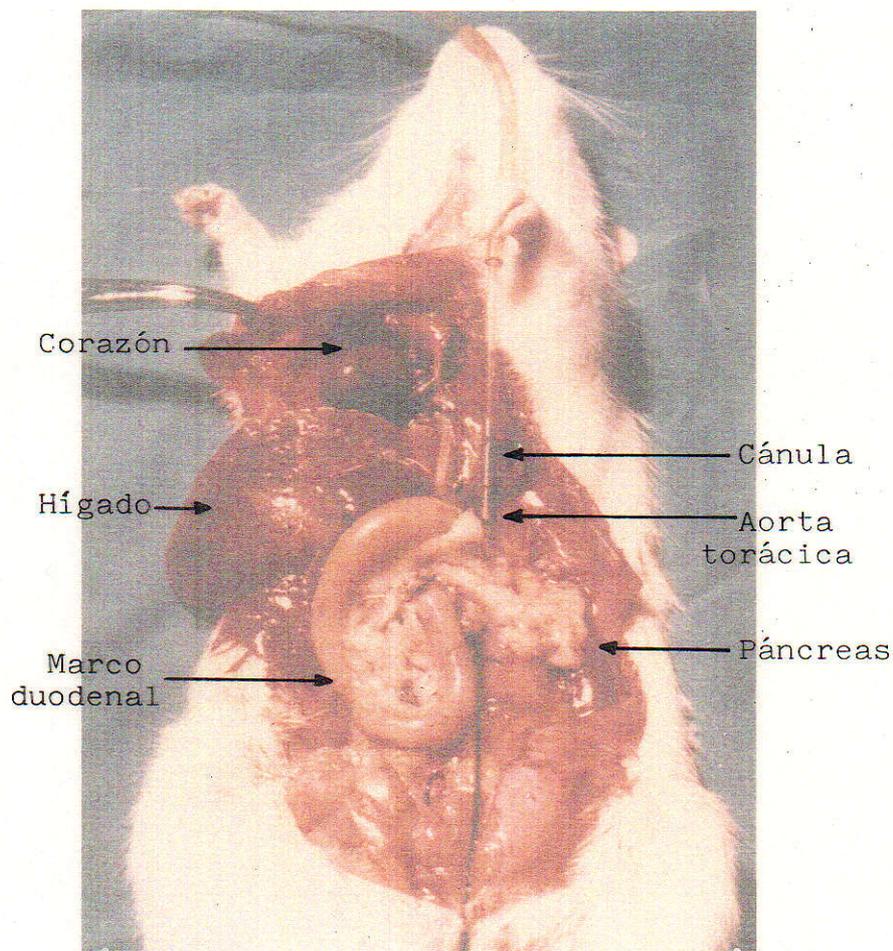


Fig. 11.- Perfusión del páncreas a través de la aorta. Se observa la pérdida de coloración del hígado al ser sustituida la sangre por el líquido de perfusión.

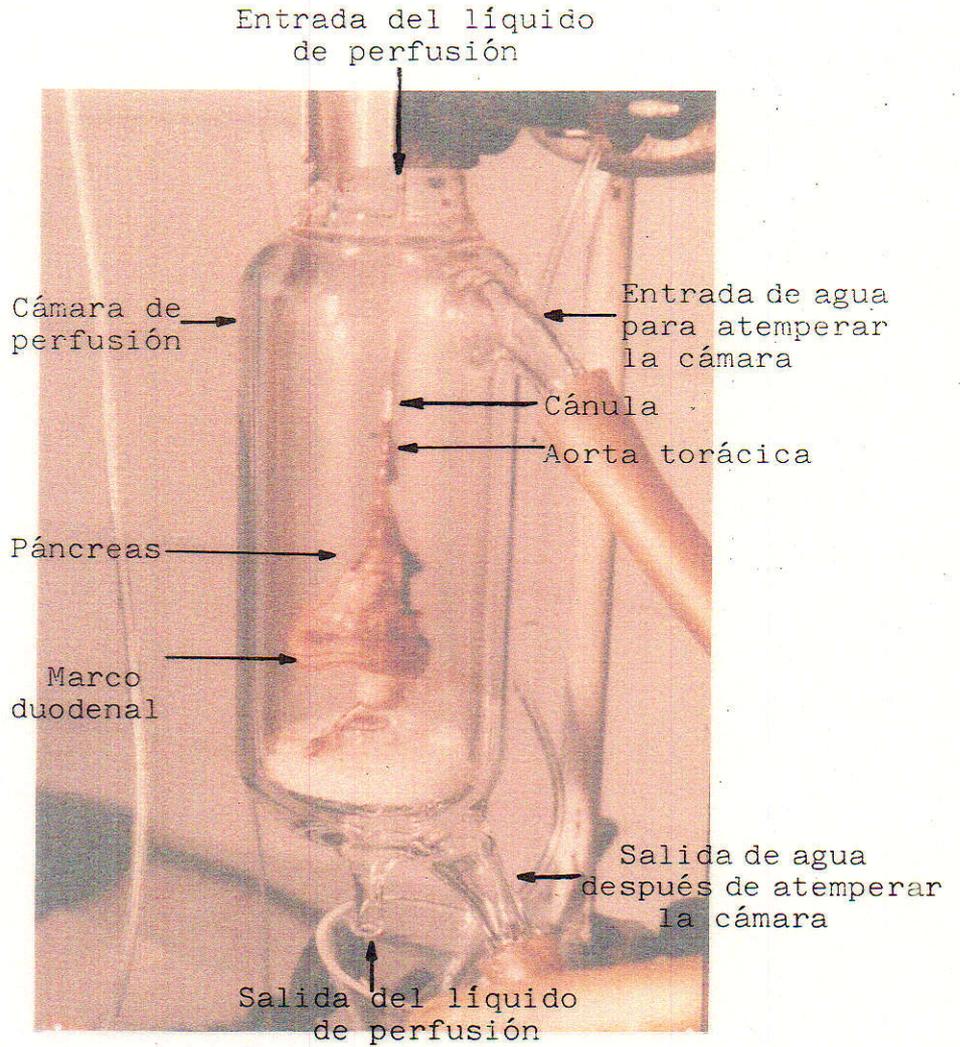


Fig. 12.- Páncreas aislado y perfundido introducido en la cámara de perfusión.

6.2. Descripción del sistema de perfusión

El sistema de perfusión está formado por un conjunto de unidades destinadas a proporcionar un preparado duodeno-pancreático, aislado en un medio interno artificial (líquido de perfusión), que posea unas características fisicoquímicas dentro de los márgenes fisiológicos que se dan normalmente "in vivo" (Fig. 13). Cada una de estas unidades, que describimos a continuación, cumple una función determinada.

6.2.1. Circulación del líquido de perfusión

Esta función, análoga a la del corazón en el animal intacto, corre a cargo de una bomba que impulsa el líquido de perfusión a través del propio sistema vascular. En nuestro trabajo, se ha utilizado una bomba "cerrada" (el líquido de perfusión no entra en contacto con el mecanismo de la bomba) y peristáltica (proporciona un flujo pulsátil). Su funcionamiento consiste en la compresión secuencial de un tubo flexible por una serie de cilindros montados circularmente y separados equidistantemente, según el tipo de bomba.

La bomba proporciona un volumen-minuto de líquido de perfusión perfectamente controlable, según el diámetro interno del tubo flexible que es comprimido y la velocidad de giro de los cilindros de la bomba que lo com-

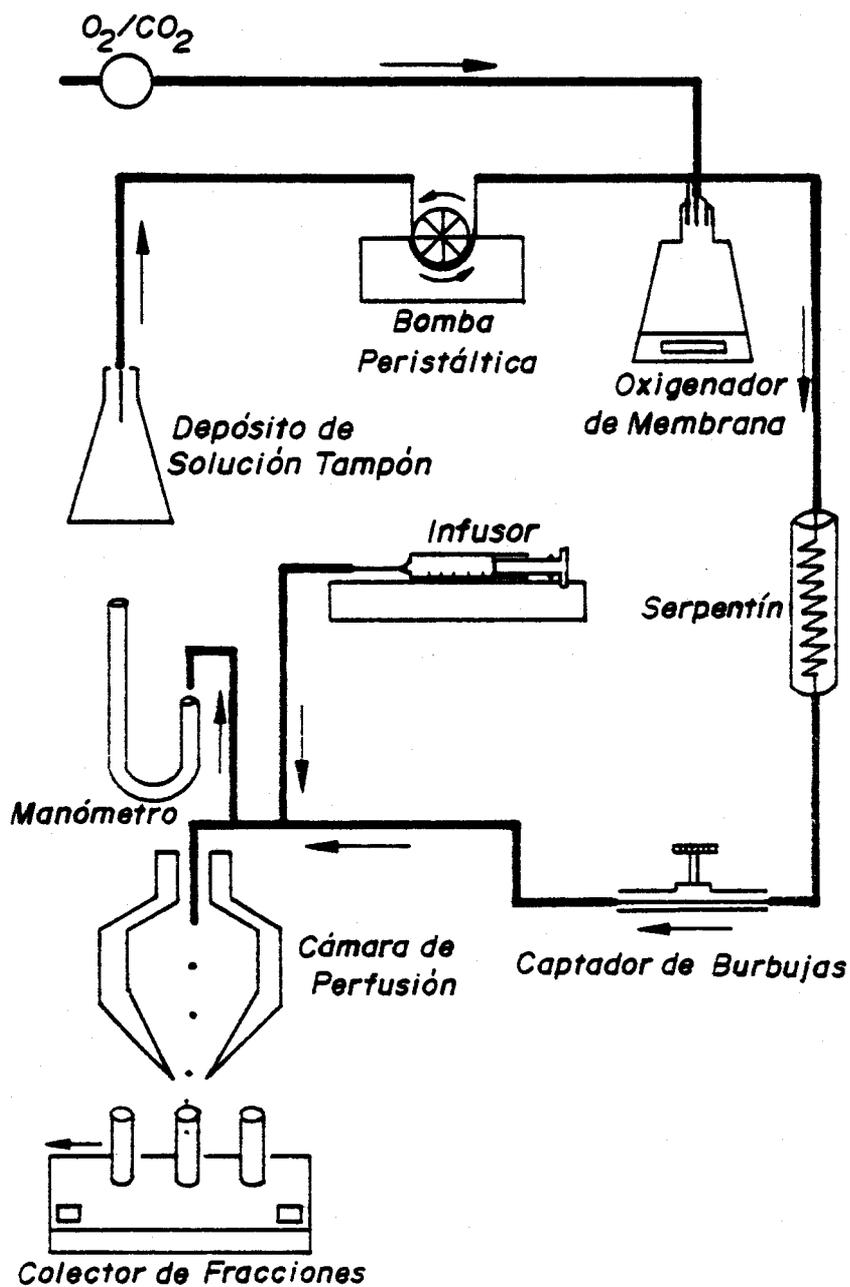


Fig. 13.- Esquema del aparato utilizado en la perfusión de páncreas.

primen. En nuestro caso, utilizamos un flujo de 2'5 ml/min, aproximadamente el mismo que el utilizado por SUSSMAN y col. (1966) en su preparado duodeno-pancreático y que cubre perfectamente las necesidades de oxígeno del mismo.

La elección del flujo de perfusión reside en la adecuación de dos factores importantes para la supervivencia del preparado: aporte de oxígeno y presión hidrostática de perfusión.

6.2.2. Oxigenación del líquido de perfusión

Esta función la realiza en nuestro sistema un oxigenador de membrana tipo "cerrado". El fundamento de este tipo de oxigenador es que el gas y el líquido de perfusión no están en contacto directo, sino separados por una membrana permeable al gas.

El tipo de oxigenador utilizado, consiste en un recipiente de sección tronco-cónica con cuatro entradas en su cara superior. Dos de ellas, son para que entre y salga el líquido de perfusión, conectadas mediante sen dos tubos de plástico a un reservorio donde se almacena dicho líquido y a la bomba de perfusión respectivamente. Las otras dos entradas de la cámara de oxigenación están ocupadas por los extremos de un huso constituido por una multitud de finísimos conductos de celulosa suspendidos

en el interior de la cámara, por donde circula la mezcla gaseosa utilizada en la perfusión. El oxígeno difunde a través de la pared de estos conductos de celulosa para solubilizarse en el líquido de perfusión, que se mantiene en continua agitación mediante un agitador magnético situado en el fondo de la cámara para lograr una masa líquida uniformemente oxigenada. La pared de los conductos es de silicona con una gran permeabilidad al oxígeno.

La mezcla gaseosa utilizada, está constituida por un 95% de oxígeno y un 5% de anhídrido carbónico (carbógeno) que se inyecta en el huso de la cámara a una presión de 0.4 Kg/cm^2 (789.4 mm Hg).

6.2.3. Registro de la presión de perfusión

La presión de perfusión se controla mediante la conexión de un manómetro de mercurio en un punto del circuito de perfusión cercano al páncreas. Para mantener un flujo de 2.5 ml/min, se registra una presión de perfusión variable de un páncreas a otro, oscilando entre 10 y 20 mm Hg.

En todas las experiencias realizadas, la presión se mantuvo constante durante todo el tiempo de duración de la perfusión, siendo ésto un buen síntoma del funcionamiento fisiológico del preparado (SUSSMAN et al., 1966).

Al final de todas las perfusiones, se comprobó la respuesta vasoconstrictora del páncreas a la adrenalina, considerándose la elevación de la presión como signo de viabilidad de la preparación, criterio que no siempre coincide con el estudio de la secreción de insulina.

6.2.4. Mantenimiento de la temperatura

Para controlar la temperatura de la cámara y del medio de perfusión se utilizó una resistencia eléctrica controlada por un termostato que regula la temperatura en un depósito de agua. Unido a este mecanismo, hay un sistema de bombeo que hace circular el agua atemperada a través de un cilindro de pared simple, que contiene un serpentín por donde circula el líquido de perfusión; asimismo, el agua es bombeada hacia la cámara de perfusión, dotada de una doble pared por donde circula, manteniendo en su interior una temperatura constante de 37°C.

6.2.5. Conexiones y cámara de perfusión

En la fig. 13 se representa esquemáticamente el sistema de perfusión formado por una serie de unidades situadas en el orden que llega a ellas el líquido de perfusión. Todas las unidades están unidas entre sí mediante un catéter de plástico de unas características especiales (Tygon, calibre 2/32) para impedir pérdidas de oxígeno.

La puesta en marcha de la bomba de perfusión hace que el líquido contenido en un reservorio, pase al oxigenador y de éste al serpentín de calentamiento. De aquí, pasa a un captador de burbujas (tubo en T con una rama vertical) que elimina las burbujas que se forman en el sistema, impidiendo que se produzca una embolia gaseosa, y finalmente llega mediante una cánula al páncreas que se encuentra en la cámara de perfusión. Esta cámara de forma cilíndrica consta de una doble pared lateral, por donde circula el agua atemperada, y dos aberturas: una superior, por donde se introduce el páncreas cateterizado y otra inferior que coincide con el fondo poroso de la cámara. Por aquí, sale el líquido de perfusión y se recoge fraccionadamente en un colector de fracciones .

6.2.6. Infusión de sustancias en el páncreas

Con el objeto de conseguir aumentos rápidos de la concentración de las diversas sustancias utilizadas en el líquido aferente al páncreas, sin necesidad de circular por todo el sistema ni de diluirlas en los depósitos de la perfusión, se infundieron inmediatamente antes de la entrada en el páncreas.

Para ello, se utilizó un infusor cuyo motor empuja el émbolo de una jeringa que contiene la sustancia a in-

fundir a una concentración determinada. El flujo proporcionado depende del calibre de la jeringa y de la velocidad del infusor. En todas las experiencias se ha utilizado una jeringa de 50 ml y una velocidad de empuje del motor que proporciona un flujo líquido de 9'7 ml/hora ó 0'16 ml/min.

Según este flujo, se calcula la concentración a preparar en el infusor para obtener la deseada en el páncreas cuando al ser infundida se mezcle con el líquido de perfusión. La sustancia a infundir se prepara siempre en tampón KRB pH 7'4, BSA 0'5%.

6.2.7. Colector de fracciones

El líquido perfundido, que fluye de la vena porta de forma continua, sale de la cámara de perfusión a través de la lámina de vidrio poroso que ésta tiene en su base y se recoge continuamente en fracciones de dos minutos. Este proceso de recogida se automatiza con la utilización de un colector de fracciones ajustado para cambiar de tubo cada dos minutos. Las muestras se colocan inmediatamente en hielo y una vez terminada la perfusión se congelan todos los tubos a -20°C hasta el día de la determinación de insulina.

6.2.8. Líquido de perfusión

Se ha utilizado como líquido de perfusión una solución salina de Krebs Ringer bicarbonato (KRB), pH 7'4, suplementada con albúmina. Las sales componentes de esta solución se prepararon en soluciones concentradas que se conservaron a 4°C, tomándose cada día las cantidades necesarias para preparar la solución de Krebs.

A continuación, se detalla la concentración (g/100 ml) de cada una de estas soluciones, el volumen utilizado de cada una de ellas para preparar 780 ml de KRB y la concentración final de cada una de las sales en el tampón.

<u>Reactivos</u>	<u>Volumen</u>	<u>Conc. final</u>
H ₂ O destilada	540 ml	-
NaCl (9%)	60 ml	118'00 mM
NaHCO ₃ (1'3%)	126 ml	25'00 mM
CaCl ₂ (1'22%)	18 ml	2'50 mM
KCl (1'15%)	24 ml	5'00 mM
SO ₄ Mg (1'86%)	6 ml	1'18 mM
KH ₂ PO ₄ (2'1%)	6 ml	1'18 mM

Después de añadidos y mezclados todos los componentes referidos en la tabla anterior, se gaseó la solución final obtenida durante 10 min con carbógeno (95% O₂, 5% CO₂), ajustándose el pH a 7'4. Se añadió albúmina sérica

bovina en la proporción de 0'5% y trasylol 250 U/ml, volviéndose a comprobar el pH. La presión oncótica de la albúmina contribuye a retrasar la aparición del edema tisular que ocurre siempre en este tipo de preparados.

7. AISLAMIENTO DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS

El aislamiento de los islotes de Langerhans es un paso previo necesario para todo estudio bioquímico ya que permite la separación del tejido exocrino pancreático que puede interferir de un modo importante en la medición de parámetros metabólicos.

La técnica utilizada para el aislamiento fue la de la colagenasa (LACY y KOSTIANOWSKY, 1967) con algunas modificaciones introducidas por nosotros. Básicamente, consiste en la rotura del páncreas exocrino por perfusión retrógrada a través del colédoco y conductillos pancreáticos de una solución salina tamponada a pH 6'54 con la siguiente composición:

NaCl	140 mM
KCl	6 mM
MgSO ₄	1'3 mM
KH ₂ PO ₄	0'4 mM
Na ₂ HPO ₄	0'3 mM
CaCl ₂	1'3 mM

A continuación, se extrajo el páncreas, se troceó con tijeras y se procedió a una incubación con colagenasa cruda.

La incubación se realizó en un baño de agua a 37-38°C con agitación manual durante 10-15 min. El rendimiento en esta técnica depende en gran parte del tiempo de incubación con la colagenasa. Por ello, es

muy importante establecer las condiciones de incubación que variarán según la actividad específica de la colagenasa empleada.

A continuación, se separaron los islotes de los acini pancreáticos. Esto puede realizarse de dos formas: bien por centrifugación en un gradiente discontinuo de Ficoll (SHARP et al., 1973) o bien por recolección manual mediante visualización con un microscopio estereoscopio de 12-15 aumentos.

Se ha empleado esta última porque nos permite seleccionar los islotes y porque no lesiona las células periféricas del islote. Habitualmente, se obtienen 100-150 islotes por páncreas, lo que supone un rendimiento del 5-10%.

Material

- a) Anestesia: pentotal sódico, inyectado intraperitonealmente a la dosis de 40 mg/Kg peso.
- b) Material quirúrgico: tijeras finas, pinzas Kocher, pinzas curvas, jeringuillas de 5 ml y catéter de linfografía.
- c) Material de vidrio: placas Petri, vasos de precipitado de 15 ml, pipetas Pasteur siliconizadas y tubos de ensayo milimetrado.
- d) Colagenasa: 150 U/mg, 3 mg/ml de páncreas triturado.

Método

Una vez anestesiada y fijada la rata, se practicó una laparotomía media amplia desde el apéndice xifoides hasta el pubis.

Se visualizó el hilio hepático y se realizó una pequeña apertura en el colédoco inmediatamente después de la confluencia de los conductillos hepáticos. A través de ella, se introdujo un catéter de linfografía que se fijó al colédoco mediante un lazo con hilo (Fig. 14).

A continuación, se visualizó por transparencia la desembocadura del colédoco en el duodeno cerrándola con unas pinzas Kocher. Con una jeringa conectada al catéter se inyectaron unos 10 ml de solución de Hanks frío y se observó como el páncreas se iba hinchando progresivamente. Cuando éste estaba bien hinchado practicamos la pancreatectomía total (Fig. 15).

El páncreas aislado se depositó en una placa Petri que contenía Hanks frío y se limpió de las impurezas de coágulos y grasa que pudiera llevar. A continuación, se troceó (20 min aproximadamente) en un vaso de precipitado pequeño hasta obtener una papilla que se depositó en un tubo de ensayo milimetrado, descartando la mayor cantidad posible de líquido. Lavamos la papilla varias veces con Hanks para eliminar los residuos de grasa. Una vez limpia, se añadió colagenasa en una proporción de 3 mg/ml. La incubación con colagenasa se realizó a 37°C durante

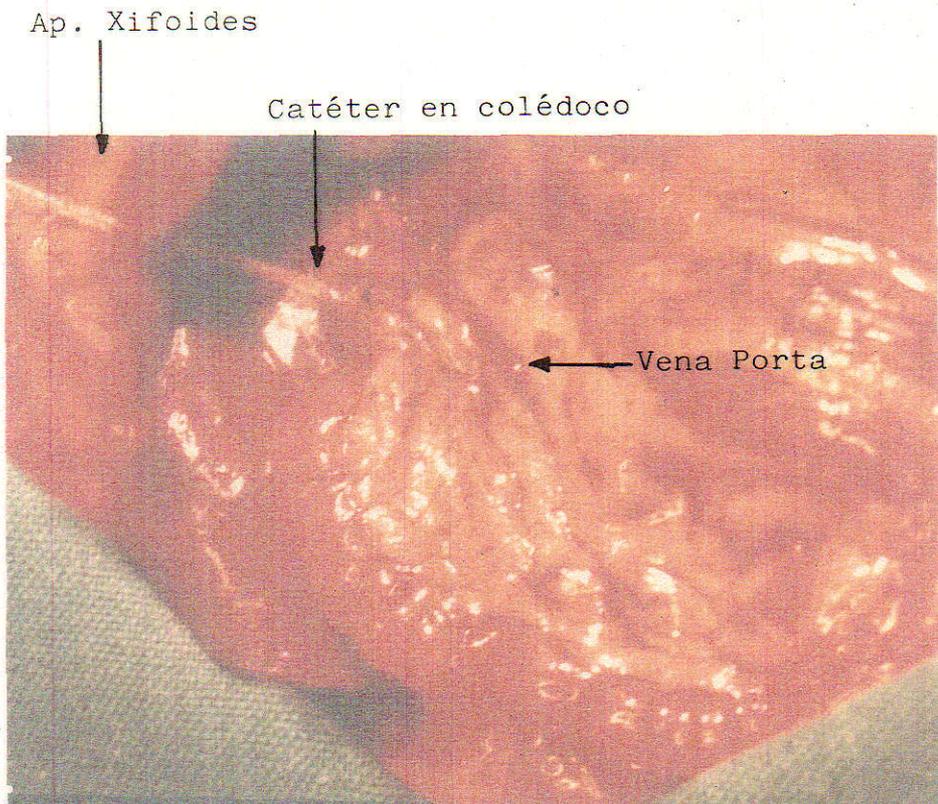


Fig. 14.- Cabeza del páncreas. Se aprecia el catéter introducido en el colédoco.

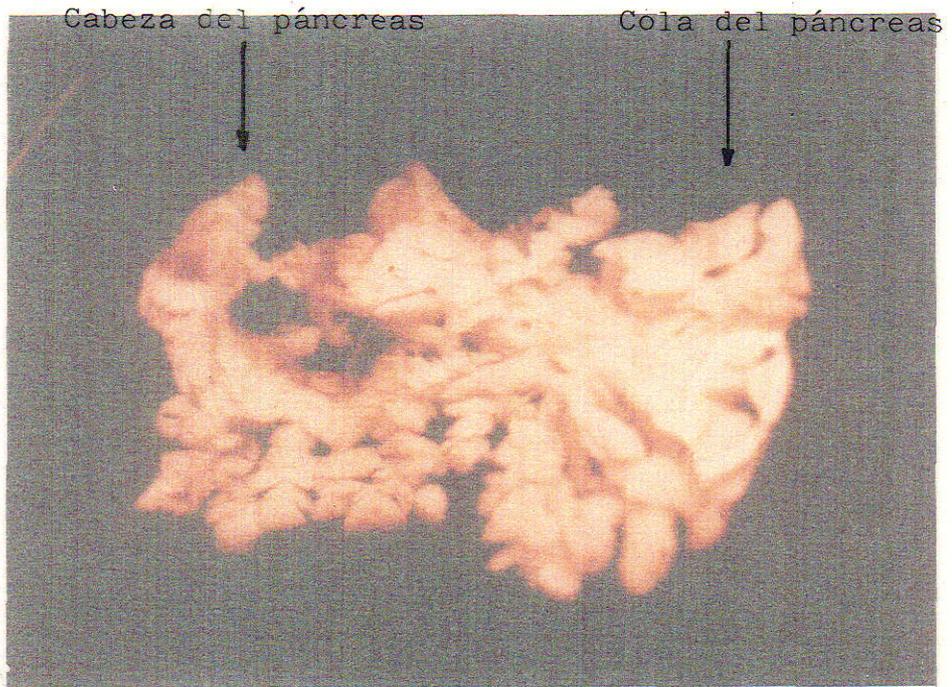


Fig. 15.- Páncreas extraído

13-15 min, agitando con vigor manualmente. Transcurrido este tiempo, se detuvo la digestión con colagenasa añadiendo un exceso de Hanks frío.

A continuación, se centrifugó la mezcla a baja velocidad (1.000-1.500 r.p.m.) durante 45 s. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento nuevamente con Hanks. Esta operación se repitió dos veces más, con objeto de eliminar la colagenasa.

Se tomó una muestra con pipeta Pasteur siliconizada y se depositó en placa de Petri de fondo oscuro y se observó con el microscopio estereoscópico a 10-15 aumentos. Los islotes se distinguieron como esferitas blancas altamente refringentes (Fig. 16).

Los islotes se "pescaron" por aspiración con una pipeta Pasteur de calibre reducido a la llama (Fig. 16) y se depositaron en un tubo de ensayo que contenía solución Hanks u otra solución fisiológica tamponada.

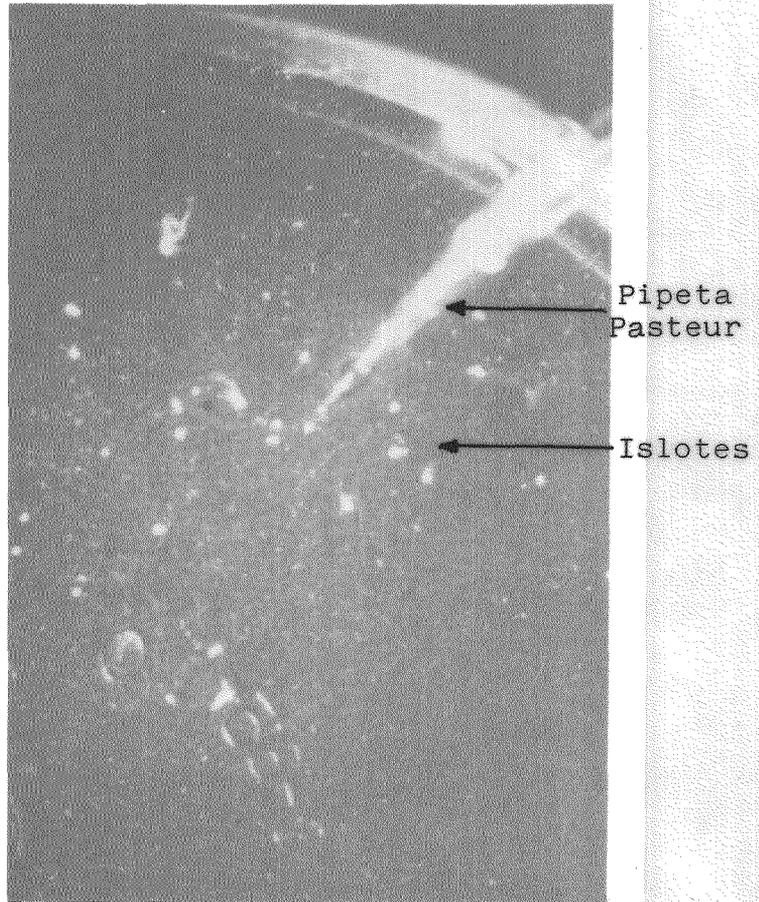


Fig. 16.- "Pesca" de los islotes aislados mediante una pipeta de vidrio (25 X).

8. INCUBACION DE ISLOTES

Se utilizó como medio de incubación KRB pH 7'4, albúmina 0'5%, trasylo1 250 U/ml (preparado en las mismas condiciones que el medio de perfusión).

Grupos de tres islotes se depositaron en tubos que contenían 1 ml del tampón anterior y glucosa 2'75 mM. Los tubos se preincubaron durante 30 min a 37°C en un baño termostatzado con agitación constante.

Terminada la preincubación, se centrifugaron los tubos durante 5 min a 3.000 r.p.m. Se desecharon los sobrenadantes y se lavaron los islotes varias veces con el tampón inicial. A continuación, se realizó una segunda incubación de los islotes en 1 ml de KRB pH 7'4, albúmina 0'5%, trasylo1 250 U/ml, glucosa 2'75 mM y/ó 16'7 mM durante 30 min a 37°C.

Transcurrido este tiempo, se cogieron 0'8 ml del sobrenadante de cada tubo y se guardaron a -20°C hasta su posterior uso para la determinación de insulina. La insulina se midió según la técnica descrita en el apartado 12 de Material y Métodos.

9. ENSAYO ACTIVIDAD FOSFORILANTE DE LA GLUCOSA EN EXTRACTOS DE ISLOTES PANCREATICOS

El ensayo de las actividades fosforilantes de la glucosa en el islote se realiza a dos concentraciones de D-glucosa: a 0'5 mM, a cuya concentración la glucoquinasa es esencialmente inactiva y a 100 mM, a cuya concentración la actividad fosfotransferasa es máxima. La actividad de la glucoquinasa se obtiene por diferencia entre estas dos (Di PRIETO et al., 1962).

El método más utilizado para medir la actividad fosforilante de la glucosa en diversos tejidos es el enzimático (CRANE y SOLS, 1955). Dicha técnica consiste en utilizar el producto de la reacción, catalizada por las enzimas objeto de medida, como sustrato de otra nueva reacción que es catalizada por otra enzima.

Habitualmente, esta enzima es una deshidrogenasa y requiere como coenzimas los nucleótidos de piridina, bien en estado reducido (NAD^+ , NADP^+) o en estado oxidado (NADH , NADPH). A medida que transcurre la reacción, los nucleótidos de piridina se oxidan o reducen y la magnitud de este cambio se determina por espectrofotometría a 340 nm; de esta forma y conociendo el coeficiente de extinción molar de los nucleótidos de piridina a esa longitud de onda, se puede determinar la velocidad de la reacción enzimática objeto de estudio, ya que existe una proporcionalidad directa entre la absorbancia y la velocidad de la reacción.

Por lo general, se emplea glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (D-glucosa 6 fosfato: NADP 1 óxidorreductasa, EC 1.11.49) comercial como enzima auxiliar y beta nicotinamida adenín dinucleótido fosfato como coenzima auxiliar, registrando la densidad óptica a 340 nm en un espectrofotómetro.

Dada la escasa cantidad de tejido disponible (alrededor de unos 200 μ g de proteína de islote en cada aislamiento), la técnica descrita es poco útil y no permite variables experimentales. Por ello, se empleó una técnica más sensible, diseñada en un principio para el ensayo de galactoquinasa (ATP: D-galactosa 1 fosfotransferasa, EC 2.7.1.6) en hematíes humanos (BLUME y BLEUTLER, 1975) y adaptado por LAZO y SOLS (1979) para el ensayo de la actividad de hexoquinasa en hematíes humanos.

En esquema, la técnica consiste en la incubación del extracto tisular con D-(U¹⁴C)glucosa y MgATP. Se detiene la reacción por la adición de glucosa no radiactiva a alta concentración. El producto de la reacción, U-¹⁴C glucosa 6 fosfato, se mide como la radioactividad que permanece en un filtro que contiene una resina de intercambio iónico (DEAE celulosa), después de la elución de la D-(U-¹⁴C)glucosa no fosforilada mediante lavado con agua desionizada.

La adaptación de este método para la determinación de la actividad fosforilante de la glucosa ha sido realizada por nosotros (BEDOYA et al., 1984b).

9.1. Medio de incubación

La glucoquinasa es muy inestable en ausencia de concentraciones saturantes de glucosa y ATP. Altas concentraciones de potasio protegen a la glucoquinasa de la inactivación "in vitro", así como agentes con grupos sulfhidrilos (L-cisteína, glutatión, 2-mercaptoetanol, etc.) ejercen un efecto activador (SALAS et al., 1965).

El donador de grupos fosfato es el ATP acompañado con magnesio en proporción equimolecular (SALAS et al., 1965).

Por tanto, la composición del medio de incubación en el ensayo es la siguiente:

Hepes	50 mM pH 7'4
ClK	150 mM
Cl ₂ Mg	5 mM
ATPMg	5 mM
2-mercaptoetanol	1 mM
FNa	10 mM
D-(U ¹⁴ C)glucosa	0'5 ó 25 mM

El ATPMg está a unas concentraciones saturantes, ya que su Km descrita es 0'77 mM (ASHCROFT y RANDLE, 1970).

Se han utilizado dos concentraciones de glucosa: 0'5 mM y 25 mM; la de 0'5 mM, es una concentración que satura la actividad de la hexoquinasa (SOLS y CRANE, 1954) y la de 25 mM, está dos veces por encima de la Km

descrita para la glucoquinasa de islote (ASHCROFT y RANDLE, 1970).

Las actividades específicas son del orden de 7'69 mCi/mmol para la hexoquinasa y de 1'78 mCi/mmol para el ensayo de glucoquinasa.

9.2. Homogeneización

La ruptura de los islotes se realizó por dos técnicas distintas: homogeneización en Potter de vidrio de 2 ml de capacidad o bien mediante desintegración ultrasónica. Ambas operaciones se llevaron a cabo en hielo.

El medio de homogeneización utilizado fue el mismo en ambas técnicas y su composición es la siguiente:

- Hepes 50 mM, pH 7'4
- KCl 150 mM
- EDTA 1 mM
- 2-mercaptoetanol 2 mM

Los islotes se resuspendieron en 250-300 μ l de este medio para su sonicación u homogeneización.

9.3. Ensayo

El ensayo se llevó a cabo a 30°C en tubos eppendorf de 1'5 ml de capacidad. El volumen de incubación fue de 50 μ l y el tiempo de incubación de 20 min.

La reacción se inició con la adición de 20 μ l de extracto de islote a la mezcla de reacción. Transcurrido el tiempo de incubación se añadieron a cada tubo 40 μ l de glucosa 2 M, EDTA 0'15 M.

A continuación, se depositaron alícuotas de 40 μ l en un papel de filtro que contenía una resina de intercambio aniónico y por tanto retiene, entre otras cosas, los esteres fosfóricos de la glucosa formados en la reacción catalizada por la glucoquinasa y hexoquinasa.

El siguiente paso fue la separación de la glucosa radioactiva fosforilada de la no fosforilada. Esto se consiguió por elución con un exceso de agua desionizada. Esta operación se realizó en un lavador de filtros conectado a una bomba de vacío.

Después de secarlos los filtros a temperatura ambiente o en estufa a 60°C, se depositaron en 5 ml de líquido de centelleo para el contaje de su radioactividad (ver fig.17).

9.4. Cálculo de las actividades enzimáticas

El cálculo de la actividad fosforilante de la glucosa de homogenado de islotes se realiza a partir de las actividades específicas de (U-¹⁴C)glucosa utilizadas y del número de cuentas por minuto presentes en los filtros una vez lavados y descontando la radioactividad del blanco de incubación. De esta forma, se calculan los moles de glucosa fosforilados. Si el resultado se divide

ENSAYO DE ACTIVIDAD FOSFORILANTE DE GLUCOSA

Mezcla de ensayo: Hepes 25 mM pH 7'4, KCl 150 mM, NaF 10 mM, Cl_2Mg 5 mM, MgATP 5 mM, D- $U^{14}C$ glucosa 0'5 ó 25 mM (concentraciones finales).

Temperatura de incubación: 30°C

Tiempo de incubación: 20 min

Ensayo:

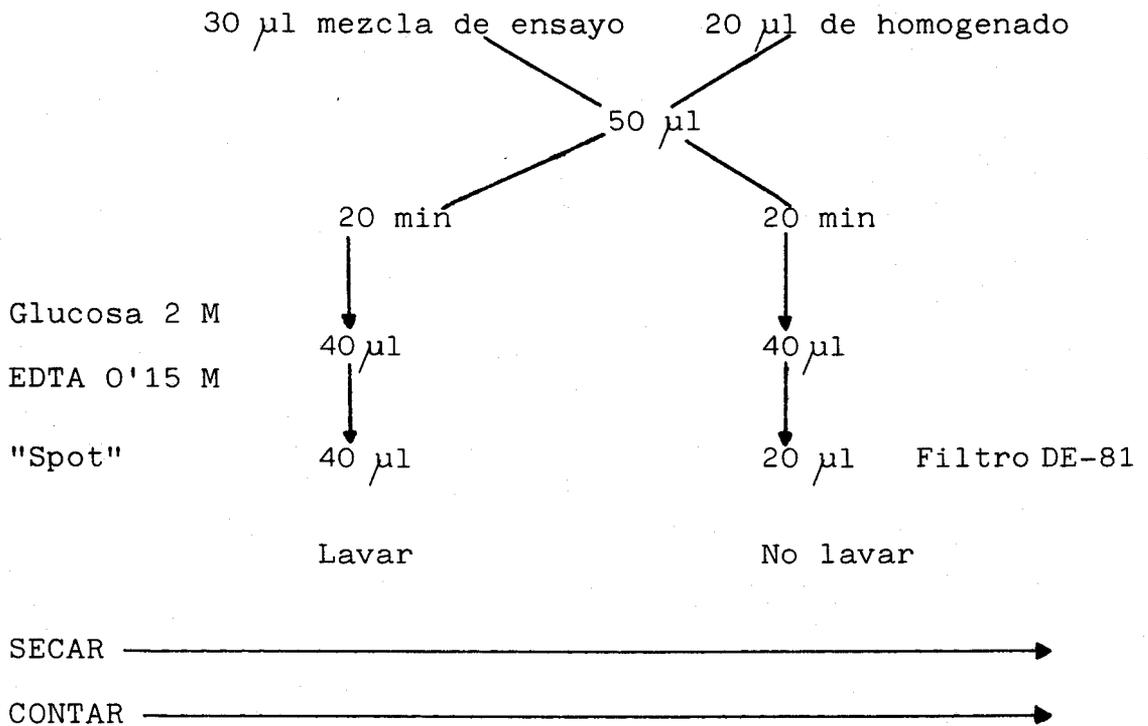


Fig.17.-Esquema del ensayo de la actividad fosforilante de la glucosa en extractos de islotes de Langerhans.

por el tiempo de incubación y la cantidad de homogenado de islote expresado en μg de proteínas, podremos calcular la actividad enzimática expresada en pmoles de D-(U- ^{14}C)glucosa transformada por minuto y μg de proteína de islote en nuestras condiciones de ensayo.

Cálculo de las actividades específicas

Para el cálculo de las actividades específicas es necesario conocer la concentración de glucosa fría (no marcada) y la cantidad de radioactividad del trazador (en este caso, D-(U ^{14}C)glucosa) expresada en cuentas por minuto.

$$\text{Actividad específica (A.e.)} = \frac{\text{mCi}}{\text{mmol}} = \frac{\mu\text{Ci}}{\mu\text{mol}}$$

Sabiendo que $1 \mu\text{Ci} = 2'22 \times 10^6$ desintegraciones por min (d.p.m.) y que la eficiencia del contador es del 90%, resulta que $1 \mu\text{Ci} = 1'998 \times 10^6$ cuentas por minuto (c.p.m.) en nuestras condiciones de medida. Por tanto

$$\text{A.e.} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de c.p.m.: } 1'998 \times 10^6}{\text{n}^\circ \text{ de } \mu\text{moles de glucosa}}$$

El ensayo de hexoquinasa se realizó a una concentración de glucosa fría de 0'5 mM, en un volumen de incubación de 50 μl , luego el número de μmoles de glucosa es: $0'5 \text{ mM} = 0'5 \text{ mmoles}/10^3 \text{ ml} = 0'5 \mu\text{moles/ml}$. Por tanto, en 50 μl hay 0'025 μmoles de D-glucosa fría.

El ensayo de la actividad enzimática de glucoquinasa se realizó a una concentración final de D-glucosa 25 mM en un volumen de 50 μ l, la cantidad de D-glucosa fría presente es 25 μ moles/ml, o lo que es lo mismo 1'25 μ moles en 50 μ l.

Como normalmente se utiliza D-(U-¹⁴C)glucosa de alta actividad específica (249 mCi/mmol), el número de micromoles que aporta es prácticamente despreciable (concretamente $4'62 \times 10^{-4}$ μ moles para el ensayo de hexoquinasa y $5'38 \times 10^{-3}$ μ moles para el ensayo de glucoquinasa) por lo que no alteran significativamente la cantidad total de glucosa y por ello no se tiene en cuenta en el cálculo de las actividades específicas.

Cálculo del factor de multiplicación

Como se ha mencionado anteriormente, las experiencias se llevaron a cabo en un volumen de 50 μ l. Transcurrido el tiempo de incubación se añadieron a cada tubo 40 μ l de glucosa 2 M, EDTA 0'15 M; a continuación, se tomaron 40 μ l que se depositaron en papel de filtro Whatman DE 81 y tras lavado y secado se contó su radioactividad.

Por tanto, se han realizado una serie de diluciones y es necesario calcular el factor de multiplicación para calcular el número de cuentas totales que corresponden a la glucosa radioactiva fosforilada.

El número de cuentas de cada filtro ha de ser multiplicado por un factor de 2'25. Al volumen de incubación, 50 μ l, se añadieron 40 μ l de glucosa 2 M, EDTA 150 mM (volumen final 90 μ l); de ahí, se tomaron 40 μ l que se depositaron en un filtro y se contó. Luego el factor de multiplicación es 2'25 (90: 40 = 2'25).

Cálculo final de las actividades fosforilantes de la glucosa

Al número de cuentas de cada filtro se les restó el blanco y se multiplicó por el factor 2'25. El valor resultante se dividió por $1'998 \times 10^6$ para pasarlo a μ Ci. A continuación, se dividió por la actividad específica y el valor resultante son los μ moles de D-(U- 14 C)-glucosa transformados por 20 min de incubación. Este valor se dividió por 20 para obtener el resultado en μ moles de D-(U- 14 C)glucosa $\cdot \text{min}^{-1}$. Si dividimos este resultado por la cantidad de proteína presente en cada tubo, el resultado final podrá expresarse en μ moles D-(U- 14 C)glucosa $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g proteína islote}^{-1}$.

10. DETERMINACIÓN DE PROTEINAS

Las proteínas se determinaron colorimétricamente según el método de BRADFORD (1976) utilizando seroalbúmina bovina como patrón de referencia.

11. EXTRACCION Y VALORACION DEL CONTENIDO DE INSULINA

La extracción de insulina del páncreas entero y de los islotes de Langerhans se realizó mediante la técnica de extracción y precipitación con ácido-alcohol (ROMANS et al., 1940). La insulina se determinó mediante radioinmunoensayo, técnica descrita en el apartado 12 de Material y Métodos.

Extracción de insulina del páncreas

En primer lugar, se desangró el animal, extrayéndose rápidamente el páncreas y se homogeneizó en ácido-alcohol (75% etanol, 0'4% ClH concentrado) a 4°C.

A continuación, el homogenado se centrifugó durante 10 min a 3.000 r.p.m. en una centrífuga refrigerada. Se recogió el sobrenadante y se neutralizó con hidróxido amónico (10%).

Se centrifugó de nuevo y el sobrenadante se diluyó inmediatamente después en tampón veronal 0'1 M, pH 8'6 0'5% BSA (1/5.000 y 1/20.000).

Las muestras se guardaron a -20°C hasta el día de la determinación de insulina.

Extracción de insulina de los islotes

Grupos de tres islotes se depositaron en 1 ml de ClH 0'7 M/ etanol (1:3 vol/vol). Se mantuvieron una noche a 4°C , para la extracción de la insulina.

Centrifugar 5 min a 3.000 r.p.m. Recoger el sobrenadante y hacer diluciones 1:10 con veronal 0'1 M pH 8'6, 0'5% BSA.

Finalmente, se almacenaron las muestras a -20°C para valorar el contenido de insulina.

12. RADIOINMUNOENSAYO DE INSULINA

Para la determinación de insulina se utilizó una técnica llamada habitualmente radioinmunoensayo o radioinmunoanálisis descrita originalmente por YALLOW y BERSON (1959). Su fundamento consiste esencialmente en una reacción de competición entre la insulina de la muestra y una insulina exógena marcada con ^{125}I para combinarse con un anticuerpo específico contra insulina.

A continuación, se describe la preparación de cada uno de los elementos necesarios para la puesta en marcha de la determinación radioinmunológica de insulina.

12.1. Preparación de insulina análisis y de marcaje

Se utilizó insulina porcina cristalina. Se disolvieron 2 mg de insulina en 2 ml de $\text{ClH } 0'03 \text{ N}$, quedando a una concentración de 1 mg/ml. Se dejó en reposo 30 min agitando esporádicamente. Se hicieron alícuotas de 50 μl identificadas como insulina de marcaje (IM), que se congelaron a -20°C .

Se mezclaron 0'1 ml de la disolución anterior con 2'4 ml de tampón veronal sódico 0'1 M, pH 8'6, 0'5% BSA, quedando a una concentración de $10^6 \mu\text{U/ml}$ (1 mg=25U).

Se mezclan 0'5 ml de esta solución con 49'5 ml de tampón veronal quedando a una concentración de $10^4 \mu\text{U/ml}$. Se hicieron alícuotas de 1 ml identificadas como insulina análisis (IA), que se congelaron a -20°C .

12.2. Anticuerpos antiinsulina

Los anticuerpos antiinsulina se obtuvieron de suero de cobaya previa inmunización con insulina porcina y adyuvante completo de Freund.

Material

- a) Solución de insulina: se preparó una solución que contenía 8'3 mg de insulina porcina cristalizada en 12'7 ml ClH 0'03 N.
- b) Adyuvante de Freund (3 ml): es un antígeno inespecífico constituido por un extracto de cápsulas de bacilo tuberculoso en suspensión oleosa.

Se mezclaron ambas soluciones hasta obtener una solución homogénea que contenía 10 mU/ml de insulina.

Método

Se inyectó 1 ml de la suspensión anterior por vía subcutánea en la zona lumbar de los cobayas. Es conveniente administrar agua azucarada a los animales para evitar crisis hipoglucémicas. La inmunización se repitió quincenalmente hasta un total de 8 inmunizaciones.

A la semana de la última inmunización se extrajo sangre por punción cardíaca, se separó el suero y se almacenó a -20°C .

Titulación de anticuerpos

Para saber qué suero de cobaya era el más adecuado y contenía mayor cantidad de anticuerpo, se incubaron diluciones variables de anticuerpo con una cantidad constante de insulina marcada siendo válidos aquellos sueros que se unían al 50% de dicha insulina.

A continuación, con el suero de cobaya seleccionado se preparó una curva estándar para cada dilución de anticuerpo (1/20.000, 1/40.000, 1/60.000), como se describe en el apartado 12.4 de Material y Métodos y se observó cuál era la dilución de anticuerpo a la que tenía más sensibilidad la curva (en nuestro caso 1/40.000) (Fig. 18).

El suero de cobaya seleccionado (1 ml) se diluyó en 100 ml de tampón veronal sódico 0'1 M, pH 8'6, BSA 0'5% y 1% de suero de cobaya no inmunizado. La solución resultante (1/100) se dividió en alícuotas que se conservaron a -20°C hasta su posterior uso.

12.3. Marcaje de insulina

Consiste en la yodación de la molécula de insulina con ^{125}I según el método de la cloramina T de HUNTER y GREENWOOD(1962). Se basa en la oxidación, por la cloramina T, del yoduro radioactivo en yodo atómico que se une a uno o más carbonos del anillo bencénico de las moléculas de tirosina que se encuentran en las cadenas de insulina.

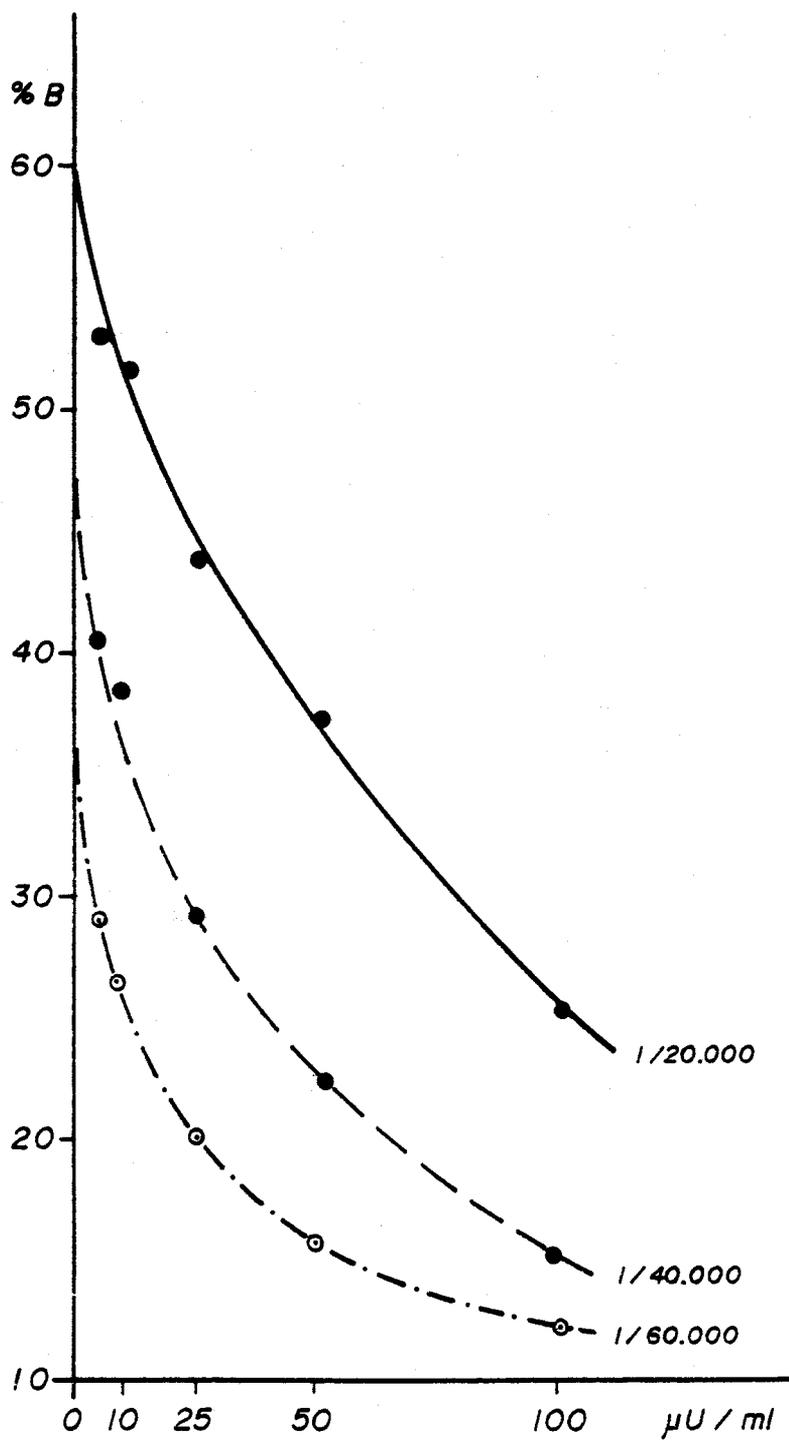


Fig. 18.- Titulación de anticuerpos antiinsulina.

La acción de la cloramina T se detiene por medio del metabisulfito.

Material

- Insulina porcina cristalizada (1 mg/ml)
- ^{125}I Amersham, con una actividad total de 1 mCi/10 μl
- Tampón veronal (dietil barbiturato sódico) 0'1 M, pH 8'6, BSA 0'5%
- Cloramina T (2'5 mg/ml): 25 mg disueltos en 10 ml de tampón fosfato. Se preparó 10-15 min antes del marcaje y se mantuvo en la oscuridad hasta su uso. Se utilizó en el marcaje como oxidante débil.
- Metabisulfito sódico (5 mg/ml): 25 mg disueltos en 5 ml de tampón fosfato. El metabisulfito sódico se utilizó como reductor para detener la reacción de oxidación desencadenada por la cloramina T.
- BSA: se pesaron 25 mg y se disolvieron en 1 ml de tampón fosfato.

Método

El marcaje se realizó a temperatura ambiente. En un tubo de plástico se pipetearon por este orden:

- 20 μl de tampón fosfato
- 5 μl de cloramina T (12'5 μg)
- 5 μl de insulina marcaje (5 μg)
- 10 μl de ^{125}I (1 mCi) o su equivalente según la pérdida de actividad en el tiempo.

La mezcla se agitó durante 30 s exactos, añadiendo inmediatamente después:

- 5 μ l de metabisulfito sódico (25 μ g). Agitar.
- 300 μ l de BSA (7'5 mg)

Se tomaron 5 μ l de la mezcla de marcaje y se pasaron a un tubo que contenía 5 ml de tampón veronal 0'1 M pH 8'6, BSA 0'5%. Estos 5 ml se utilizaron para calcular el grado de incorporación del ^{125}I al péptido.

Purificación de la insulina marcada

La insulina- ^{125}I está contaminada por péptidos de degradación y por ^{125}I que no se ha incorporado. Para su purificación empleamos la adsorción con talco (ROSSELIN et al., 1966).

Método

A la mezcla de marcaje se le añadió 100 μ l de talco (100 mg/ml). Se agitó y centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 10 min. Se aspiró el sobrenadante que contenía iodo libre y pequeños péptidos y el precipitado se resuspendió en 1 ml de ácido acético 1 N/etanol absoluto (1:1). Se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 10 min. El sobrenadante, que contenía la insulina- ^{125}I , se dividió en alícuotas de 25 μ l y se conservaron a -20°C hasta su posterior uso. La purificación se debe realizar antes de cada RIA.

Cálculo del porcentaje de incorporación (%I)

Se pusieron por triplicado, en tubos de plástico, los siguientes reactivos:

- 0'3 ml de tampón veronal 0'1 M pH 8'6, BSA 0'5%
- 0'1 ml de muestra radiactiva diluida
- 0'1 ml de talco

Los tubos se agitaron y se dejaron en reposo durante 5 min. Después se centrifugaron a 3.000 r.p.m. durante 5 min. Se contó la radioactividad del precipitado y del sobrenadante y se calculó el porcentaje de radioactividad del primero con respecto a la radioactividad total:

$$\%I = \frac{\text{cpm ppdo}}{\text{cpm ppdo} + \text{cpm sbte}} \times 100$$

En los marcajes realizados (n=10) el porcentaje de incorporación arrojó un valor medio de $84'1 \pm 0'67$.

Actividad específica

La actividad específica de la insulina- ^{125}I , o cantidad de radioactividad (μCi) incorporada por μg de péptido durante el marcaje, se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{A.e.} = \frac{\mu\text{Ci}^{125}\text{I} \times \%I}{\mu\text{g insulina} \times 100}$$

En los marcajes realizados (n=10) la actividad específica arrojó un valor medio de $168'2 \pm 1'3$

$\mu\text{Ci}^{125}\text{I} / \mu\text{g insulina}$.

12.4. Preparación de la curva estándar

Se utilizó como tampón análisis el tampón veronal 0'1 M, pH 8'6, BSA 0'5%.

A partir de un "stock" de insulina análisis ($10^4 \mu\text{U/ml}$) se prepararon las siguientes concentraciones:

0'1 ml ($10.000 \mu\text{U/ml}$)	+ 3'9 ml	tampón veronal	...	250 $\mu\text{U/ml}$
2'0 ml ($250 \mu\text{U/ml}$)	+ 3'0 ml	" "	...	100 $\mu\text{U/ml}$
1'0 ml ($100 \mu\text{U/ml}$)	+ 0'33 ml	" "	...	75 $\mu\text{U/ml}$
1'0 ml ($100 \mu\text{U/ml}$)	+ 1'0 ml	" "	...	50 $\mu\text{U/ml}$
0'5 ml ($100 \mu\text{U/ml}$)	+ 1'5 ml	" "	...	25 $\mu\text{U/ml}$
0'2 ml ($100 \mu\text{U/ml}$)	+ 1'8 ml	" "	...	10 $\mu\text{U/ml}$
0'1 ml ($100 \mu\text{U/ml}$)	+ 1'9 ml	" "	...	5 $\mu\text{U/ml}$
0'1 ml ($100 \mu\text{U/ml}$)	+ 3'9 ml	" "	...	2'5 $\mu\text{U/ml}$

A partir del "stock" de anticuerpo diluido 1/100 se realizó una nueva dilución con tampón análisis hasta un título inicial de 1/40.000 y final de 1/160.000.

La insulina- ^{125}I que se utilizó se obtuvo diluyendo el "stock" de la marcada con tampón análisis, de modo que 0'1 ml equivalgan a 10.000 c.p.m. iniciales.

La curva estándar se preparó por triplicado. En el cero en lugar de insulina se puso tampón veronal.

La adición de reactivos se realizó a 4°C en el siguiente orden:

- 0'9 ml de tampón veronal
- 0'5 ml de insulina análisis
- 0'1 ml de insulina-¹²⁵I
- 0'5 ml de anticuerpo

Control curva:

- 1'4 ml de tampón veronal
- 0'5 ml de insulina estándar
- 0'1 ml de insulina-¹²⁵I

12.5. Valoración de la insulina en plasma de rata

En cada tubo de pipeteó:

- 1'2 ml de tampón veronal
- 0'2 ml de plasma
- 0'1 ml de insulina-¹²⁵I
- 0'5 ml de anticuerpo

12.6. Valoración de la insulina en el medio de perfusión y en el medio de incubación de los islotes

El esquema de preparación era el siguiente:

- 1'3 ml de tampón veronal
- 0'1 ml de muestra
- 0'1 ml de insulina-¹²⁵I
- 0'5 ml de anticuerpo

Se prepararon, además, tres tubos de actividad total que contenían sólo 0'1 ml de insulina-¹²⁵I.

Se incubaron todos los tubos a 4°C durante tres días. Tras este periodo se procedió a la separación de la insulina-¹²⁵I libre, de la insulina-¹²⁵I unida al anticuerpo según el método descrito a continuación.

12.7. Separación de las fracciones libre y ligada al anticuerpo

Se utilizó una suspensión de carbón activado al 5% y dextrano T-70 al 0'5% en tampón veronal 0'1M pH 8'6 sin albúmina. Esta suspensión se debe agitar durante al menos 15 min antes de su uso. La insulina libre penetra en los canalículos del carbón, mientras que la fracción ligada al anticuerpo no lo puede hacer debido a su gran tamaño. Se añadió 0'5 ml de esta suspensión a todos los tubos excepto a los de la actividad total.

Se dejaron en reposo durante 5 min y se centrifugaron a 3.000 r.p.m. durante 10 min. Se aspiraron al vacío los sobrenadantes y se midió la radioactividad de los precipitados en un contador gamma.

Se calculó el porcentaje de los valores con relación a la actividad total para obtener el porcentaje de la fracción no unida al anticuerpo(%F). El porcentaje de la fracción ligada será $(100-\%F)(\%B)$ Se corrigieron estos valores restándoles el porcentaje de B del control de adsorción inespecífica. Se representaron estos valores de porcentaje de B corregidos frente a las $\mu\text{U/ml}$ de

los puntos de la curva estándar (Fig.19). Se leyeron los valores de porcentaje de B de los problemas en esta curva, multiplicando por 2'5 los valores de las muestras de plasma y por 5 los valores de las incubaciones, ya que se tomaron 0'2 ml y 0'1 ml respectivamente frente a los 0'5 ml de la curva estándar.

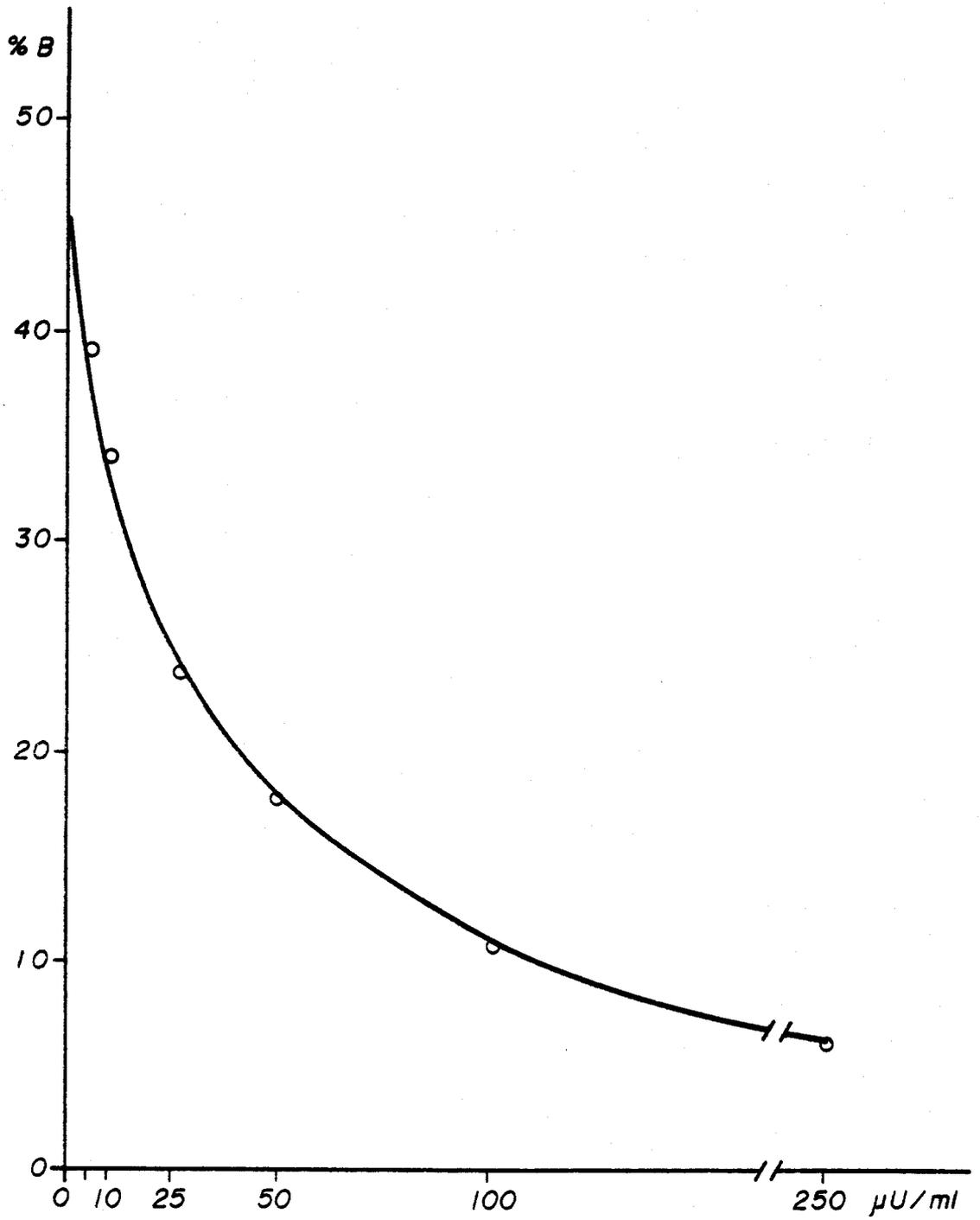


Fig. 19.- Curva estándar para la determinación de insulina.

13. PREPARACION DEL 2-BROMOESTEARATO

Se ha empleado la técnica descrita por KONDRUP (1979) que consiste en primer lugar en la saponificación de los ácidos grasos con OHK en caliente. Esta operación se llevó a cabo a 60-70°C durante 30 min.

Los jabones de los ácidos grasos así formados se acoplan a albúmina sérica bovina en una relación estequiométrica aproximada de 6 moles de albúmina por cada mol de ácido graso, ya que así se vehiculan los ácidos grasos en medios biológicos acuosos. El acoplamiento se realiza mediante una incubación a 45°C durante 45 min.

14. REACTIVOS Y APARATOS

14.1. Procedencia de los reactivos

De AMERSHAN^R procedían D-(U-¹⁴C)glucosa y ¹²⁵I.

La colagenasa tipo CLS IV procedía de WORTHINGTON Biochem. Corp. Freehold NJ, USA.

De BOEHRINGER^R, ATP y reactivos para determinación de glucosa.

La insulina porcina cristalina fue adquirida a NOVO^R.

Los siguientes reactivos fueron adquiridos a SIGMA^R: albúmina sérica bovina, amilogucosidasa, 2-Bromoestearato, carbón activado, dietil barbiturato sódico y Hepes.

De MERCK^R, cloramina T, metabisulfito sódico y glucosa.

De PHARMACIA FINE CHEMICALS^R, dextrano T-70.

De BIO RAD^R, reactivo de Bradford.

14.2. Relación de aparatos utilizados

Las homogeneizaciones se hicieron en un homogeneizador de vidrio Pobel o con un sonicador MSE, MK2.

Las centrifugaciones de muestras de volumen inferior a 1'5 ml se realizaron en una centrifuga de mesa BECKMAN modelo microfuge B.

Las pesadas se realizaron en una balanza SAUTER 414 o en una balanza de precisión SARTORIUS.

Las medidas de pH se efectuaron con aparato BECKMAN modelo 3500.

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro BECKMAN modelo 25.

Las incubaciones se realizaron en un baño termostaticado SELECTA modelo unitronic 320.

Los contajes de radioactividad se hicieron en contadores de centelleo líquido KONTRON modelo Betamatic y Gammamatic.

Los islotes se "pescaron" con un microscopio estereoscopio de 12-15 aumentos Wild, modelo M3.

Los filtros se lavaron en un lavador de filtros Millipore, sampling manifold 3025.

La infusión de sustancias en el páncreas se realizó con un infusor Sage Instrumens modelo 352.

La recogida de muestras en la perfusión del páncreas se efectuó con un colector de fracciones modelo 1200 PUP.

III.RESULTADOS

1. CARACTERISTICAS DE LOS ANIMALES: PESO Y CONSUMO DE ALIMENTO

El peso medio inicial de los animales controles fue de $224'3 \pm 2'3$ g; tras ser alimentados durante 10 días con una dieta estándar incrementaron su peso un 20'5%. El grupo alimentado con una dieta pobre en carbohidratos, durante el mismo periodo de tiempo, aumentó su peso un 28'9%. Por el contrario, cuando los animales fueron sometidos a una dieta glucosa su peso disminuyó de $229'1 \pm 4'9$ g a $189'1 \pm 4'3$ g, lo que supone una pérdida de peso del 17'4% (Tabla III, Fig. 20).

El contenido calórico de las diferentes dietas se calculó a partir de los valores de la combustión de CH (4 Kcal/g), lípidos (9 Kcal/g) y proteínas (4 Kcal/g). Aquel, ascendía a 3'2 Kcal/g en la dieta estándar, 3'8 Kcal/g en la dieta glucosa y 6'3 Kcal/g en la dieta pobre en carbohidratos.

En la tabla IV se especifican los valores del aporte calórico en Kcal/animal/día en los tres grupos estudiados. El grupo alimentado con una dieta glucosa ingerió un 41% menos que el grupo control, mientras que el sometido a una dieta pobre en carbohidratos consumió un 78% más que el grupo control (Fig.21).

TABLA III

CRECIMIENTO PONDERAL DE RATAS ALIMENTADAS CON DIFERENTES DIETAS

Dieta	Peso inicial(g)	Peso final(g)	Δ peso(g)	Δ peso(%)
Estándar	224'3 \pm 2'3	270'3 \pm 3'1	+46 \pm 1'4	+20'5 \pm 0'6
Glucosa	229'1 \pm 4'9	189'1 \pm 4'3	-40 \pm 1'9	-17'4 \pm 0'7
Pobre en CH	218'2 \pm 4'5	281'1 \pm 6'4	+63 \pm 4'4	+28'9 \pm 2'1

Los valores son $\bar{X} \pm$ ESM (n=12) de ratas alimentadas durante 10 días con diferentes dietas. La composición de las dietas se especifica en Material y Métodos.

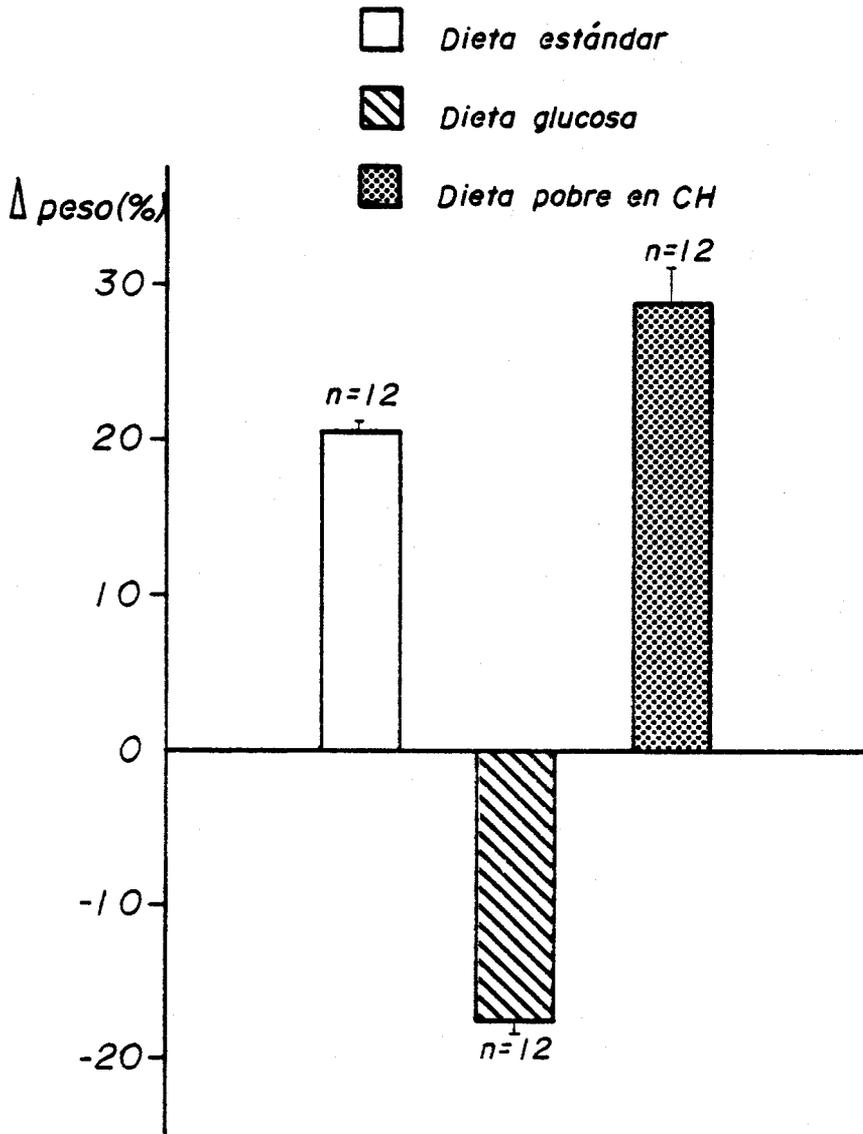


Fig. 20.- Variación del peso corporal de ratas alimentadas durante 10 días con diferentes dietas.

TABLA IV

INGESTA CALORICA DE RATAS ALIMENTADAS CON DIFERENTES DIETAS

Dieta	Kcal/animal/día
Estándar	68'3
Glucosa	40'2
Pobre en CH	122'1

Los valores son \bar{X} (n=12) de ratas alimentadas durante 10 días con diferentes dietas. La composición de las dietas se especifica en Material y Métodos.

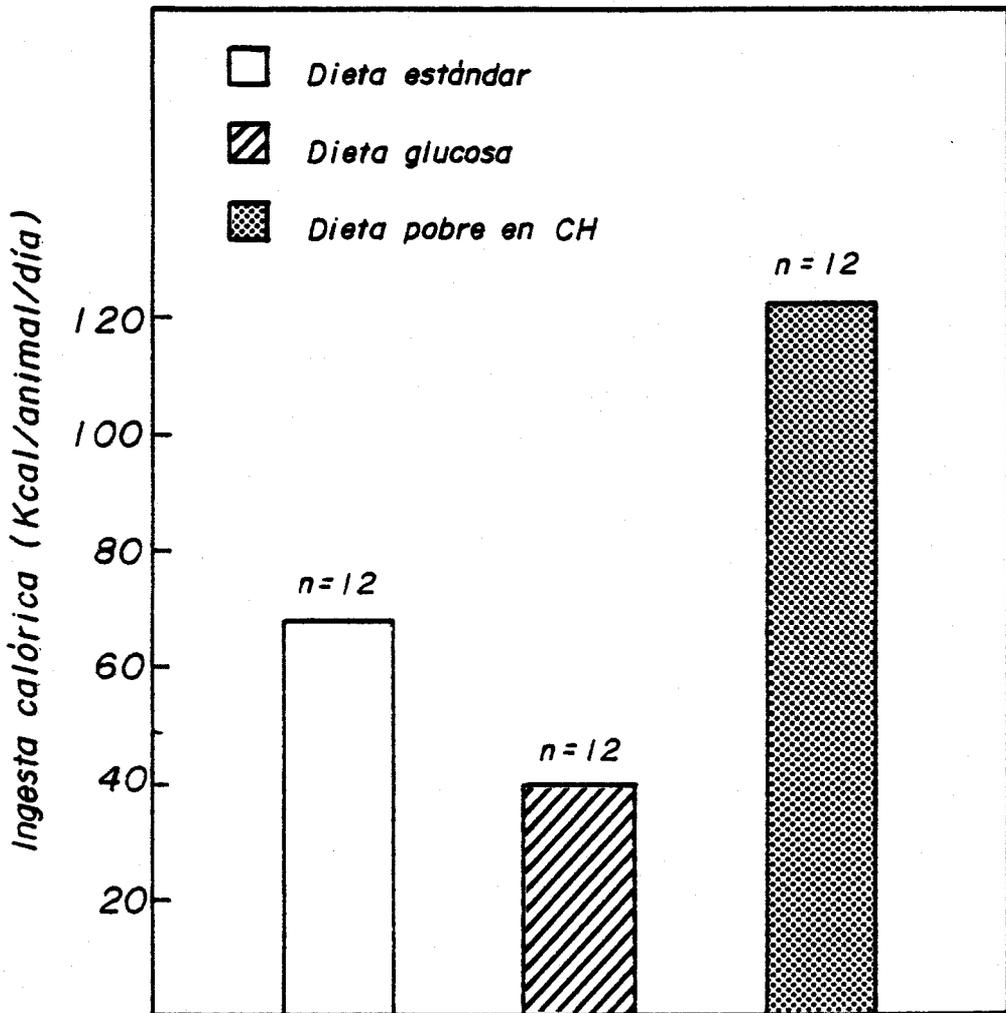


Fig. 21.- Consumo de alimento por ratas sometidas a diferentes dietas durante 10 días.

2. NIVELES PLASMATICOS DE DIVERSOS PARAMETROS BIOQUIMICOS DE RATAS ALIMENTADAS CON DIFERENTES DIETAS

2.1. Concentraciones de lípidos y de colesterol asociado a lipoproteínas en plasma

En el grupo de animales alimentados con una dieta glucosa los niveles plasmáticos de triglicéridos y de colesterol experimentaron un descenso importante ($22'6 \pm 1'4$ mg% y $30'4 \pm 1'4$ mg% respectivamente frente a $53'7 \pm 2'3$ mg% y $59'2 \pm 1'4$ mg% del grupo control). Por el contrario, en los animales sometidos a una dieta pobre en carbohidratos estos niveles no variaron (Tabla V, Fig. 22A y B). En la fig. 22 C,D,E, se muestran los niveles plasmáticos de colesterol asociado a lipoproteínas. Tanto las HDL-colesterol, como las LDL-colesterol y las VLDL-colesterol disminuyeron significativamente en el grupo alimentado con una dieta glucosa frente a los controles ($p < 0'0005$). En el grupo alimentado con una dieta pobre en carbohidratos, estos valores no se modificaron con respecto a los valores controles (Tabla V).

2.2. Niveles plasmáticos de proteínas totales, albúmina, nitrógeno ureico, ácido úrico y creatinina

Las proteínas totales experimentaron un descenso significativo en el grupo alimentado con una dieta glucosa ($p < 0'0005$), no variaron con respecto a las controles en

el otro grupo estudiado (Tabla VI , Fig. 23 A).

Los niveles de albúmina encontrados en el grupo control fueron de $3'05 \pm 0'04$ g%. En las ratas alimentadas con una dieta glucosa estos niveles disminuyeron ($2'61 \pm 0'07$, $p < 0'0005$), mientras que en las sometidas a una dieta pobre en carbohidratos aumentaron ligeramente ($3'19 \pm 0'04$), siendo este aumento estadísticamente significativo ($p < 0'01$) (Tabla VI , Fig.23 B).

Los valores del nitrógeno ureico (BUN) no se modificaron en los animales alimentados con una dieta pobre en carbohidratos, en cambio en los sometidos a una dieta glucosa estos valores sufrieron un descenso importante ($p < 0'0005$) (Tabla VI , Fig.23 C).

Los niveles plasmáticos de ácido úrico no se modificaron significativamente en los tres grupo estudiados (Tabla VI , Fig.23 D).

Se estudiaron también los niveles plasmáticos de creatinina y se observó un aumento significativo en los grupos alimentados con dieta glucosa ($p < 0'0025$) y con dieta pobre en carbohidratos ($p < 0'0025$) frente al grupo control (Tabla VI , Fig. 23 E).

2.3. Concentraciones plasmáticas de algunos iones

Los niveles plasmáticos de sodio y potasio experimentaron una disminución significativa frente al control en

el grupo sometido a una dieta glucosa ($p < 0'0025$ y $p < 0'005$ respectivamente); en cambio, no se modificaron en el otro grupo estudiado (Tabla VII, Fig. 24 A y B respectivamente).

Los valores hallados en la determinación de cloro iónico sufrieron un ligero ascenso en las ratas alimentadas con dieta glucosa ($p < 0'0025$) (Tabla VII, Fig. 24 C).

El nivel plasmático del calcio iónico experimentó un ligero descenso en los grupos estudiados frente al control (Tabla VII, Fig. 24 D).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles plasmáticos de fósforo inorgánico entre el grupo control y el grupo sometido a una dieta glucosa. Sin embargo, hubo un ligero ascenso en el otro grupo estudiado ($p < 0'05$) (Tabla VII, Fig. 24 E).

TABLA V

EFFECTO DE LA DIETA SOBRE LOS NIVELES PLASMATICOS DE TRIGLICERIDOS, COLESTEROL TOTAL Y COLESTEROL ASOCIADO A LIPOPROTEINAS.

Dieta	Triglicéridos	Colesterol total	VLDL-colesterol	LDL-colesterol	HDL-colesterol
Estándar	53'7 ± 2'3 (n=10)	59'2 ± 1'4 (n=10)	10'5 ± 0'6 (n=10)	18'1 ± 1'4 (n=10)	31'2 ± 1'1 (n=10)
Glucosa	22'6 ± 1'4 ^a (n=7)	30'4 ± 1'4 ^a (n=7)	5'0 ± 0'5 ^a (n=7)	10'8 ± 0'7 ^a (n=7)	10'7 ± 0'9 ^a (n=7)
Pobre en CH	47'9 ± 3'0 ^b (n=9)	54'9 ± 2'5 ^b (n=10)	9'5 ± 0'6 ^b (n=9)	13'4 ± 3'2 ^b (n=7)	34'3 ± 2'7 ^b (n=10)

Los resultados se expresan en mg% como $\bar{X} \pm \text{ESM}$. El número de animales figura entre paréntesis. Los animales fueron alimentados durante 10 días con diferentes dieta. La composición de las dietas se especifica en Material y Métodos. ^a Diferencias estadísticamente significativas con su correspondiente valor de la dieta estándar (control) ($p < 0'0005$), ^b N.S.

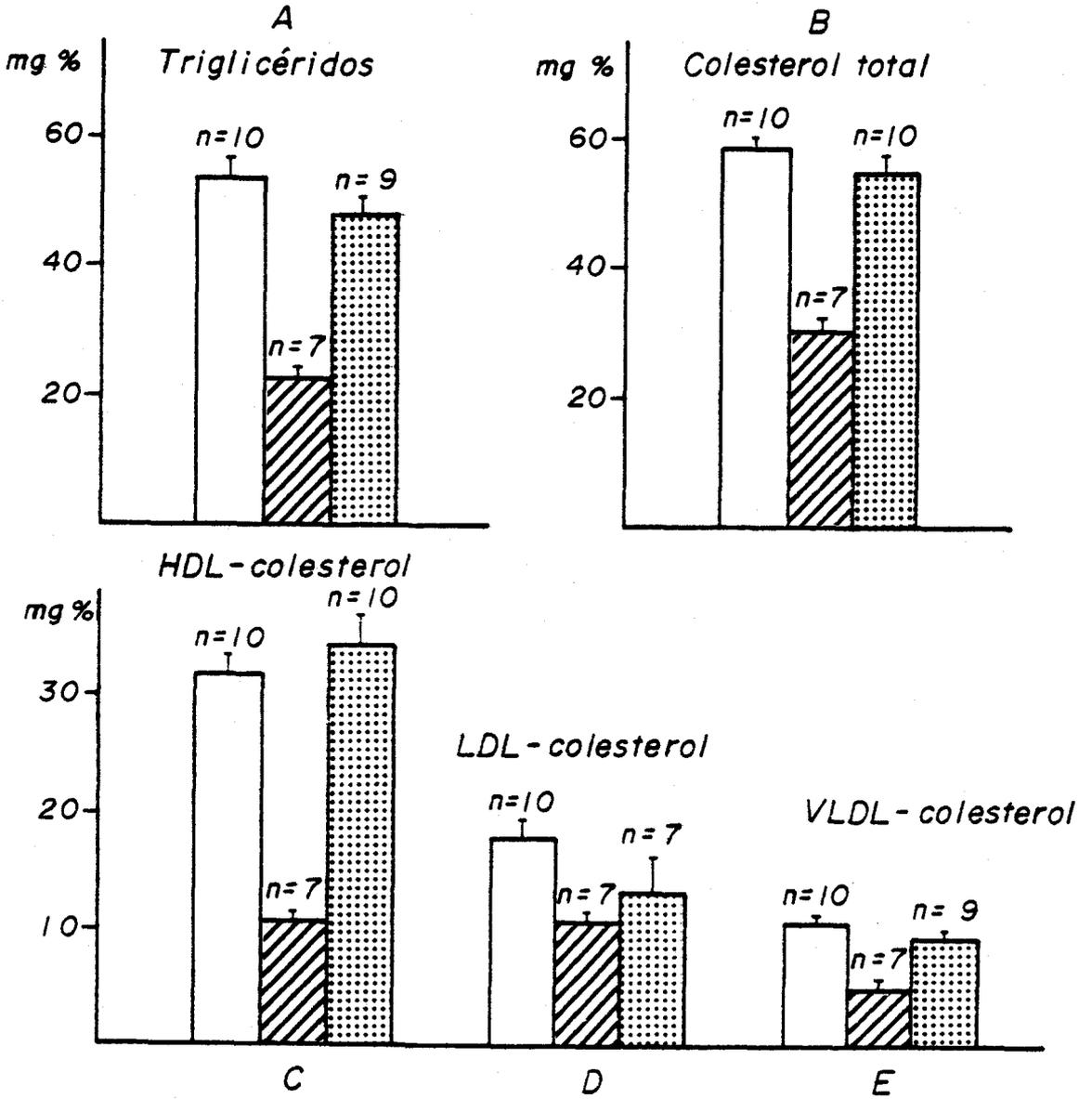


Fig. 22.- Efecto de la dieta sobre los niveles plasmáticos de triglicéridos (A), colesterol total(B) y colesterol asociado a lipoproteínas (C,D y E).

- Dieta estándar
- ▨ Dieta glucosa
- ▤ Dieta pobre en carbohidratos

TABLA VI

EFEECTO DE LA DIETA SOBRE LOS NIVELES PLASMATICOS DE PROTEINAS TOTALES, ALBUMINA, BUN, ACIDO URICO Y CREATININA.

Dieta	Prot. totales (g%)	Albúmina (g%)	Nitrógeno ureico (mg%)	Ac. úrico (mg%)	Creatinina (mg%)
Estándar	5'74 ± 0'13 (n=9)	3'05 ± 0'04 (n=9)	21'67 ± 1'01 (n=9)	1'08 ± 0'09 (n=10)	0'51 ± 0'04 (n=9)
Glucosa	4'63 ± 0'15 ^c (n=7)	2'61 ± 0'07 ^c (n=7)	6'57 ± 0'46 ^c (n=7)	0'97 ± 0'07 ^d (n=7)	0'66 ± 0'02 ^b (n=7)
Pobre en CH	5'74 ± 0'41 ^d (n=10)	3'19 ± 0'04 ^a (n=10)	23'80 ± 0'83 ^d (n=10)	1'25 ± 0'13 ^d (n=10)	0'71 ± 0'04 ^b (n=10)

Los valores son $\bar{X} \pm$ ESM. El número de animales figura entre paréntesis. Los animales fueron alimentados durante 10 días con diferentes dietas. La composición de las dietas se especifica en Material y Métodos. ^{a,b,c} Diferencias estadísticamente significativas con su correspondiente valor de la dieta estándar (control), a: $p < 0'01$, b: $p < 0'0025$, c: $p < 0'0005$, ^d N.S.

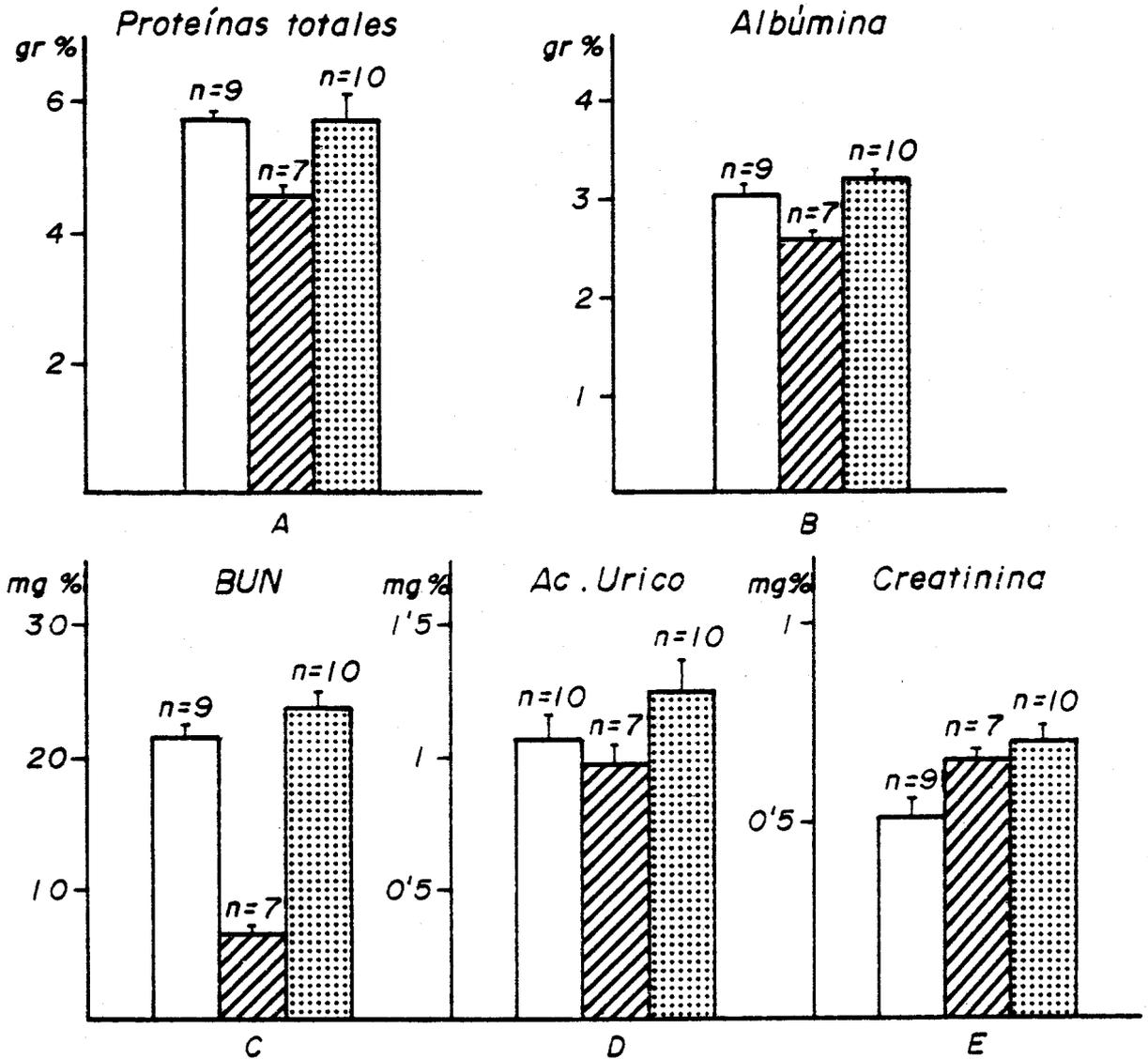


Fig. 23.- Efecto de la dieta sobre los niveles plasmáticos de proteínas totales (A), albúmina (B), BUN (C), ácido úrico (D) y creatinina (E).

- Dieta estándar
- ▨ Dieta glucosa
- ▩ Dieta pobre en carbohidratos

TABLA VII

EFFECTO DE LA DIETA SOBRE LOS NIVELES PLASMATICOS DE Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} y Pi

Dieta	Na^+ (mEq/l)	K^+ (mEq/l)	Cl^- (mEq/l)	Ca^{2+} (mg%)	Pi (mg%)
Estándar	138'8 \pm 1'0 (n=9)	3'8 \pm 0'2 (n=9)	95'2 \pm 0'51 (n=10)	9'7 \pm 0'2 (n=9)	7'9 \pm 0'5 (n=10)
Glucosa	132'6 \pm 1'6 ^d (n=7)	3'1 \pm 0'1 ^c (n=7)	98'1 \pm 1'1 ^b (n=7)	8'8 \pm 0'2 ^c (n=6)	7'4 \pm 0'3 ^e (n=6)
Pobre en CH	139'2 \pm 1'8 ^e (n=10)	3'3 \pm 0'6 ^e (n=5)	97'3 \pm 0'3 ^d (n=10)	8'5 \pm 0'4 ^b (n=10)	9'5 \pm 0'7 ^a (n=10)

Los valores son $\bar{X} \pm$ ESM. El número de animales figura entre paréntesis. Los animales fueron alimentados durante 10 días con diferentes dietas. La composición de las dietas se especifica en Material y Métodos. ^{a,b,c,d} Diferencias estadísticamente significativas con su correspondiente valor de la dieta estándar (control). a: $p < 0'05$, b: $p < 0'01$, c: $p < 0'005$, d: $p < 0'0025$, ^e N.S.

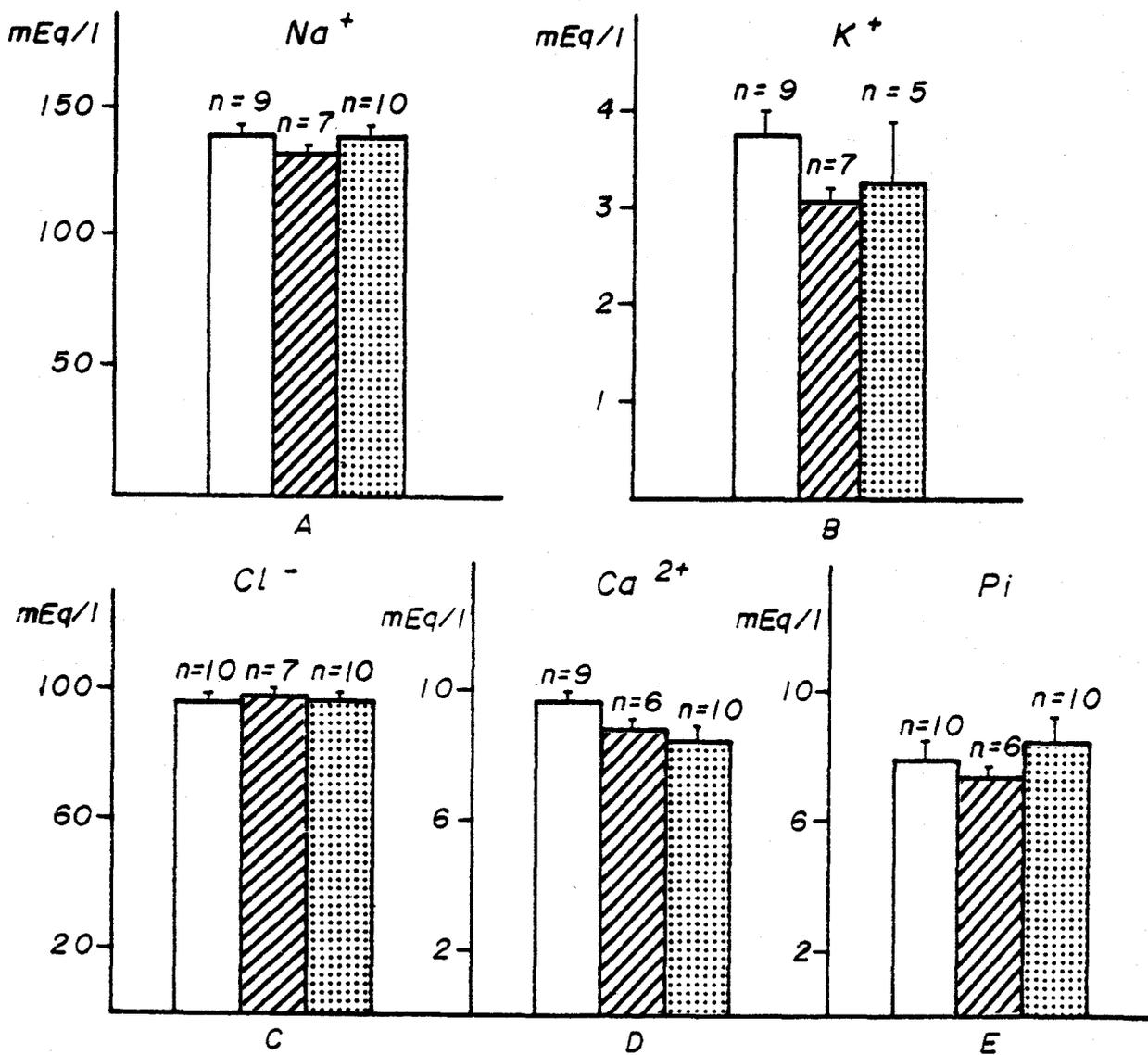


Fig. 24.- Efecto de la dieta sobre los niveles plasmáticos de sodio (A), potasio (B), cloro (C), calcio (D) y fósforo inorgánico (E).

- Dieta estándar
- ▨ Dieta glucosa
- ▩ Dieta pobre en carbohidratos

3. TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA

3.1. Niveles plasmáticos de glucosa tras una sobrecarga i.v. de glucosa en ratas alimentadas con diferentes dietas

En la Fig. 25 se muestran los niveles plasmáticos de glucosa tras una sobrecarga i.v. de glucosa en ratas alimentadas con una dieta estándar, una dieta glucosa y una dieta pobre en carbohidratos (Tabla VIII).

En el grupo alimentado con una dieta estándar (grupo control), la inyección i.v. de glucosa (0'5 g/Kg de peso del animal) elevó significativamente los niveles de glucosa en plasma, alcanzándose un valor máximo en el minuto cinco. A continuación, los niveles descendieron paulatinamente, tendiendo a alcanzar el valor inicial en el minuto treinta.

En los animales alimentados con una dieta glucosa, la glucemia a los 0 minutos fue significativamente menor que la obtenida en las ratas alimentadas con una dieta estándar ($p < 0'0005$). La inyección i.v. de glucosa (0'5 g/Kg peso) produjo, también, un incremento en los niveles plasmáticos de glucosa que asimismo, fue máximo en el minuto cinco. A continuación, los niveles de glucemia disminuyeron más rápidamente que en el grupo control, alcanzándose el nivel inicial a los 60 min de la sobrecarga.

Los niveles de glucemia antes de la sobrecarga en las ratas alimentadas con una dieta pobre en carbohidratos fueron superiores a los valores controles. Tras la inyección i.v. de glucosa (0'5 g/Kg peso) se elevaron los niveles plasmáticos de glucosa, siendo esta elevación significativamente mayor que la del experimento control en todos los tiempos estudiados (5 min $p < 0'025$, 15 min $p < 0'0005$, 30 min $p < 0'0005$ y 60 min $p < 0'0025$). Asimismo, en el minuto cinco se obtuvo un valor máximo de glucemia, tendiendo a continuación a alcanzar lentamente los valores iniciales.

El coeficiente de asimilación de la glucosa (K), calculado según el método de CONARD (1953), fue ligeramente mayor en la dieta glucosa ($1'6 \times 10^{-2}$) que en los controles ($1'4 \times 10^{-2}$), por el contrario en la dieta pobre en CH fue dos veces inferior ($0'7 \times 10^{-2}$) (Figs.26 y 27).

TABLA VIII

NIVELES PLASMATICOS DE GLUCOSA TRAS UNA SOBRECARGA i.v. DE GLUCOSA EN RATAS ALIMENTADAS CON DIFERENTES DIETAS

Dieta	0 min	5 min	15 min	30 min	60 min
Estándar	116'1 \pm 4'2 (n=11)	281'6 \pm 12'6 (n=11)	200'0 \pm 4'8 (n=11)	124'2 \pm 4'9 (n=10)	120'5 \pm 4'4 (n=10)
Glucosa	92'1 \pm 4'8 ^d (n=11)	292'7 \pm 5'4 ^e (n=11)	168'0 \pm 5'0 ^d (n=10)	113'2 \pm 5'4 ^e (n=10)	104'4 \pm 2'7 ^c (n=11)
Pobre en CH	146'7 \pm 8'9 ^c (n=9)	317'5 \pm 7'4 ^b (n=9)	255'7 \pm 8'0 ^d (n=9)	210'4 \pm 12'3 ^d (n=9)	161'7 \pm 11'6 ^c (n=8)

Los resultados se expresan en mg% como $\bar{X} \pm$ ESM. El número de animales figura entre paréntesis. Los animales fueron alimentados durante 10 días con diferentes dietas. La composición de las dietas se especifica en Material y Métodos. ^{a,b,c,d} Diferencias estadísticamente significativas con su correspondiente valor de la dieta estándar (controles), a: $p < 0'05$, b: $p < 0'025$, c: $p < 0'0025$, d: $p < 0'0005$, ^e N.S.

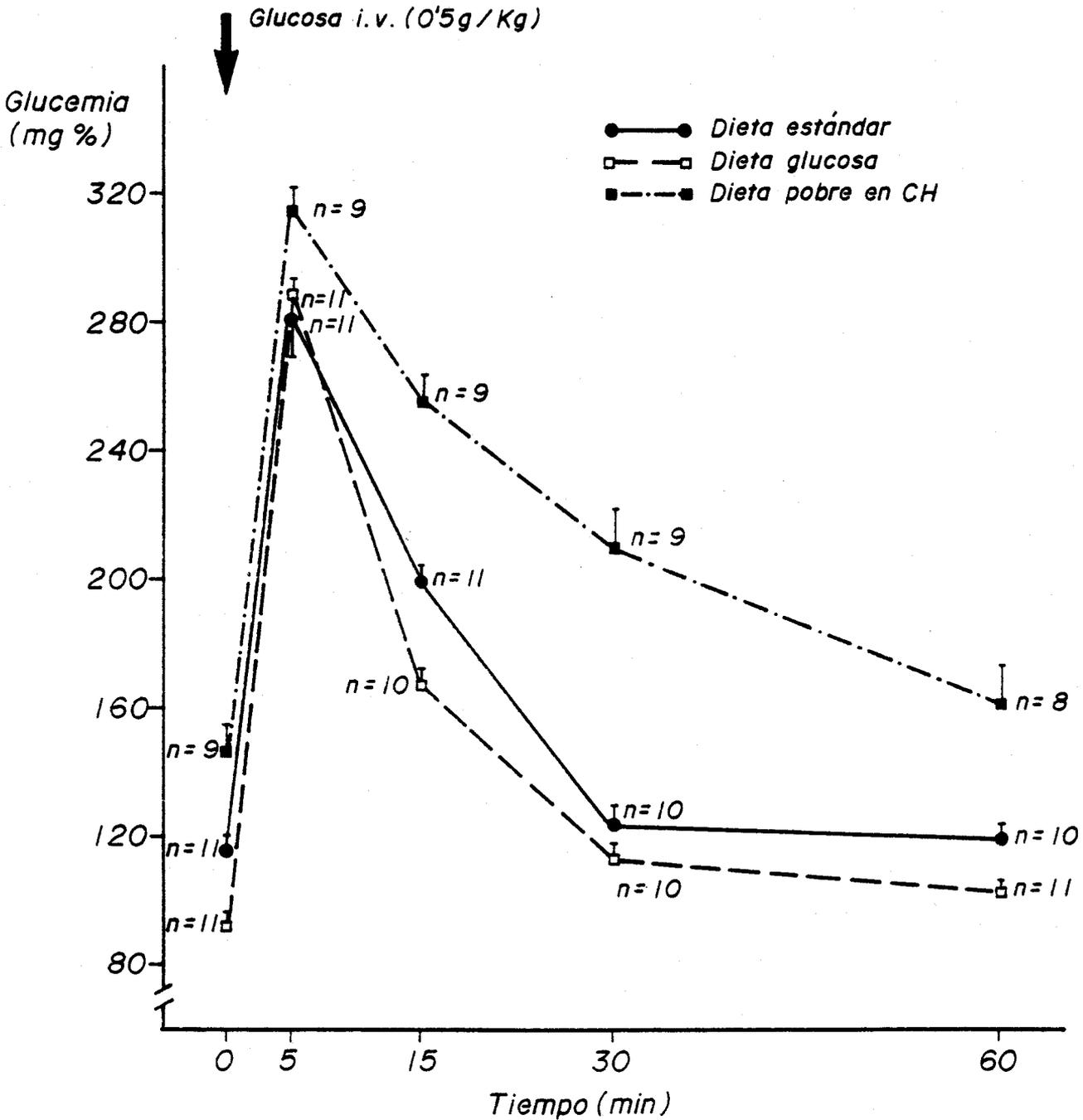


Fig. 25.- Efecto de la dieta sobre los niveles de glucosa en plasma tras una sobrecarga intravenosa de glucosa.

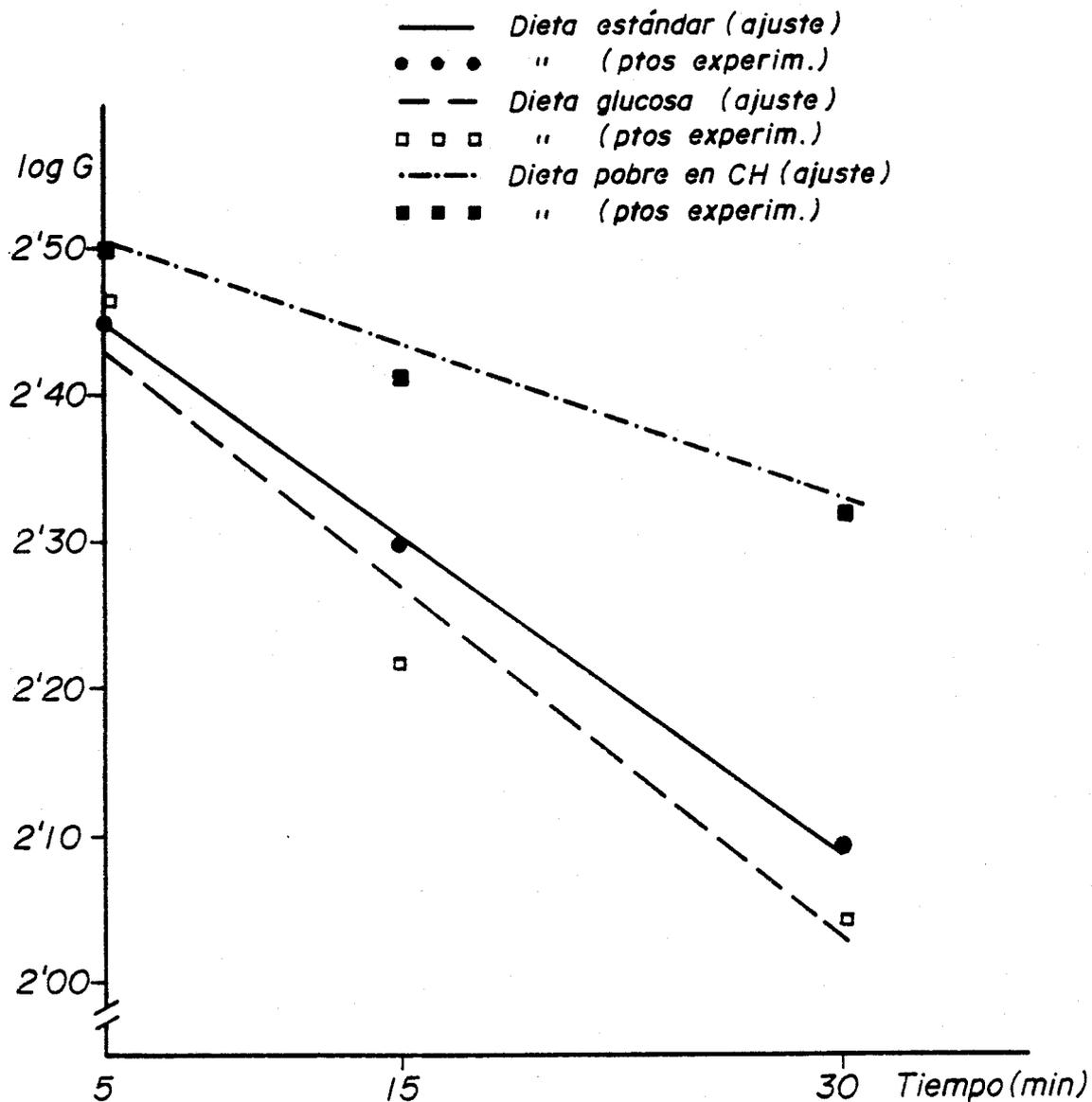


Fig. 26.- Rectas semilogarítmicas representativas del descenso glucémico tras una sobrecarga i.v. de glucosa (0'5 g/Kg) (método de Conard).
 Dieta estándar: $r=0'9998$, $K=1'44 \times 10^{-2}$
 Dieta glucosa: $r=0'9774$, $K=1'60 \times 10^{-2}$
 Dieta pobre en CH: $r=0'9820$, $K=0'70 \times 10^{-2}$

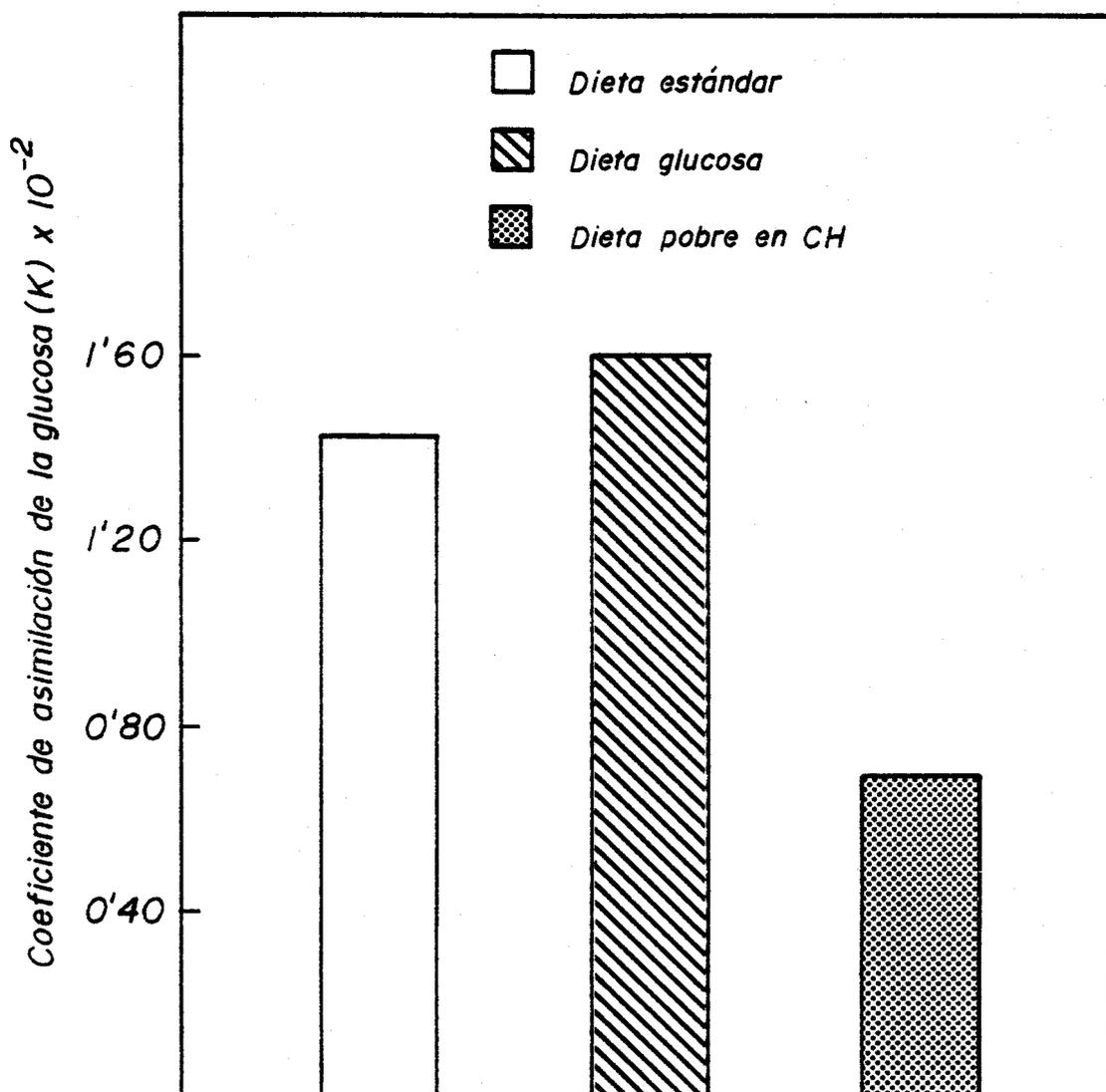


Fig. 27.- Coeficiente de asimilación de la glucosa (K) en animales sometidos a diferentes dietas (método de Conard).

3.2. Niveles plasmáticos de insulina tras una sobrecarga i.v. de glucosa en ratas alimentadas con diferentes dietas

En la Fig. 28 se muestran los niveles plasmáticos de insulina tras una sobrecarga i.v. de glucosa en ratas alimentadas con una dieta estándar, una dieta glucosa y una dieta pobre en carbohidratos (Tabla IX).

La inyección i.v. de glucosa (0'5 g/Kg peso del animal) en los animales alimentados con una dieta estándar (grupo control), produjo una elevación significativa del nivel de insulina en plasma. Este aumento fue máximo en el minuto 5. A partir de ese momento, hubo un descenso gradual de la insulinemia recuperándose el valor inicial en el minuto 30.

La inyección i.v. de glucosa en los animales alimentados con una dieta glucosa, también produjo un aumento significativo de la concentración plasmática de insulina, que se mantuvo hasta el minuto 30, donde se alcanzó la insulinemia inicial. Tanto el nivel inicial como los niveles plasmáticos de insulina tras la sobrecarga fueron muy inferiores a los obtenidos en el grupo control ($p < 0'0005$ en todos los tiempos).

En el grupo de animales alimentados con una dieta pobre en carbohidratos, los niveles de insulina en plasma tras la administración de glucosa disminuyeron más lentamente que en el grupo control (15 min $p < 0'05$, 30 min $p < 0'0005$), alcanzándose el valor inicial a los 60 minutos.

TABLA IX

NIVELES PLASMATICOS DE INSULINA TRAS UNA SOBRECARGA i.v. DE GLUCOSA EN RATAS ALIMENTADAS CON DIFERENTES DIETAS.

Dieta	0 min	5 min	15 min	30 min	60 min
Estándar	25'1 \pm 3'4 (n=13)	122'1 \pm 12'3 (n=13)	81'7 \pm 7'2 (n=10)	36'7 \pm 4'7 (n=11)	33'1 \pm 3'3 (n=7)
Glucosa	2'9 \pm 0'4 ^b (n=10)	50'9 \pm 3'8 ^b (n=11)	20'4 \pm 2'7 ^b (n=14)	5'4 \pm 0'8 ^b (n=6)	7'8 \pm 0'8 ^b (n=8)
Pobre en CH	34'5 \pm 3'6 ^a (n=11)	140'9 \pm 8'9 ^c (n=11)	100'9 \pm 8'1 ^a (n=9)	77'7 \pm 8'4 ^b (n=8)	32'0 \pm 3'1 ^c (n=4)

Los resultados se expresan en $\mu\text{U/ml}$ como $\bar{X} \pm \text{ESM}$. El número de animales figura entre paréntesis. Los animales fueron alimentados durante 10 días con diferentes dietas. La composición de las dietas se especifica en Material y Métodos. ^{a, b} Diferencias estadísticamente significativas con su correspondiente valor de la dieta estándar (controles), a: $p < 0'05$, b: $p < 0'0005$, ^c N.S.

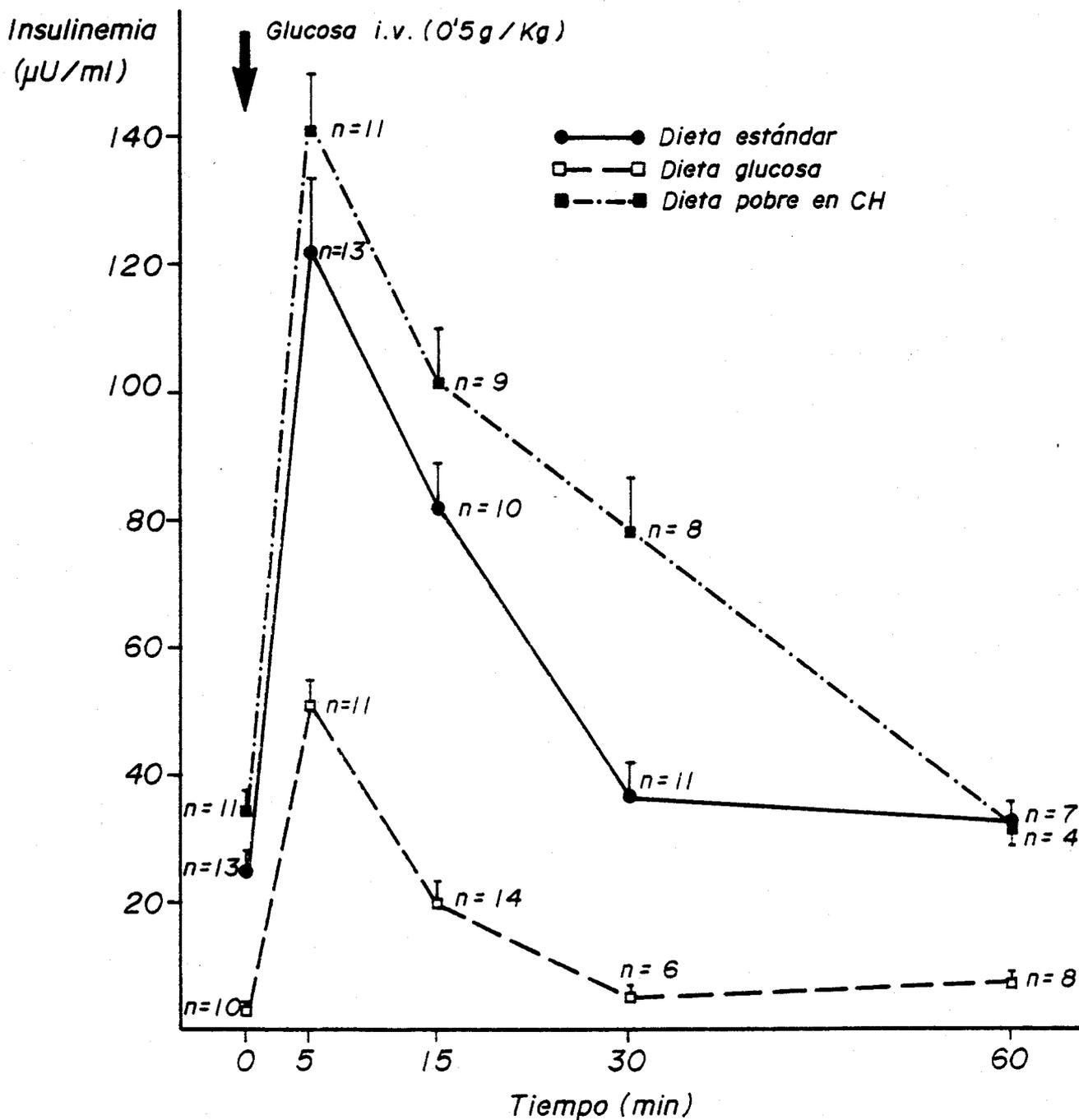


Fig. 28.- Efecto de la dieta sobre los niveles de insulina en plasma tras una sobrecarga i.v. de glucosa.

4. CONTENIDO DE GLUCOGENO EN HIGADO DE RATAS ALIMENTADAS
CON DIETA ESTANDAR, DIETA GLUCOSA Y DIETA POBRE EN CARBO-
HIDRATOS

En la Fig. 29 se observa que la acumulación de glucógeno hepático en ratas sometidas a una dieta glucosa fue aproximadamente tres veces superior a la de los controles. Por el contrario, en el grupo alimentado con una dieta pobre en carbohidratos el contenido de glucógeno disminuyó aproximadamente $1/3$ con respecto al grupo control (Tabla X).

TABLA X

CONTENIDO DE GLUCOGENO HEPATICO EN RATAS ALIMENTADAS CON
DIETA ESTANDAR, DIETA GLUCOSA Y DIETA POBRE EN CARBOHI-
DRATOS

Dieta	Contenido de glucógeno (g/100 g tejido)
Estándar	3'48 \pm 0'14 (n=9)
Glucosa	8'93 \pm 0'34 ^a (n=6)
Pobre en CH	1'02 \pm 0'05 ^a (n=6)

Los resultados se expresan en g/100 g tejido como $\bar{X} \pm$ ESM. El número de animales figura entre paréntesis. Los animales fueron alimentados durante 10 días con diferentes dietas. La composición de las dietas se especifica en Material y Métodos. ^a Diferencias estadísticamente significativas con su correspondiente valor de la dieta estándar (control) $p < 0'0005$.

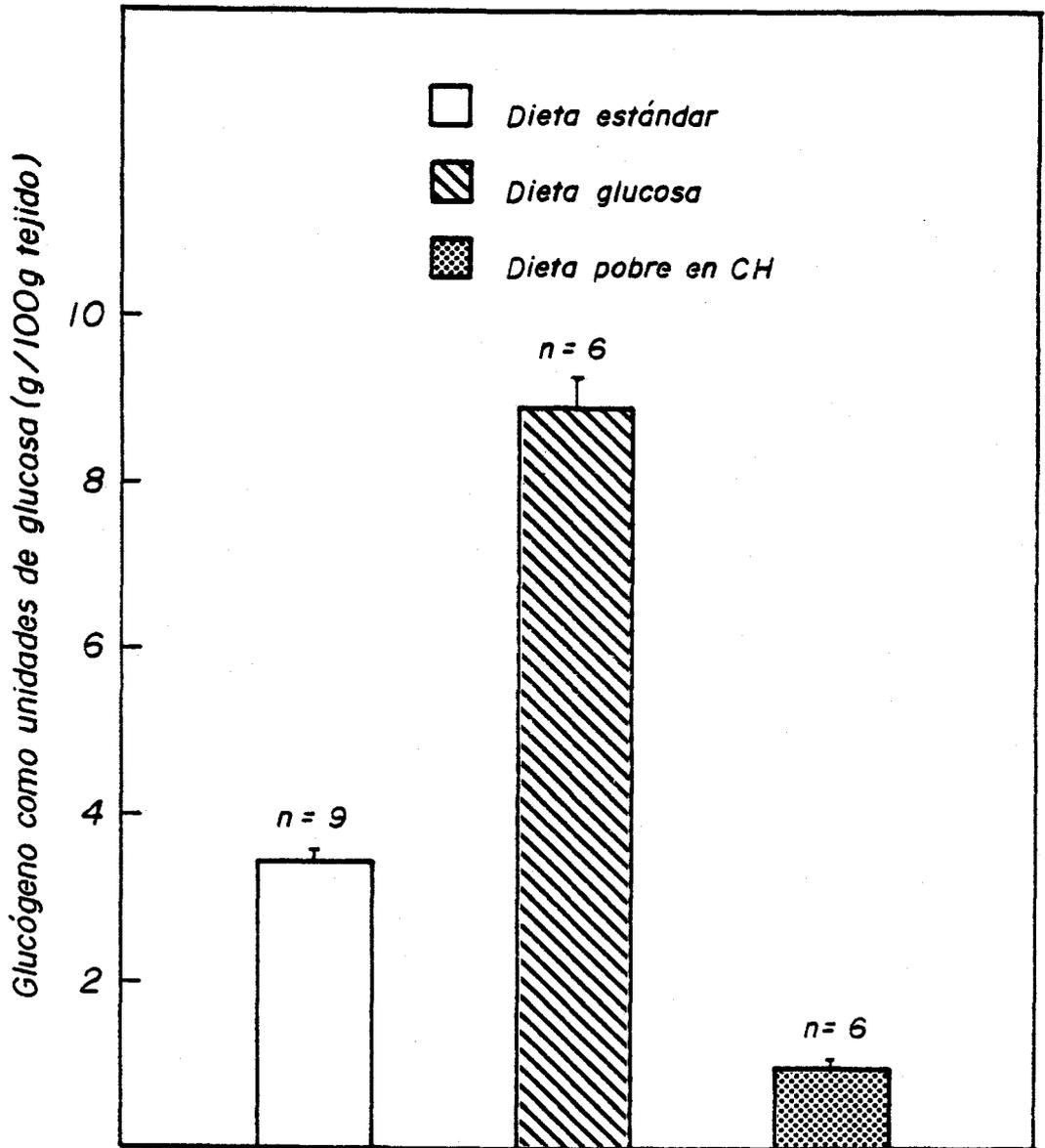


Fig. 29.- Contenido del glucógeno hepático de ratas alimentadas durante 10 días con diferentes dietas.

5. CONTENIDO DE INSULINA DEL PANCREAS Y DE LOS ISLOTES
DE LANGERHANS EN RATAS ALIMENTADAS CON DIFERENTES DIETAS

En las fig. 30 y 31, se observa que la dieta glucosa y la dieta pobre en carbohidratos no modificaron significativamente el contenido de insulina del páncreas, ni de los islotes pancreáticos aislados con respecto al grupo alimentado con una dieta estándar (tabla XI).

TABLA XI

EFECTO DE LA DIETA SOBRE EL CONTENIDO DE INSULINA

Dieta	Páncreas entero ($\mu\text{U}/\text{mg}$ tejido húmedo)	Islotes aislados ($\mu\text{U}/\text{islote}$)
Estándar	1936 \pm 50 (n=5)	1050 \pm 52 (n=30)
Glucosa	2012 \pm 99 (n=5)	1010 \pm 51 (n=35)
Pobre en CH	1970 \pm 150 (n=5)	970 \pm 42 (n=29)

Los resultados se expresan como $\bar{X} \pm$ ESM. El número de animales y determinaciones figuran entre paréntesis para páncreas entero e islotes aislados respectivamente. Los animales fueron alimentados durante 10 días con diferentes dietas. La composición de las dietas se especifica en Material y Métodos.

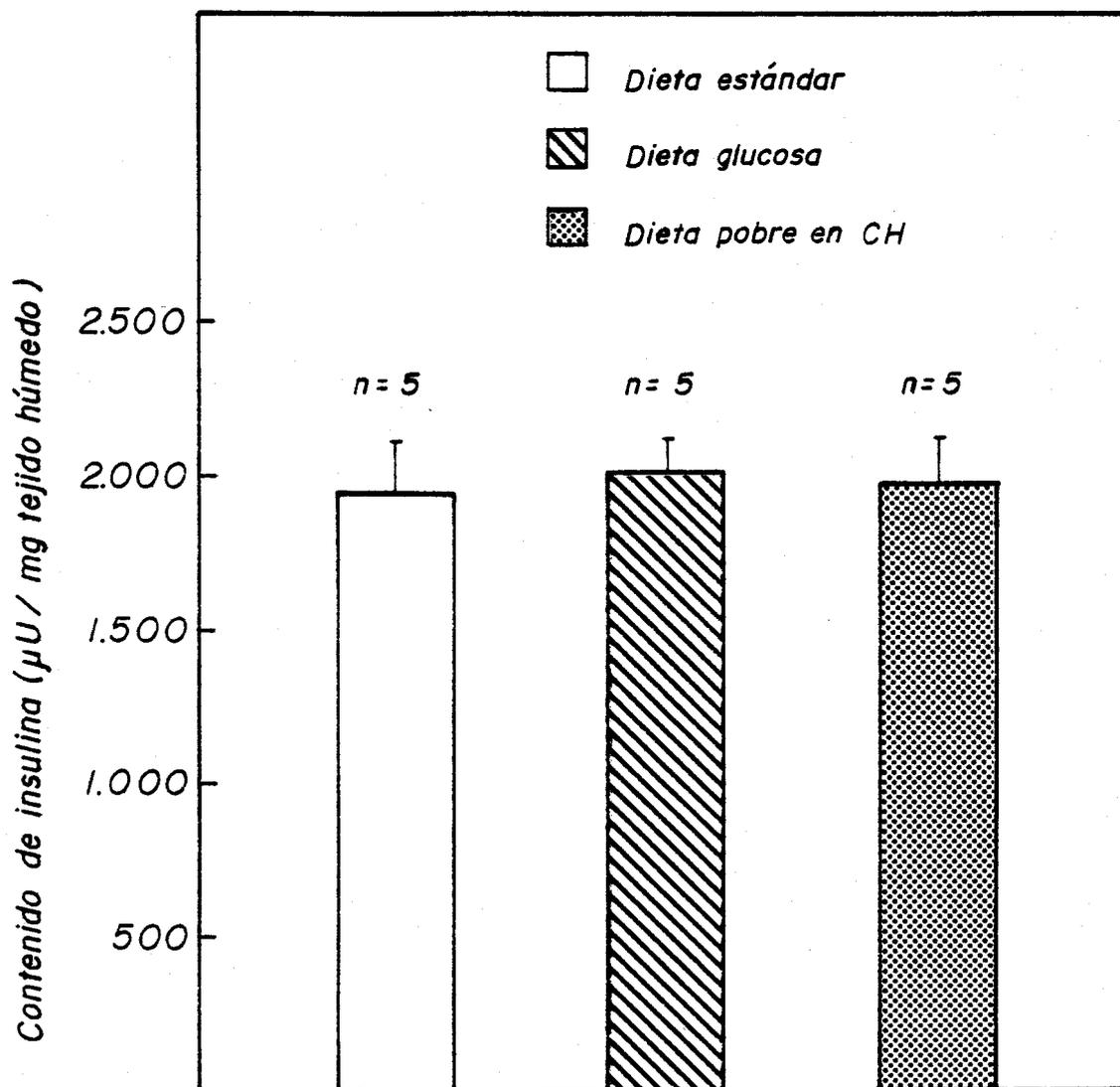


Fig. 30.- Contenido de insulina de páncreas procedentes de ratas alimentadas durante 10 días con diferentes dietas.

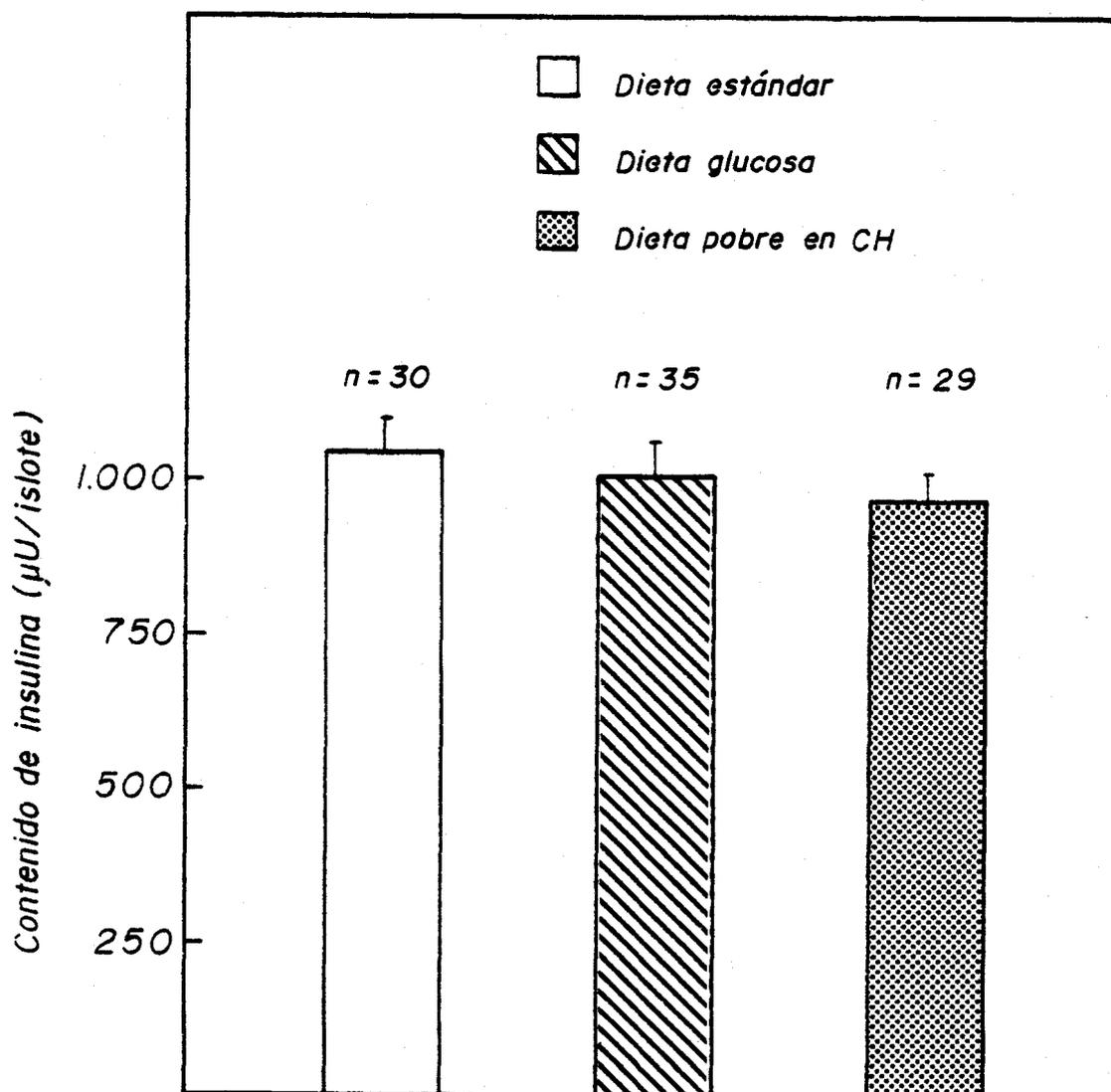


Fig. 31.- Contenido de insulina de islotes aislados de ratas alimentadas durante 10 días con diferentes dietas

6. SECRECIÓN DE INSULINA INDUCIDA POR GLUCOSA EN PANCREAS AISLADO Y PERFUNDIDO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETA ESTANDAR, DIETA GLUCOSA Y DIETA POBRE EN CARBOHIDRATOS

En la Fig. 32 se muestra la secreción de insulina inducida por glucosa (2'75 mM y 16'7 mM) en páncreas aislado y perfundido de ratas sometidas a diferentes dietas.

La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 20 min de duración con glucosa 2'75 mM y un segundo periodo de 40 min con glucosa 16'7 mM. Al final de la perfusión se infundió adrenalina.

A concentración de glucosa 2'75 mM, la secreción basal de insulina no varió apreciablemente en los tres grupos estudiados. Al pasar de glucosa 2'75 mM a glucosa 16'7 mM, la secreción de insulina aumentó más lentamente en el grupo alimentado con glucosa que en el grupo control, alcanzando un valor máximo de aproximadamente 200 μ U/min.

En las ratas sometidas a una dieta pobre en carbohidratos, la secreción de insulina aumentó rápidamente al pasar de glucosa basal a glucosa 16'7 mM alcanzando unas 450 μ U/min, a los 30 min de iniciada la perfusión. A continuación, la secreción de insulina disminuyó notablemente, experimentando después un aumento progresivo hasta alcanzar un máximo de secreción de aproximadamente 500 μ U/min.

La infusión de adrenalina provocó un descenso rápido de la secreción de insulina en los tres grupos estudiados.

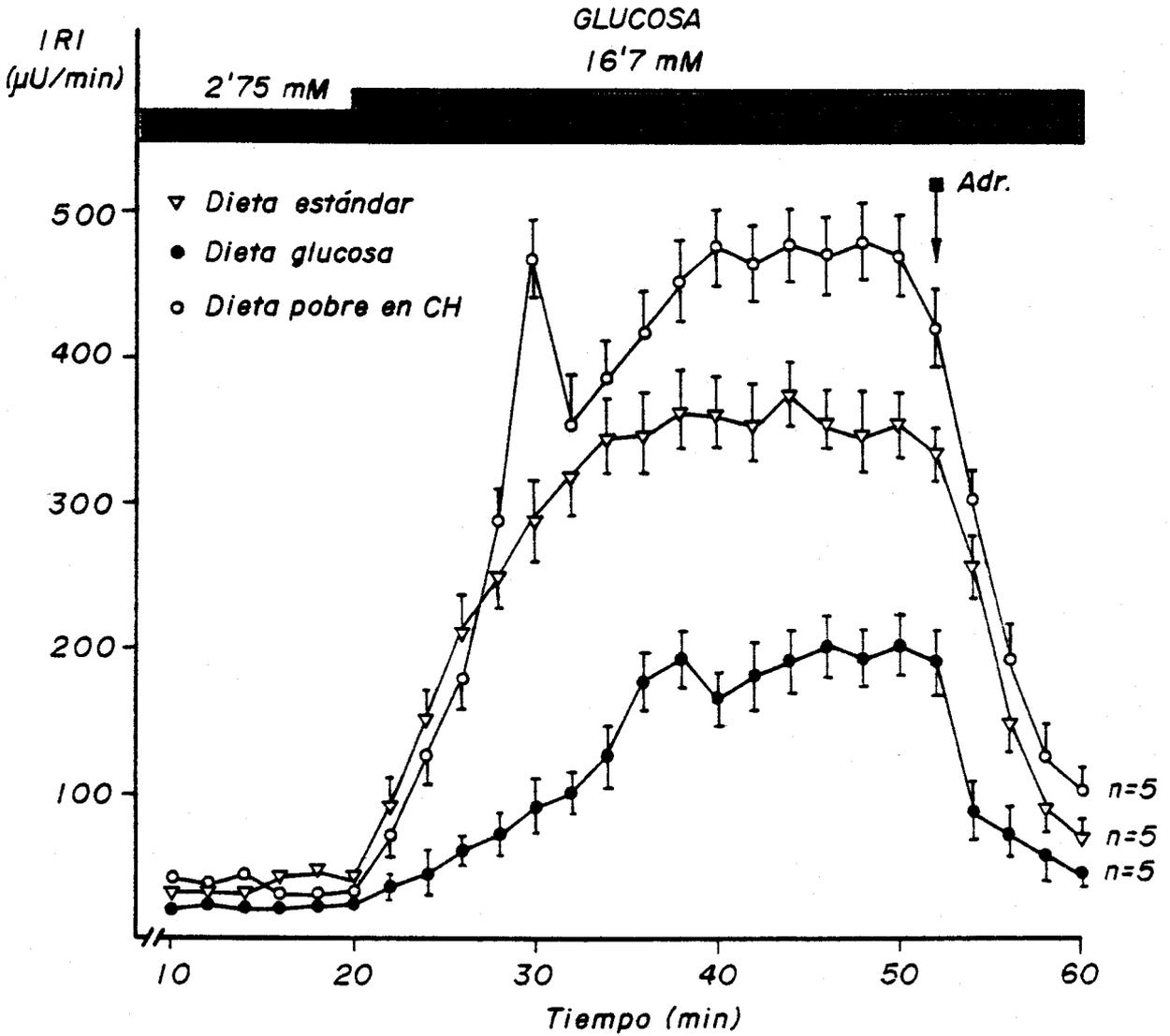


Fig. 32.- Efecto de la glucosa sobre la secreción de insulina en páncreas aislado y perfundido de ratas alimentadas durante 10 días con diferentes dietas.

7. SECRECIÓN DE INSULINA INDUCIDA POR GLUCOSA EN ISLOTES DE LANGERHANS PROCEDENTES DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETA ESTANDAR, DIETA GLUCOSA Y DIETA POBRE EN CARBOHIDRATOS

Los islotes de Langerhans fueron aislados e incubados en KRB pH 7'4, BSA 0'5%, trasylol 250 U/ml, a dos concentraciones de glucosa: 2'75 mM y 16'7 mM durante 30 min a 37°C. Transcurrido este tiempo se extrajo una alícuota del medio de incubación que se almacenó a -20°C hasta su posterior determinación por RIA.

En la Fig. 33 se representa la secreción de insulina inducida por glucosa (2'75 mM y 16'7 mM) en islotes de ratas alimentadas con una dieta estándar (grupo control), una dieta glucosa y una dieta pobre en carbohidratos. Los resultados se expresan en μ U de insulina liberada al medio de incubación por cada 3 islotes y 30 minutos.

No se observaron diferencias significativas en la secreción basal de insulina (glucosa 2'75 mM) en los tres grupos estudiados. A concentración de glucosa 16'7 mM, la respuesta insulino secretora en los islotes de ratas alimentadas con una dieta glucosa fue significativamente menor que en los controles ($p < 0'0125$). En el grupo de animales alimentados con una dieta pobre en carbohidratos durante 10 días la secreción de insulina experimentó un aumento significativo con respecto al grupo control ($p < 0'0025$) (Tabla XII).

TABLA XII

SECRECIÓN DE INSULINA INDUCIDA POR GLUCOSA (2'75 mM y 16'7 mM) EN ISLOTES AISLADOS DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETA ESTANDAR, DIETA GLUCOSA Y DIETA POBRE EN CARBOHIDRATOS

Dieta	Glucosa 2'75 mM	Glucosa 16'7 mM
Estándar	29'7 \pm 2'4 (n=27)	123'2 \pm 7'1 (n=28)
Glucosa	25'4 \pm 1'4 ^c (n=20)	100'6 \pm 5'5 ^a (n=20)
Pobre en CH	32'0 \pm 2'6 ^c (n=18)	160'3 \pm 10'0 ^b (n=13)

Los resultados se expresan en $\mu\text{U}/30 \text{ min}/3$ islotes como $\bar{X} \pm \text{ESM}$. El número de incubaciones realizadas figura entre paréntesis. Los animales fueron alimentados durante 10 días con diferentes dietas. La composición de las dietas se especifica en Material y Métodos. ^{a, b} Diferencias estadísticamente significativas con su correspondiente valor de la dieta estándar (control), a: $p < 0'0125$, b: $p < 0'0025$, ^c N.S.

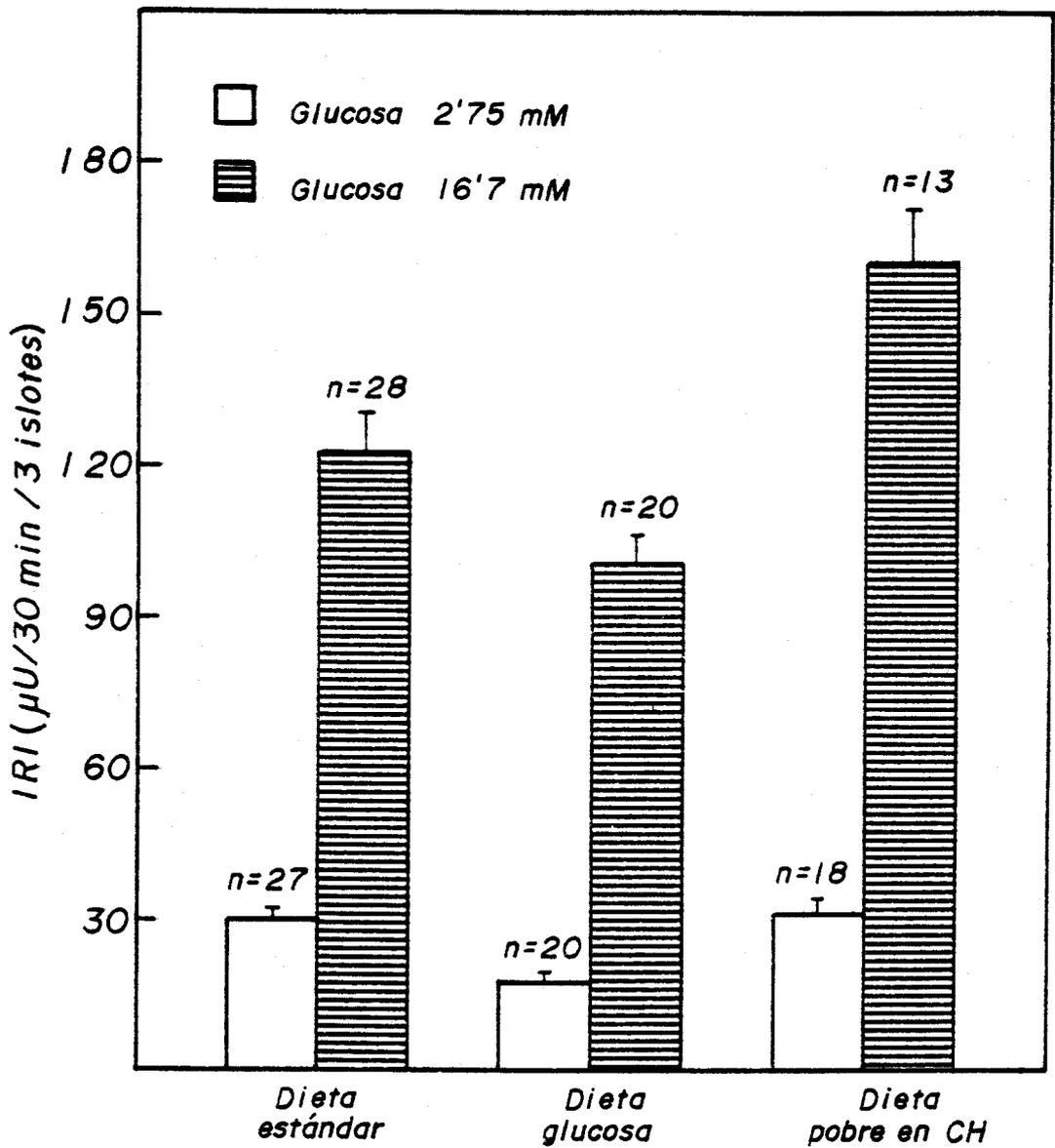


Fig. 33.- Efecto de la glucosa sobre la secreción de insulina en islotes aislados de ratas alimentadas durante 10 días con diferentes dietas.

8. ACTIVIDADES FOSFORILANTES DE LA GLUCOSA EN ISLOTES DE LANGERHANS AISLADOS DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETA ESTÁNDAR, DIETA GLUCOSA Y DIETA POBRE EN CARBOHIDRATOS

Los experimentos llevados a cabo para estudiar la actividad fosforilante de glucosa en islotes se realizaron incubando extractos de islotes equivalentes a 20 μg de proteína en un medio de incubación, cuya composición se describe en Material y Métodos. La incubación se llevó a cabo durante 20 min a 30°C.

La Fig. 34 muestra las actividades fosforilantes de la glucosa en extractos de islotes aislados de ratas alimentadas con dieta estándar, dieta glucosa y dieta pobre en carbohidratos. Los resultados se expresan en pmoles de D-|U-¹⁴C|glucosa transformados por minuto y μg de proteína de islote (Tabla XIII).

En las ratas sometidas a una dieta estándar (grupo control), la actividad fosforilante máxima, ensayada a glucosa 25 mM, fue del orden de 2'00 pmoles/min/ μg de proteína. La actividad correspondiente a la "glucoquinasa" fue de 0'71 pmoles/min/ μg de proteína. La actividad fosforilante de glucosa ensayada a glucosa 0'5 mM (actividad correspondiente a la hexoquinasa) fue del orden de 1'28 pmoles/min/ μg de proteína.

En el grupo de animales alimentados con una dieta glucosa, la actividad fosforilante máxima (ensayada a

glucosa 25 mM) y la actividad hexoquinasa (ensayada a glucosa 0'5 mM) fueron similares a las encontradas en islotes del grupo control. Por el contrario, la actividad de "glucoquinasa" descendió un 11% ($p < 0'05$) en relación a los valores de ratas alimentadas con dieta estándar.

En los islotes del grupo sometido a una dieta pobre en carbohidratos la actividad fosforilante total (ensayada a glucosa 25 mM) fue similar a la obtenida en islotes del grupo control. La actividad fosforilante de baja Km (ensayada a glucosa 0'5 mM) aumentó un 40% ($p < 0'0005$) en relación a los valores de ratas alimentadas con dieta estándar. La actividad de "glucoquinasa" fue del orden de $0'28$ pmoles de D-|U-¹⁴C|glucosa $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}$ de proteína⁻¹, lo que equivale a un descenso del 60% ($p < 0'0005$) en relación al grupo control.

TABLA XIII

EFECTO DE LA DIETA SOBRE LAS ACTIVIDADES FOSFORILANTES DE LA GLUCOSA EN EXTRACTOS DE ISLOTES DE RATA

Dieta	Actividad fosforilante total	Actividad glucoquinasa	Actividad hexoquinasa
Estándar	2'00 ± 0'07 (n=16)	0'71 ± 0'02 (n=16)	1'28 ± 0'06 (n=16)
Glucosa	1'90 ± 0'08 ^c (n=6)	0'63 ± 0'05 ^a (n=6)	1'27 ± 0'04 ^c (n=6)
Pobre en CH	2'10 ± 0'09 ^c (n=12)	0'28 ± 0'02 ^b (n=11)	1'79 ± 0'05 ^b (n=12)

Los resultados se expresan en pmol D-[U-¹⁴C]glucosa . min⁻¹ . μg proteína⁻¹ como $\bar{X} \pm$ ESM. El número de determinaciones realizadas figura entre paréntesis. Los animales fueron alimentados durante 10 días con diferentes dietas. La composición de las dietas se especifica en Material y Métodos ^{a,b} Diferencias estadísticamente significativas con su correspondiente valor de la dieta estándar (controles), a: p < 0'05, b: p < 0'0005, ^c N.S.

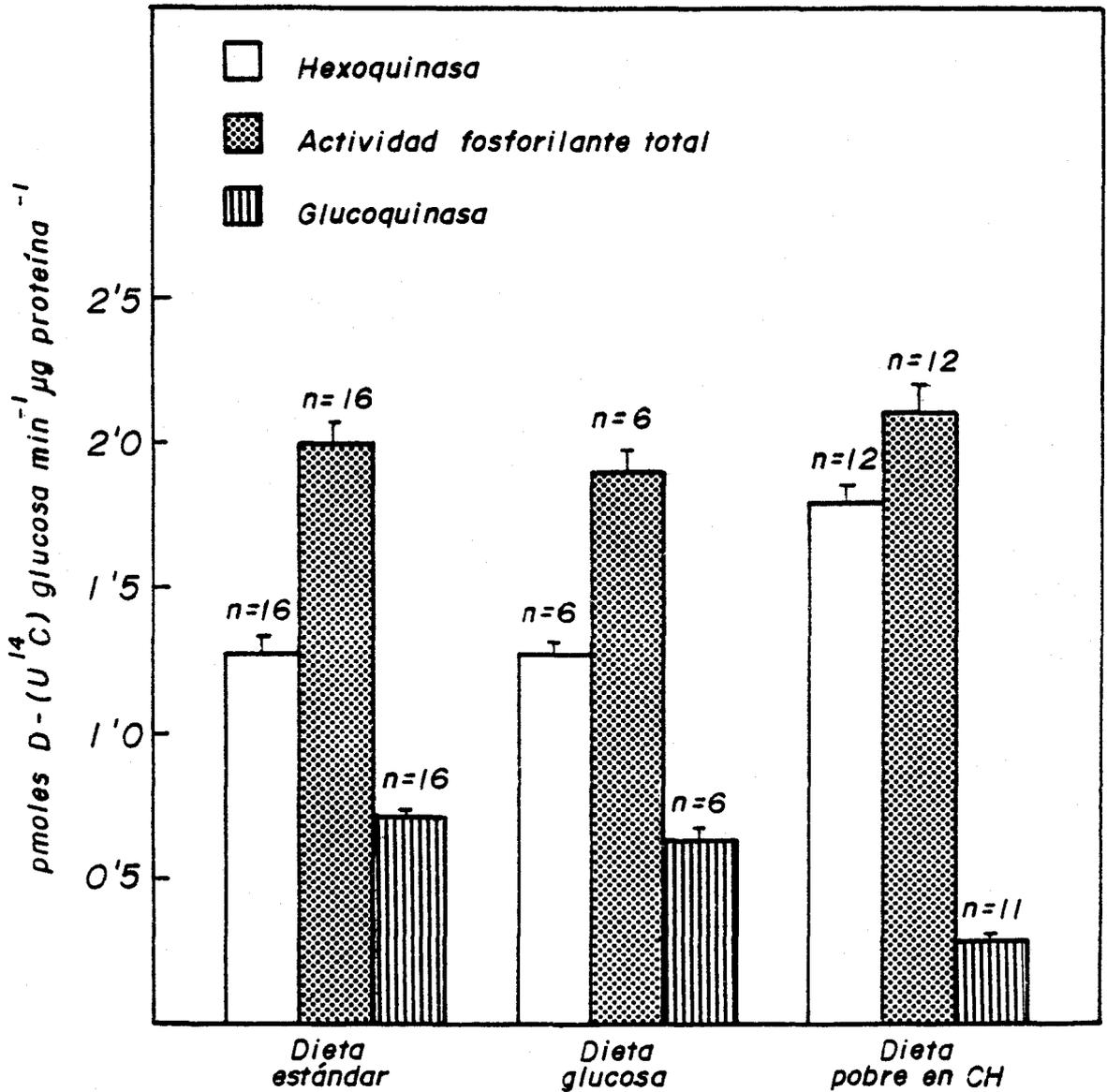


Fig. 34.- Actividad fosforilante de la glucosa de extractos de islotes de Langerhans procedentes de ratas alimentadas durante 10 días con diferentes dietas.

9. EFECTO DEL 2-BROMOESTEARATO SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA INDUCIDA POR GLUCOSA EN PANCREAS AISLADO Y PERFUNDIDO PROCEDENTE DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETA ESTANDAR

En la Fig. 35 se muestra la dinámica de la secreción de insulina en respuesta a glucosa 2'75 mM y 16'7 mM en ausencia y en presencia de 2-Bromoestearato 0'25 mM en páncreas aislado y perfundido de ratas alimentadas con dieta estándar.

La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 20 min de duración con glucosa 2'75 mM y un segundo periodo de 40 min con glucosa 16'7 mM. Al final de la perfusión se infundió adrenalina.

No existen diferencias apreciables en la secreción de insulina en ambos grupos estudiados, lo que indica que el 2-Bromoestearato (0'25 mM) no modifica la secreción de insulina en respuesta a la glucosa en páncreas perfundido de ratas alimentadas con dieta estándar.

En la Fig. 36 se observa que la relación entre la concentración de glucosa extracelular y la secreción de insulina en páncreas aislado y perfundido de ratas alimentadas con dieta estándar es un sigmoide, en el que la rama ascendente del mismo se encuentra entre 2'75 y 16'7 mM glucosa. La cinética sigmoidea de la secreción de insulina en respuesta a concentraciones crecientes de glucosa tampoco se modificó por la presencia de 2-Bromoestearato 0'25 mM.

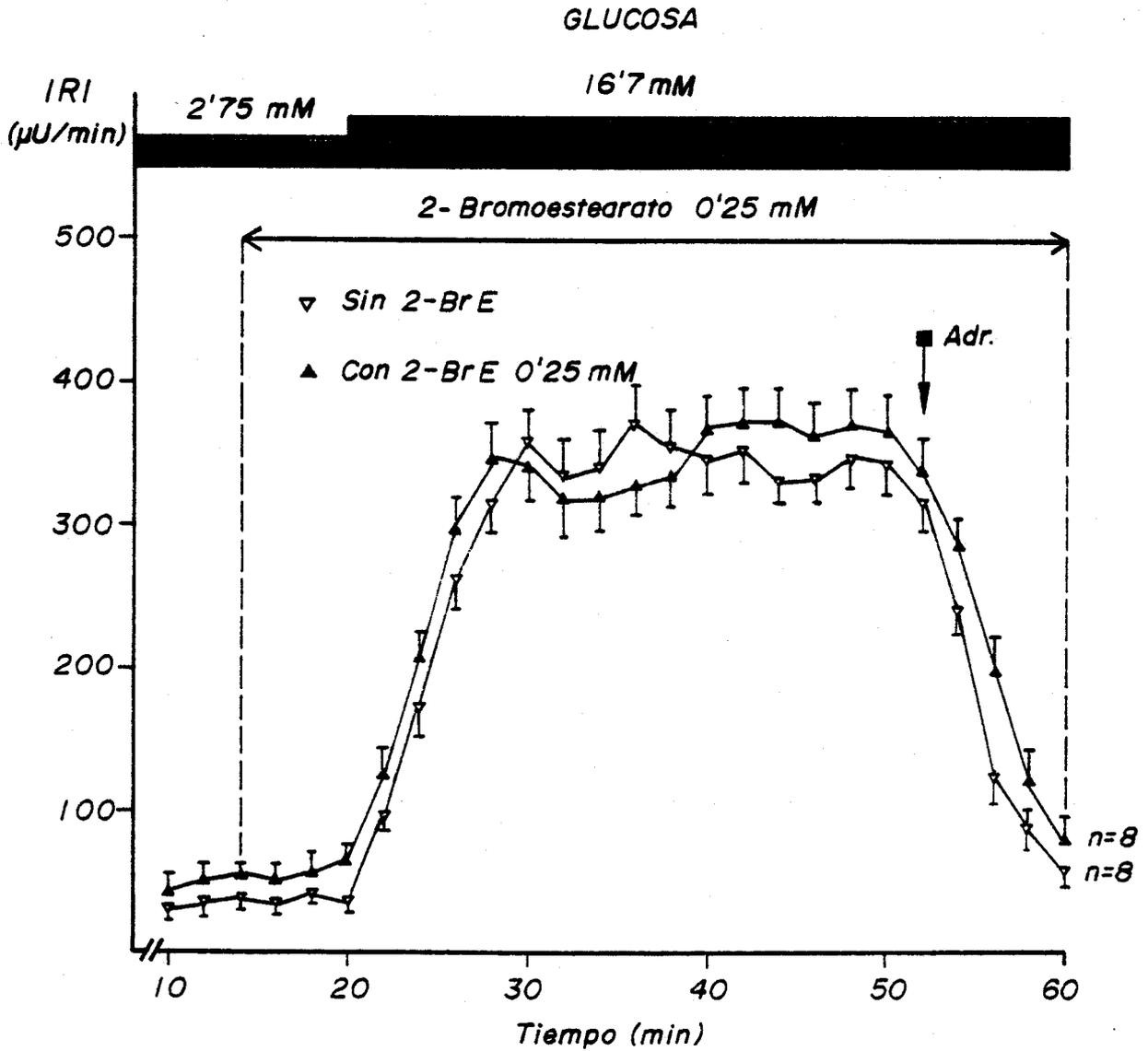


Fig. 35.- Efecto del 2-Bromoestearato 0'25 mM sobre la secreción de insulina en páncreas aislado y perfundido de ratas alimentadas con dieta estándar.

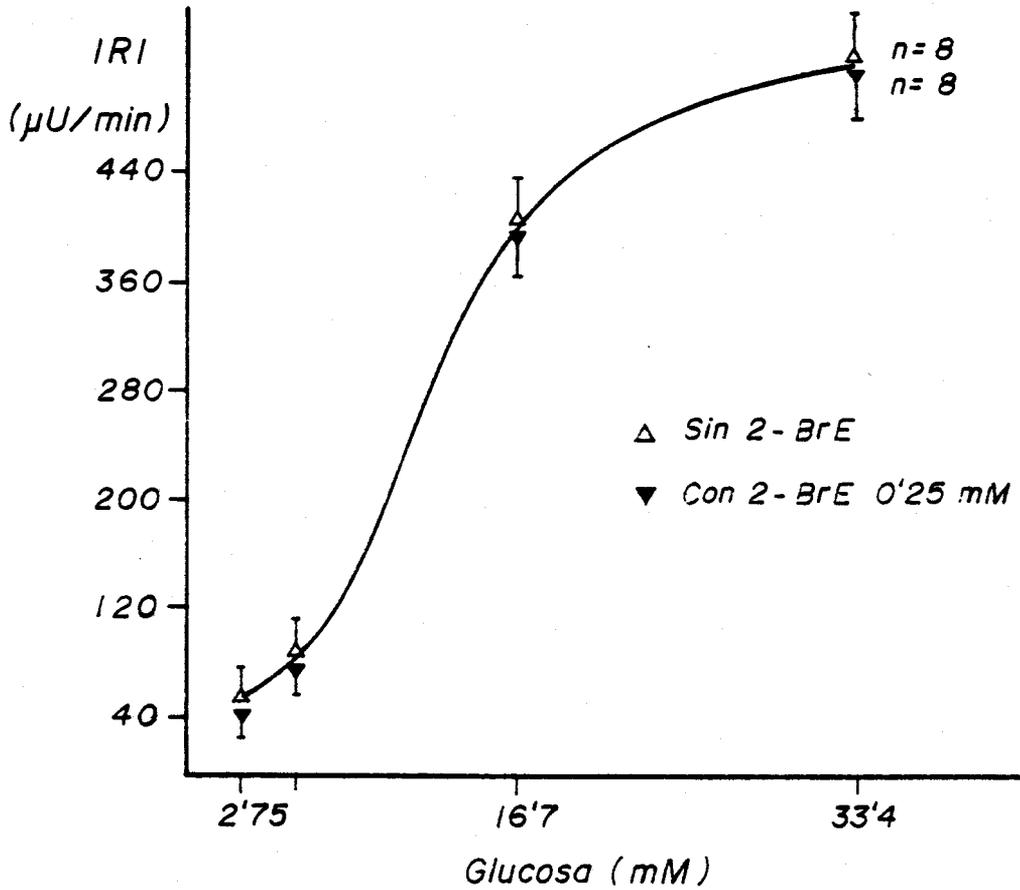


Fig. 36.- Cinética de la secreción de insulina a diferentes concentraciones de glucosa en páncreas aislado y perfundido de ratas alimentadas con dieta estándar, en ausencia y presencia de 2-Bromoestearato 0.25 mM.

10. EFECTO DEL AYUNO SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA EN
RESPUESTA A LA GLUCOSA EN PANCREAS AISLADO Y PERFUNDIDO
DE RATAS AYUNADAS DURANTE 96 H.

En la Fig. 37 se muestra la dinámica de la secreción de insulina en ratas alimentadas con dieta estándar y en ratas ayunadas durante 96 h. La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 20 min de duración con glucosa 2'75 mM y un segundo periodo de 40 min con glucosa 16'7 mM. Al final de la perfusión se infundió adrenalina.

En el grupo control, el páncreas respondió a glucosa 2'75 mM con una secreción basal de insulina que osciló entre 30 y 40 μ U/min. Al pasar de glucosa 2'75 mM a glucosa 16'7 mM, la secreción de insulina aumentó rápidamente alcanzando un valor aproximado de 350 μ U/min.

En el grupo ayunado durante 96 h, la secreción de insulina aumentó más lentamente al pasar de glucosa 2'75 mM a glucosa 16'7 mM, obteniéndose una respuesta máxima, unas 100 μ U/min, a los 26 min después de iniciada la perfusión. Por tanto, el ayuno bloquea parcialmente la secreción de insulina en respuesta a la glucosa.

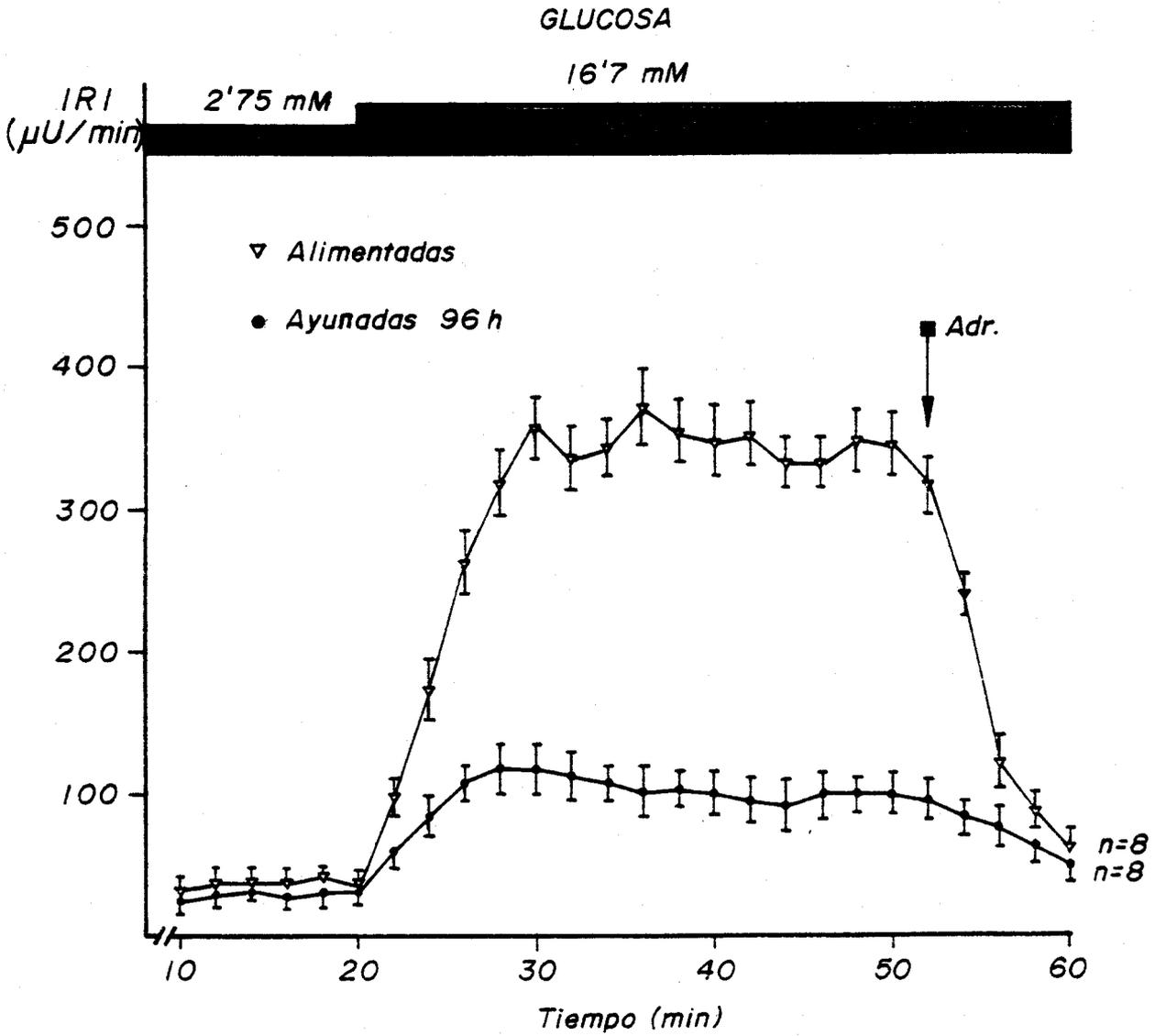


Fig. 37.- Secreción de insulina en páncreas aislado y perfundido de ratas ayunadas durante 96 h.

11. EFFECTO DEL 2-BROMOESTEARATO SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA EN PANCREAS AISLADO Y PERFUNDIDO DE RATAS AYUNADAS DURANTE 96 H.

En la Fig. 38 se representa la secreción de insulina de páncreas aislado y perfundido procedente de ratas ayunadas durante 96 h en ausencia y en presencia de 2-Bromoestearato 0'25 mM. La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 20 min de duración con glucosa 2'75 mM y un segundo periodo de 40 min con glucosa 16'7 mM. Al final de la perfusión se infundió adrenalina.

El 2-Bromoestearato 0'25 mM ejerció un efecto potenciador de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa durante el ayuno. La recuperación de la secreción de insulina en respuesta a glucosa 16'7 mM fue aproximadamente el 50% de la secreción obtenida en el grupo alimentado.

Como se observa en la Fig. 39 el ayuno lineariza la cinética sigmoidea de la secreción de insulina en páncreas aislado y perfundido de rata. La presencia de 2-Bromoestearato 0'25 mM en el medio de perfusión restauró parcialmente la respuesta sigmoide a la glucosa.

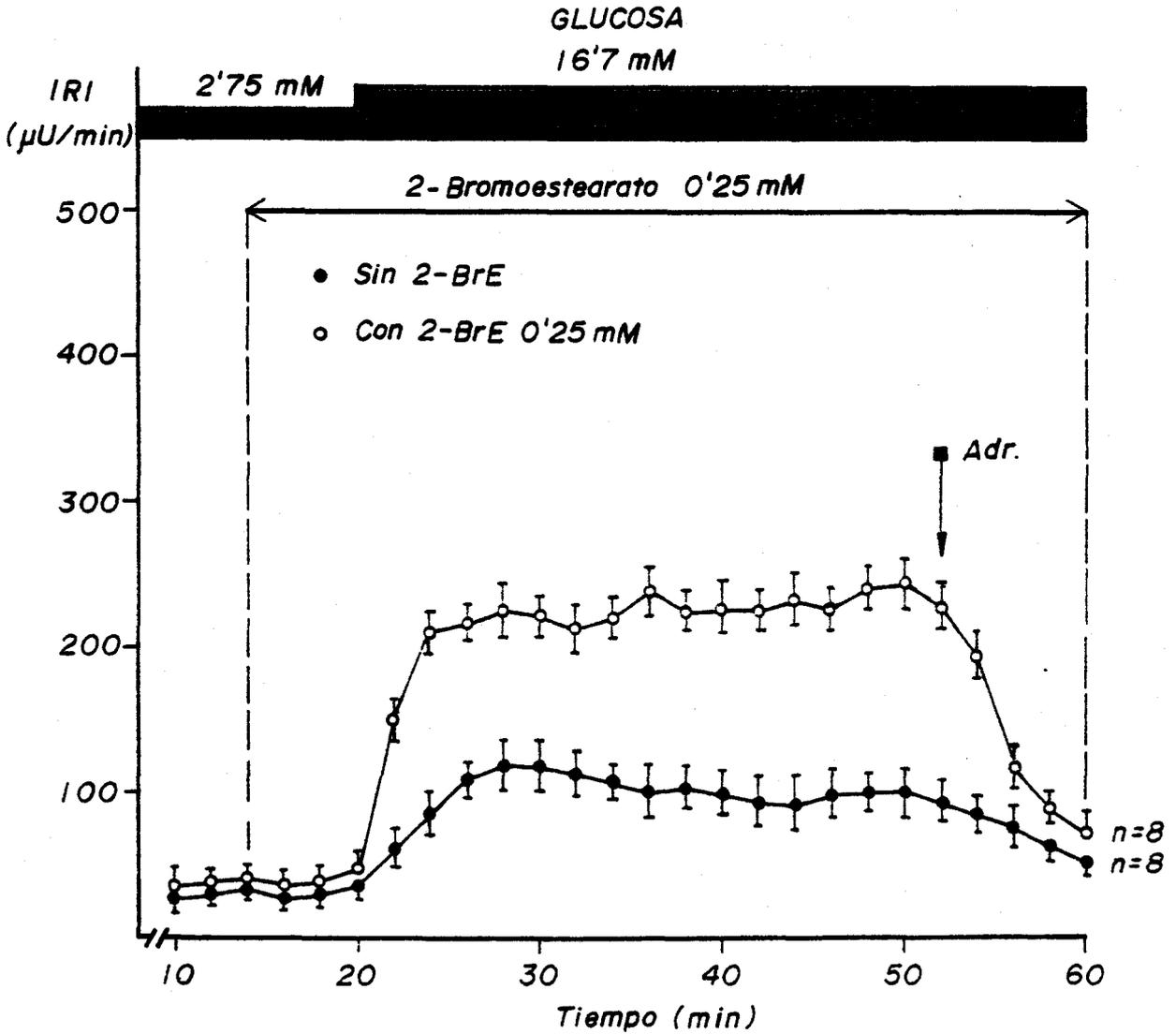


Fig. 38.- Efecto del 2-Bromoestearato 0.25 mM sobre la secreción de insulina en páncreas aislado y perfundido de ratas ayunadas durante 96 h.

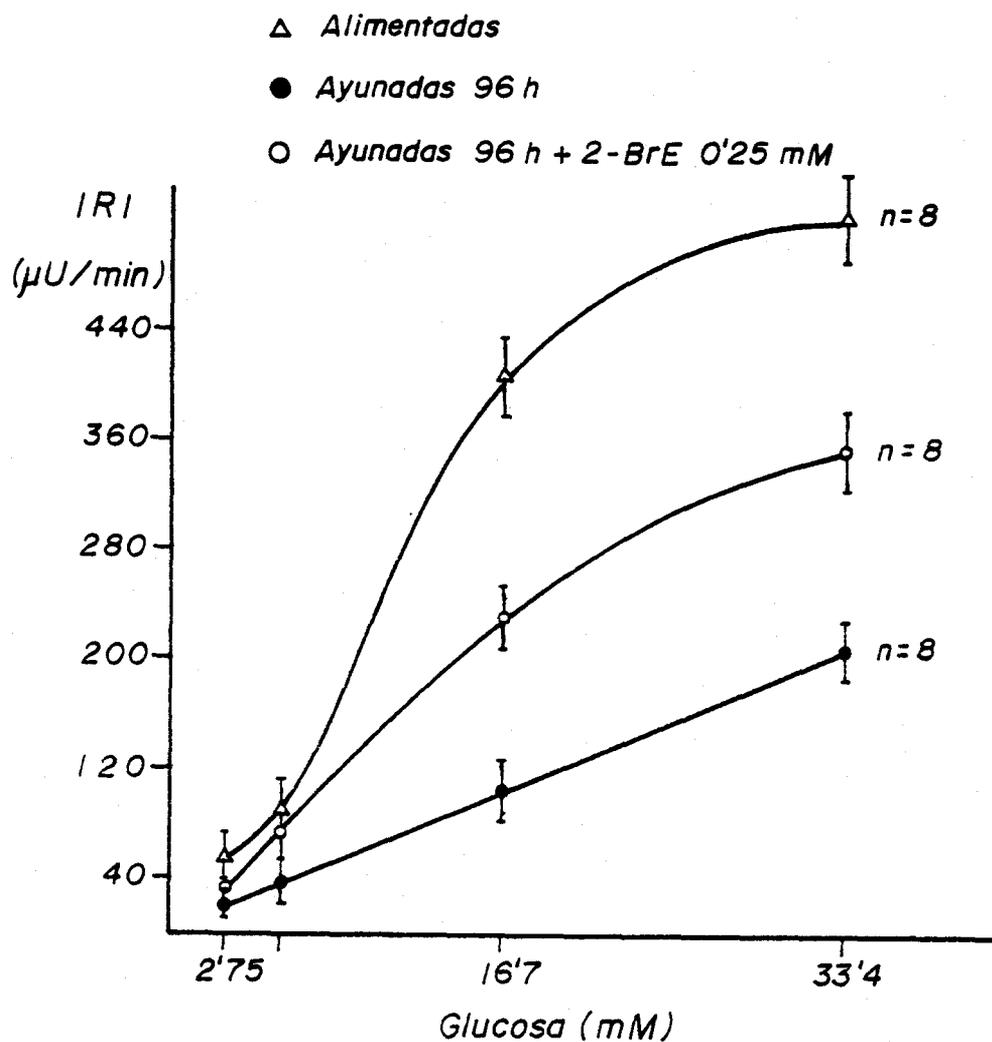


Fig. 39.- Cinética de la secreción de insulina a diferentes concentraciones de glucosa en páncreas aislado y perfundido de ratas ayunadas durante 96 h, en ausencia y presencia de 2-Bromoestearato 0'25 mM.

IV. DISCUSSION

En el presente trabajo se ha estudiado la influencia de los factores alimentarios sobre la funcionalidad del páncreas endocrino. Utilizando dietas con distinta proporción de glúcidos, lípidos y proteínas, hemos estudiado diversos parámetros intentando correlacionar la composición de la dieta con la funcionalidad de la célula B.

Ciertamente si comparamos las situaciones más extremas de nuestras experiencias es decir, la dieta que contiene únicamente glucosa con la que contiene grasas y proteínas, en ausencia de carbohidratos, podremos observar que las variaciones en los parámetros estudiados son fácilmente detectables. El interés del trabajo radica precisamente en este punto ya que es bien conocido que la diabetes no insulín dependiente modifica su aparición en razón de factores exógenos que hemos analizado con detenimiento.

Los animales utilizados en el presente trabajo tenían la misma edad, aproximadamente 2 meses, y fueron alimentados diez días antes de su sacrificio con tres tipos de dietas: dieta estándar, "dieta glucosa" y dieta pobre en carbohidratos (rica en grasas y proteínas).

El incremento del peso fue más importante en los animales sometidos a una dieta pobre en carbohidratos que

en los alimentados con una dieta estándar laboratorio (Tabla III, Fig. 20). Estos resultados están en consonancia con los descritos por DESHAIES et al. (1983) y CHILDS et al. (1981).

Por el contrario, "la dieta glucosa" disminuyó el peso de los animales (Tabla III, Fig. 20), no coincidiendo estos datos con los obtenidos por LOMBARDO et al. (1983). Estos autores no encontraron diferencias significativas en la ganancia de peso entre los animales alimentados con una dieta estándar y los alimentados con una dieta rica en carbohidratos. Esta discrepancia en los resultados probablemente se debe a la duración del periodo de tratamiento (45 días) y/o a la proporción de carbohidratos utilizada en su dieta (63%).

El consumo de alimento en los animales alimentados con una dieta rica en grasas y proteínas fue mayor que en los animales sometidos a una dieta estándar. Sin embargo, los animales alimentados con una "dieta glucosa" ingerieron aproximadamente la mitad de calorías (Tabla IV, Fig. 21). Esta diferencia en el consumo de calorías entre ambos grupos y el grupo control explicaría la variación en la ganancia de peso de dichos grupos.

Diversos trabajos han demostrado que cambios en la proporción de carbohidratos, lípidos y proteínas de la dieta pueden afectar al metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos (EATON Y KIPNIS, 1969; LITHELL et al., 1982; LIU et al., 1983).

Se ha observado que en el hombre el consumo durante diez días de una dieta rica en carbohidratos y pobre en grasas y proteínas (60% carbohidratos, 19% proteínas y 21% grasas de las calorías totales) conduce a una hiperglucemia e hiperinsulinemia postprandial, a un aumento de los niveles plasmáticos de triglicéridos en ayunas y a un descenso de la concentración de HDL-colesterol (COULSTON et al., 1983).

Todas estas consideraciones nos llevaron a estudiar la influencia de una "dieta glucosa" y una dieta pobre en carbohidratos sobre los niveles plasmáticos de lípidos, proteínas e iones.

En nuestras experiencias hemos utilizado dietas que desde un punto de vista fisiológico se le pueden poner muchas objeciones, pero debemos de recordar que el objetivo del trabajo es precisamente el observar las diferencias en situaciones extremas.

La determinación de los niveles plasmáticos de triglicéridos, colesterol total y colesterol asociado a lipoproteínas (VLDL, LDL, HDL) en ratas alimentadas con una dieta estándar laboratorio ha sido realizada por numerosos autores (KALOPISSIS et al., 1979; DESHAIES et al., 1983; MORISAKI et al., 1984; NAKAI et al., 1985). Los resultados obtenidos por nosotros son muy parecidos a los encontrados por dichos autores, a excepción de los valores de triglicéridos y de VLDL-colesterol (Tabla V ,Fig.22).

Los niveles plasmáticos de proteínas totales, albúmina, nitrógeno ureico y creatinina en los animales controles fueron del mismo orden que los encontrados por PINTADO (1977) y MORISAKI et al.(1984). La modificación de estos parámetros con la " dieta glucosa " se debe al aumento del catabolismo proteico en los animales sometidos a este tipo de dieta con la consiguiente liberación de creatinina al plasma (Tabla VI , Fig.23).

Los primeros estudios sobre el metabolismo de la glucosa en el páncreas endocrino se realizaron a partir de que RANDLE et al.(1968) formularon la hipótesis del sitio sustrato para la glucosa en la célula B. ASHCROFT et al. (1970) encontraron que análogos estructurales de la glucosa eran fácilmente metabolizables por la célula B y potentes estimuladores de la secreción de insulina. Además, encontraron una estrecha correlación entre la concentración de glucosa extracelular y su metabolización en el interior de la célula B, presentando una cinética sigmoide similar a la secreción de insulina.

Por otra parte, encontraron que la manoheptulosa, potente inhibidor de la glucoquinasa y la hexoquinasa en tejido hepático (SALAS et al, 1965), inhibía la secreción de insulina y la metabolización de la glucosa por la célula B.

MATSCHINSKY y ELLERMAN (1968) estudiaron los

niveles intracelulares de metabolitos de la glucosa en el islote: glucosa, glucosa 6 fosfato, triosas fosfato, 6 fosfogluconato y ATP, encontrando que tras 5 minutos de estímulo glucosado se incrementaban y que precedían a la secreción de insulina.

Más tarde, ASHCROFT y RANDLE (1970) describieron la presencia de dos actividades fosforilantes de glucosa en el islote de ratón: una de baja K_m (0'075 mM) para la glucosa y una velocidad de 0'54 u/g de peso húmedo y otra de alta K_m (16 mM) para la glucosa con una velocidad de 0'17 u/g de peso húmedo, siendo la actividad fosforilante de glucosa total de 0'63 u/g de peso húmedo.

Posteriormente, MALAISSE et al. (1976) y MATSCHINSKY et al. (1979) confirmaron estos resultados en islotes de rata.

En el islote de Langerhans existe un sistema enzimático doble que controla la fosforilación de la glucosa: una enzima de alta afinidad y con características cinéticas y adaptativas similares a las hexoquinasas y otra de baja afinidad con características cinéticas y adaptativas similares a la glucoquinasa hepática. TRUS et al. (1981) observaron que las enzimas fosforilantes de la glucosa poseen la actividad más baja de las posibles enzimas reguladoras de la vía glucolítica en el islote: la fosfofructoquinasa, la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa y la piruvato quinasa poseen actividades 40-100

veces superiores a la de la "glucoquinasa". Puesto que el transporte de glucosa a través de la membrana en el islote permite un rápido equilibrio entre los niveles extra e intracelulares de glucosa (HELLMAN et al., 1971), la fosforilación de la glucosa constituye el primer punto de regulación del metabolismo de la glucosa.

Tanto en el hepatocito como en el islote de Langerhans la fosforilación de la glucosa en equilibrio con la extracelular se lleva a cabo por la glucoquinasa preferentemente. En el hígado, la mayor parte de la glucosa fosforilada se transforma en glucógeno. Por tanto, la glucoquinasa hepática relaciona los niveles circulantes de glucosa y la síntesis de glucógeno en el hepatocito.

Por el contrario, en los islotes de Langerhans, la glucoquinasa podría relacionar los niveles circulantes de glucosa con el flujo glucolítico, ya que la síntesis de glucógeno posee escasa importancia en este tejido (MALAISSE et al., 1977). Esta función puede ser realizada "in vivo" por la "glucoquinasa" ya que su Km está dentro del rango de variabilidad en la concentración de glucosa circulante.

La glucoquinasa tendría otra función importante como reguladora del flujo glucolítico: determinaría la producción de hexosas monofosfato, precursores potenciales de la fructosa 2,6 bifosfato, descrita por VON SHAFTINGEN et al., (1980) como un potente activador capaz de superar la inhibición de la fosfofructoquinasa por el ATP en tejido

hepático. De esta manera, la glucoquinasa podría controlar la relación entre la glucosa circulante y el flujo glucolítico en el islote.

Estudios recientes han identificado el elemento sensor para la glucosa de la vía glucolítica en el islote; con bastante probabilidad dicho elemento sensor es la glucoquinasa. Dicha enzima presenta preferencia α -anómérica que son similares a las de la secreción de insulina y a las de la vía glucolítica (MEGLASSON y MATSCHINSKY, 1984); por otra parte, la glucoquinasa es inhibida específicamente por la mannoheptulosa que también bloquea la metabolización de la glucosa en la célula B y la respuesta insulino secretora (ZAWALICH et al., 1977b).

Los efectos de la composición de la dieta sobre las actividades fosforilantes de la glucosa han sido estudiados en diversos tejidos: tejido adiposo, hepatocitos, acinis pancreáticos etc. Sin embargo, en la literatura revisada no se ha encontrado ningún trabajo que estudie la influencia de una alimentación crónica con diferentes dietas sobre las actividades fosforilantes de glucosa en el islote. BEDOYA et al. (1984c) estudiaron el efecto de una realimentación selectiva con diferentes dietas sobre las actividades glucoquinasa y hexoquinasa en islotes de ratas ayunadas.

En la Fig.34 se muestran las actividades fosforilantes de glucosa en islotes de ratas alimentadas con diferen-

tes dietas.

La actividad glucoquinasa es aproximadamente el 35% de la actividad fosforilante de glucosa total en islotes de ratas sometidas a una dieta estándar, similar a la encontrada por TRUS et al. (1981). En islotes de ratas alimentadas con una "dieta glucosa" las actividades glucoquinasa y hexoquinasa fueron muy similares a las de los controles.

Por el contrario, la dieta pobre en carbohidratos (rica en proteínas y grasas) aumentó la actividad de baja Km en un 40% y disminuyó la actividad de alta Km en un 60%. REYES et al. (1984) observaron que la hexoquinasa D ("glucoquinasa") de hepatocitos de ratas alimentadas con una dieta libre en carbohidratos también estaba marcadamente disminuida; por el contrario, las hexoquinasas A, B y C no sufrieron variación.

También se ha estudiado el metabolismo de la glucosa en acinis pancreáticos de ratas alimentadas con una dieta rica en grasas (BAZIN y LAVAU, 1982). La capacidad de las células acinares para metabolizar a la glucosa disminuyó un 50% en los animales sometidos a este tipo de dieta. Esta disminución de la oxidación de la glucosa era debida a una reducción de la velocidad del transporte de la glucosa y no a un defecto en la reacción de fosforilación de glucosa, ya que la actividad hexoquinasa no sufrió modificación alguna.

El efecto de una dieta rica en carbohidratos sobre la tolerancia a la glucosa y respuesta insulínica ha sido frecuentemente estudiado. Mientras algunos autores han observado un empeoramiento en la tolerancia a la glucosa oral tanto en humanos (COHEN y TEITELBAUM, 1964) como en ratas (HALLFRISCH et al., 1979) otros, han encontrado un aumento significativo en la velocidad de desaparición de la glucosa (RODGERS et al., 1970).

En nuestro caso, el coeficiente de asimilación de la glucosa fue ligeramente mayor en los animales sometidos a una "dieta glucosa" que en los controles, a pesar de tener una marcada hipoinsulinemia en respuesta a la glucosa (Figs. 27 y 28 respectivamente).

En los animales alimentados con una dieta pobre en carbohidratos (rica en grasas y proteínas), el coeficiente de asimilación de la glucosa fue menor que en los alimentados con una dieta estándar y los niveles plasmáticos de insulina estaban incrementados tanto en condiciones basales como estimuladas (Figs. 27 y 28 respectiv.).

El contenido de carbohidratos en la dieta, tanto en humanos como en mamíferos, tiene un efecto importante sobre la acción de la insulina "in vivo" e "in vitro". De esta forma, se ha observado que una dieta rica en carbohidratos produce un aumento de la sensibilidad de las células "diana" hacia la insulina y una dieta pobre en carbohidratos y rica en grasas conduce a una resistencia insulínica.

Diversos mecanismos pueden explicar fácilmente esta resistencia a la insulina: 1) una disminución del número de receptores (OLEFSKY y SAEKOW 1978) 2) una disminución del transporte de la glucosa (HISSIN et al., 1982) y 3) una menor capacidad de las células para oxidar y metabolizar a la glucosa (OLEFSKY y SAEKOW 1978; LAVAU et al., 1979). Aunque en adipocitos aislados de ratas alimentadas con una dieta rica en carbohidratos se ha observado una disminución de la capacidad de unión de la insulina, los sistemas efectores para el transporte de la glucosa y su metabolismo intracelular estaban incrementados (OLEFSKY y SAEKOW, 1978).

Por otra parte, la ingestión de glucosa por nuestras ratas incrementó el glucógeno hepático (aproximadamente 3 veces más que el grupo control), coincidiendo este incremento con el obtenido por BLAZQUEZ y LOPEZ QUIJADA (1969) en ratas alimentadas con una dieta rica en carbohidratos. Por el contrario, la dieta rica en grasas disminuyó el contenido de glucógeno hepático en relación a la dieta estándar (Tabla X ,Fig.29). Mientras que KALOPISSIS et al., (1979) encontraron también una disminución, BLAZQUEZ y LOPEZ QUIJADA (1968) observaron un aumento del contenido de glucógeno en ratas sometidas a este tipo de dieta.

El ayuno es un estado metabólico caracterizado por una disminución de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa (JOOST y BECKMAN, 1980), un descenso del metabolismo de la glucosa por la célula B (HEDESKOV y CAPITO, 1974) y una inhibición de las actividades fosforilantes de la glucosa en el islote (BEDOYA et al., 1984b). Al mismo tiempo, hay un incremento de la disponibilidad de los ácidos grasos (exógenos y endógenos) para su metabolismo oxidativo.

Los datos aportados por BERNE (1975) sobre la oxidación de los lípidos por el islote y su inhibición por análogos estructurales como el 2-Bromoestearato (CHASE y TUBBS, 1972) nos llevaron a estudiar su efecto sobre la secreción de insulina en páncreas aislado y perfundido procedente de ratas alimentadas y de ratas ayunadas durante 96h.

Como se aprecia en la Fig.35 , el 2-Bromoestearato a una concentración 0'25mM no ejerció un efecto apreciable sobre la secreción de insulina en páncreas aislado y perfundido de ratas alimentadas. Por el contrario, el 2-Bromoestearato en páncreas de ratas ayunadas durante 96h restauró parcialmente la secreción de insulina en respuesta a una alta concentración de glucosa (16'7mM) (Fig.38).

Estos resultados coinciden con los descritos por TAMARIT-RODRIGUEZ et al., (1984a) en islotes perifundidos y sugieren que la inhibición de la oxidación de los ácidos

grasos puede jugar un papel importante en la regulación de la secreción de insulina. Un incremento en la velocidad de oxidación de los ácidos grasos debido al ayuno, podría contribuir al empeoramiento de la secreción de insulina.

Así, estos mismos autores (1984b) han comprobado que la velocidad de oxidación del ácido palmítico a glucosa 3mM en islotes de ratas ayunadas durante 48h era más alta que la de islotes de ratas alimentadas y no varió al pasar a una concentración de glucosa 20mM. Por otra parte, la incorporación de palmitato a fosfolípidos y a triacilglicerol en islotes controles aumentó considerablemente al pasar de glucosa 3mM a glucosa 20mM. Sin embargo, en islotes de ratas ayunadas no hubo este incremento en la incorporación de palmitato a los lípidos de islotes.

El 2-Bromoestearato (0'25mM) inhibió fuertemente la velocidad de oxidación del palmitato en islotes de ratas ayunadas y permitió una normal restauración del efecto de la glucosa sobre la incorporación de palmitato a fosfolípidos y a triacilglicerol.

En resumen, estos resultados sugieren que el ayuno bloquea la capacidad de la glucosa para disminuir la oxidación de los ácidos grasos y para incrementar su esterificación en los islotes, así como su efecto estimulatorio sobre la secreción de insulina. Ambas capacidades

de la glucosa son restauradas en islotes de ratas ayunadas por 2-Bromoestearato, un inhibidor de la oxidación de los ácidos grasos.

El ayuno produce un progresivo descenso de las actividades fosforilantes de glucosa en el islote. La actividad de alta Km presenta un descenso más precoz en su actividad; tras 96h de ayuno ambas actividades, alta y baja Km, están descendidas (BEDOYA et al., 1984b).

En islotes de ratas alimentadas, el 2-Bromoestearato 0'25mM no ejerció efecto alguno sobre las actividades fosforilantes de la glucosa. Por el contrario, la incubación de islotes de ratas ayunadas durante 96h con 2-Bromoestearato 0'25mM más glucosa 16'7mM fue capaz de restaurar casi totalmente las actividades fosforilantes; este efecto fue más importante sobre el componente de alta Km (BEDOYA et al., 1984b).

La presencia de glucosa fue necesaria para este efecto. Como hemos visto anteriormente, un requerimiento similar fue necesario para conseguir el efecto restaurador del 2 -Bromoestearato sobre la secreción de insulina en páncreas perfundido de ratas ayunadas durante 96h.

En resumen, el ayuno induce una disminución de la sensibilidad de la célula B hacia la glucosa. El hecho de que el 2-Bromoestearato restaure la actividad fosforilante y la liberación de insulina inducida por glucosa indica que puede existir una posible conexión entre el metabolismo

de la glucosa y el metabolismo de los ácidos grasos en la célula B.

La alimentación crónica con una "dieta glucosa" disminuyó la secreción de insulina tanto en islotes aislados como en páncreas perfundido en relación con la alimentación control (Fig. 33 y 32). Este descenso de la secreción de insulina puede resultar del agotamiento de los depósitos de insulina (O'CONNOR et al., 1980) o de la desensibilización de la célula B inducida por la glucosa (inhibición feedback).

Parece ser, que el descenso del contenido total de insulina no es el responsable, puesto que tanto en islotes aislados como en páncreas entero no encontramos variación en el contenido de insulina con respecto a los valores controles (Tabla XI, Figs. 31 y 30). Sin embargo, la secreción de insulina estaba reducida alrededor de un 50% en el páncreas perfundido y aproximadamente un 20% en los islotes aislados.

Estos resultados coinciden con los estudios llevados a cabo por BOLAFFI et al. (1986), en los cuales perfundieron islotes con glucosa durante 50h y perfundieron el páncreas durante 8h con el mismo estímulo. Ellos encontraron una secreción de insulina disminuida en ambos sistemas, siendo esta reducción causada principalmente por una disminución de la eficiencia del secretagogo, ya

que la célula B se desensibiliza por la continua estimulación con glucosa. Sin embargo, el agotamiento de un pequeño compartimento de insulina liberable no parece probable puesto que los islotes y el páncreas, respondieron vigorosamente a un estímulo agudo de glucosa-forskolina.

La influencia de los ácidos grasos sobre la secreción de insulina ha sido ampliamente estudiada tanto "in vivo" como "in vitro".

CRESPIN et al. (1969) observaron un aumento de los niveles de insulina plasmática después de la administración intravenosa de oleato sódico, y RAPTIS et al. (1973) han encontrado una elevación significativa en la secreción de insulina después de la administración oral e intravenosa de grasas.

En islotes aislados, los ácidos grasos inducen una fugaz estimulación de la liberación de insulina (TAMARIT-RODRIGUEZ et al., 1984b). Asimismo, GOBERNA et al., 1974 y CAMPILLO et al., 1979 encontraron este efecto estimulador de los ácidos grasos en páncreas aislado y perfundido de rata.

El hecho de que los ácidos grasos no produzcan un aumento de la secreción de insulina en ausencia de glucosa parece indicar que el mecanismo estimulador es dependiente de la glucosa. Es decir, son necesarios unos niveles mínimos de glucosa para que la célula B sea sen-

sible a los ácidos grasos y el nivel mínimo de activación está entre 50 y 100 mg por 100 y corresponde a los niveles normales de glucemia.

La obesidad en diversos modelos de animales está asociada frecuentemente a alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos (HERBERG y COLEMAN, 1977). Así, en ratones obesos, la obesidad se acompaña generalmente de hiperglucemia y de un incremento de los niveles de insulina en sangre (HERBERG y COLEMAN, 1977).

Hay hechos que apoyan el que la hiperglucemia de la obesidad está en relación con el aumento del tejido adiposo, habiendo una correlación entre el grado de obesidad y los niveles de insulinemia. Por otra parte, en sujetos voluntarios normales a los que se hace ganar peso también se evidencia un aumento de los niveles de insulina como en los sujetos crónicamente obesos y además, al volver a su peso normal se normalizan los niveles de insulina plasmática (HERRERA, 1981).

La obesidad humana está acompañada de hipertrofia y quizás hiperplasia de los adipocitos. Se ha demostrado que en la célula grasa hipertrófica hay un muy activo metabolismo y recambio de sustratos. Sin embargo, la acción antilipolítica de la insulina está claramente disminuida (PFEIFFER, 1973).

El hiperinsulismo en la obesidad humana acompañado

por insulín-resistencia periférica podría ser causado, al menos en parte, por un inesperado requerimiento elevado de insulina del adipocito agrandado, para mantener el metabolismo normal de la masa de tejido adiposo incrementada. Asimismo, en humanos se ha observado una disminución del número de receptores para la insulina, siendo ésto la causa principal de la insulino resistencia observada en esta situación (KOLTERMAN et al., 1980); también, en el obeso la tolerancia a la glucosa está disminuida (DUBUC et al., 1983).

Por último, hay una estrecha relación entre obesidad e hipersecreción de insulina. CURRY y STERN (1985) observaron que el páncreas de ratas Zucker obesas frente a un estímulo glucosado (200 a 300 mg/dl) segregaba más insulina que el páncreas de ratas no obesas.

Nuestros resultados muestran que el páncreas perfundido y los islotes aislados procedentes de animales alimentados con una dieta rica en grasas segregaban más insulina que los de ratas alimentadas con una dieta estándar (Figs. 32 y 33).

En resumen, el presente estudio demuestra que la alimentación con una dieta pobre en carbohidratos y rica en grasas produce un sobrepeso en los animales, hiperinsulinemia, hiperglucemia, intolerancia a la glucosa y secreción de insulina incrementada. Por lo que se puede decir, que este tipo de dieta conduce a los animales a un estado de relativa obesidad, acompañada de una disminución del coefi-

ciente de asimilación de la glucosa que sin embargo coexiste con una hiperinsulinemia. En nuestro modelo por lo tanto se dan las mismas circunstancias que en la obesidad que precede al desencadenamiento de la diabetes no insulín dependiente: empeoramiento de la asimilación de la glucosa con hiperinsulinismo.

V. CONCLUSIONES

1. El crecimiento ponderal de ratas alimentadas con una "dieta glucosa" es negativo comparado con el de ratas alimentadas con una dieta estándar laboratorio. En cambio, la dieta pobre en carbohidratos (rica en grasas y proteínas) produce un incremento del peso frente al grupo control.
2. La ingesta calórica de ratas sometidas a una "dieta glucosa" es inferior a la de ratas controles. Sin embargo, en la dieta pobre en carbohidratos (rica en grasas y proteínas) el aporte calórico es aproximadamente el doble que el del grupo control.
3. Los niveles plasmáticos de triglicéridos, colesterol y colesterol asociado a lipoproteínas disminuyen en ratas alimentadas con una "dieta glucosa" y no varían con respecto al control en los animales sometidos a una dieta pobre en carbohidratos (rica en grasas y proteínas).
4. La "dieta glucosa" produce un fuerte descenso de los niveles plasmáticos de proteínas totales, albúmina, nitrógeno ureico y creatinina. En los animales alimentados con una dieta pobre en carbohidratos (rica en grasas y proteínas) estos parámetros no varían con respecto a los valores controles a excepción de la albúmina y de la creatinina que están aumentadas.

5. La "dieta glucosa" disminuye los niveles plasmáticos de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , y aumenta los niveles Cl^- . En las ratas sometidas a una dieta pobre en carbohidratos (rica en grasas y proteínas) aumentan los niveles de Cl^- y Pi y disminuyen los niveles de Ca^{2+} .

6. Los islotes de Langerhans poseen un sistema enzimático doble que regula la actividad fosforilante de glucosa: uno con alta Km y baja afinidad para la glucosa y otro con baja Km y alta afinidad para la glucosa. La "dieta glucosa" produce una disminución de la actividad de alta Km, mientras que la actividad de baja Km o hexoquinasa apenas se modifica. En islotes del grupo sometido a una dieta pobre en carbohidratos (rica en grasas y proteínas) la actividad hexoquinasa aumenta un 40% y la actividad glucoquinasa disminuye un 60%, en relación al grupo control.

7. Tras una sobrecarga intravenosa de glucosa, los niveles de glucemia en las ratas tratadas con "dieta glucosa" están disminuidos en relación al grupo control. La dieta pobre en carbohidratos (rica en grasas y proteínas) produce un aumento importante de los niveles plasmáticos de glucosa.

8. El coeficiente de asimilación de la glucosa es ligeramente mayor en la "dieta glucosa" (1.6×10^{-2}) que en la dieta estándar (1.4×10^{-2}). En los animales sometidos a una dieta pobre en carbohidratos (rica en grasas y proteínas) este coeficiente sufre un descenso importante (0.7×10^{-2}).
9. La composición de las dietas no modifica el contenido de insulina del páncreas, ni de los islotes aislados.
10. Los niveles plasmáticos de insulina tras una sobrecarga intravenosa de glucosa en ratas alimentadas con una "dieta glucosa" son muy inferiores a los valores controles. Por el contrario, la dieta pobre en carbohidratos (rica en grasas y proteínas) aumenta la insulinemia.
11. El contenido de glucógeno hepático en ratas alimentadas con una "dieta glucosa" es aproximadamente tres veces superior al de ratas controles. La dieta pobre en carbohidratos (rica en grasas y proteínas) produce una fuerte disminución del glucógeno hepático.
12. El 2- Bromoestearato, inhibidor de la oxidación de los ácidos grasos, recupera parcialmente la respuesta insulino secretora a la glucosa bloqueada por el ayuno.

13. La secreción de insulina "in vitro" a una concentración de glucosa 2'75 mM, no varía en las tres dietas estudiadas. Con glucosa 16'7 mM, la "dieta glucosa" disminuye la secreción de insulina y la dieta pobre en carbohidratos (rica en proteínas y grasas) la incrementa frente a la dieta estándar.

14. Nuestro trabajo muestra que una dieta rica en grasas y proteínas y pobre en glúcidos (inferior al 4%) conduce a los animales a una disminución en el coeficiente de asimilación de la glucosa que coexiste con un hiperinsulinismo. En nuestras experiencias, se dan por lo tanto las mismas circunstancias que en la obesidad que precede al desencadenamiento de la diabetes no insulín dependiente: empeoramiento de la asimilación de la glucosa con un aumento de la secreción de insulina.

VI. BIBLIOGRAFIA

AMADOR, E. y URBAN, S. (1972)

Simplified serum phosphorus analyses by continuous flow spectrophotometry.

Clin. Chem. 18:601-604.

ARILLA, E. (1979)

Cinética de la secreción de insulina durante el ayuno.

Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla.

ARILLA, E., PRIETO, J.C., SOBRINO, F., HERRERA, M.T.,

LUCAS, M. y GOBERNA, R. (1979)

Acción de la arginina sobre la cinética de secreción de insulina.

Endocrinología 26:139-143.

ASHCROFT, S.J.H., HEDESKOV, C.J. y RANDLE, P.J. (1970)

Glucose metabolism in mouse pancreatic islets.

Biochem. J. 118:143-154.

ASHCROFT, S.J.H. y RANDLE, P.J. (1970)

Enzymes of glucose metabolism in normal mouse islets.

Biochem. J. 119:5-15.

ASHCROFT, S.J.H., BASSETT, J.M. y RANDLE, P.J. (1972a)

Insulin secretion mechanisms and glucose metabolism in isolated islets.

Diabetes 21, Suppl. 2:538-545.

ASHCROFT, S.J.H. RANDLE, P.J. y TALJEDAL, I.B. (1972b)

Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in normal mouse pancreatic islets.

FEBS Lett. 20:263-266.

ASHCROFT, S.J.H. WEERASINGHE, L.C.C. y RANDLE, P.J. (1973)
Interrelationship of islet metabolism, adenosine triphosphate content and insulin release.
Biochem.J. 132:223-231.

ASHCROFT, S.J.H. (1976)
The control of insulin release by sugars. En: "Ciba Found. Symp. Polypeptide Hormones: Molecular and cellular aspects" (Eds. Porter, R. y Fitzsimons, D.W.) Elsevier/Excerpta Med., Amsterdam, vol. 41, pp 117-139.

ASHCROFT, S.J.H. y NILO, J. (1978)
Effects of phoretin and dextran linked phoretin on pancreatic islet metabolism and insulin release.
Biochim. Biophys. Acta 538:334-348.

ASHCROFT, F.M., HARRISON, D.E. y ASHCROFT, S.J.H. (1984)
Glucose induced closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic B- cells.
Nature 312:446-448.

ATWATER, L., DAWSON, C.M., EDDLESTONE, G.T. y ROJAS, E. (1981)
Voltage noise measurements across the pancreatic B-cell membrane: calcium channel characteristics.
J. Physiol. 314:195-212.

BAZIN, R. y LAVAU, M. (1982)
Effects of high-fat diet on glucose metabolism in isolated pancreatic acini of rats.
Am. J. Physiol. 243:G448-G454.

BEDOYA, F.J., RAMIREZ, R., ARILLA, E. y GOBERNA, R. (1984a)
Effect of 2- Bromostearate on glucose-phosphorylating activities and the dynamics of insulin secretion in islets of Langerhans during fasting.
Diabetes 33: 858-863.

BEDOYA, F.J., RAMIREZ, R. y GOBERNA, R. (1984b)
Glucose phosphorylating activities in the islets of
Langerhans of the rat. Effect of fasting.
Horm. Metab. Res. 16:11-15.

BEDOYA, F.J., RAMIREZ, R. y GOBERNA, R. (1984c)
The effect of different kinds of refeeding on islet glucose
phosphorylating activities.
Metabolism 33:1097-1101.

BEDOYA, F.J., MEGLASSON, M.A., WILSON, J.M. y MATSCHINSKY,
F.M. (1985)
Radiometric oil well assay for glucokinase in microscopic
structures.
Analyt. Biochem. 144:504-513.

BERNARD, C. (1853)
Recherches sur une nouvelle, fonction du foie, considéré
comme l'organe producteur de matière sucrée chez l'homme
et les animaux.
Martinet. Paris

BERNE, C. (1975)
The metabolism of lipids in mouse pancreatic islets. The
oxidation of fatty and ketone bodies.
Biochem. J. 152:661-666.

BERRIDGE, J. (1984)
Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers.
Biochem. J. 220:345-360.

BEST, L. y MALAISSE, W.J. (1983a)
Phosphatidylinositol and phosphatidic acid metabolism in
rat pancreatic islets in response to neurotransmitter and
hormonal stimuli.
Biochim. Biophys. Acta 750:157-163.

- BEST, L. y MALAISSE, W.J. (1983b)
Effect of nutrient secretagogues on phospholipid metabolism
in rat pancreatic islets.
Moll. Cell. Endocrinol. 32:205-214.
- BIDEN, T.J. y TAYLOR, K.W. (1983)
Effects of ketone bodies on insulin release and islet-cell
metabolism in the rat.
Biochem. J. 212:371-377.
- BIDEN, T.J., PRENTKI, M., IRVINE, R.F., BERRIDGE, M.J. y
WOLLHEIM, C.B. (1984)
Inositol 1,4,5-triphosphate mobilizes intracellular Ca^{2+}
from permeabilized insulin-secreting cells.
Biochem. J. 223:467-473
- BLAZQUEZ, E. y LOPEZ QUIJADA, C. (1968)
The effect of a high-fat diet on glucose, insulin sensi-
tivity and plasma insulin in rats.
J. Endocrinol. 42:489-494
- BLAZQUEZ, E. y LOPEZ QUIJADA, C. (1969)
The effect of a high-carbohydrate diet on glucose, insulin
sensitivity and plasma insulin in rats.
J. Endocrinol. 44:107-113.
- BLUME, K.G. y BLEUTLER, E. (1975)
Galactokinase in human erythrocytes. En: "Methods in Enzy-
mology" (Eds. Colowick, S.P. y Kaplan, N.O.) Academic Press,
vol.42, pp 47-53.
- BOLAFFI, J.L., HELDT, A., LEWIS, L.D. y GRODSKY, G.M. (1986)
The third phase of "in vitro" insulin secretion. Evidence
for glucose insensitivity.
Diabetes 35:370-373.

BORG, L.A.H., EIDE, S.J., ANDERSSON, A. y HELLERSTROM, C.
(1979)

Effects in vitro of alloxan on the glucose metabolism of mouse pancreatic B-cells.

Biochem. J. 182:797-802

BORG, L.A.H. (1981)

Effects of alloxan on the islets of Langerhans. Inhibition of leucine metabolism and insulin secretion.

Biochim. Biophys. Acta 677:257-262.

BOROWITZ, J.L. y MATTHEWS, E.K. (1980)

Calcium exchangeability in subcellular fractions of pancreatic islet cells.

J.Cell.Sci. 41:233-243.

BOUMAN, R.P., GERRIT, H., WOLTERS, J. y KONIJNENDIJK, W.
(1979)

Insulin secretion and cyclic adenosine 3'-5' monophosphate levels in pancreatic islets of fed and fasted rats.

Diabetes 28:132-140.

BRADFORD, M.M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem. 72:248-254

BRISSON, G.R. y MALAISSE, W.J. (1973)

The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XI. Effect of theophylline and epinephrine on ⁴⁵Ca efflux from perfused islets.

Metabolism 22:455-460.

BURCH, P.T., TRUS, M.D., BERNER, D.K., LEONTIRE, A.,
ZAWALICH, K.C. y MATSCHINSKY, F.M. (1981)

Adaptation of glycolytic enzymes. Glucose use and insulin release in rat pancreatic islets during fasting and refeeding.

Diabetes 30:923-928.

CAMPILLO, J.E., CASTILLO, E., RODRIGUEZ, E. y OSORIO, C.
(1978)

Effect of phosphate on the insulin response to glucose in the isolated perfused rat pancreas.

Diabetologia 15:223 (resumen).

CAMPILLO, J.E., LUYCKX, A.S., TORRES, M.D. y LEFEBVRE, P.J.
(1979)

Effect of oleic acid on insulin secretion by the isolated perfused rat pancreas.

Diabetologia 16:267-273.

CAPITO, K. y HEDESKOV, C.J. (1974)

The effect of starvation on phosphodiesterase activity and the content of adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate in isolated mouse pancreatic islets.

Biochem. J. 142:653-658.

CAPITO, K. y HEDESKOV, C.J. (1977)

Effects of glucose, glucose metabolites and calcium ions on adenylate cyclase activity in homogenates of mouse pancreatic islets.

Biochem. J. 162:569-573.

CERAMI, A., STEVENS, V.J. y MONNIER, V.M. (1979)

Role of nonenzymatic glycosylation in the development of the sequelae of diabetes mellitus.

Metabolism 28, Suppl. 1:431-437.

CERASI, E. y LUFT, R. (1972)

Clinical diabetes and theories of pathogenesis. En: "Handbook of Physiology, section 7 Endocrinology, Endocrine pancreas" (Eds. Steiner, D.F. y Freinkel, N.) American Physiological Society, Washington, D.C., vol.I, pp627-640.

CERASI, E., LUFT, R. y EFFENDIC, S. (1972)

Effect of adrenergic blocking agents on insulin response to glucose in man.

Acta Endocrinol. 69:335-341.

CERASI, E. y KAISER, N. (1983)

The ideal sulfonylurea: how to define it. En: "Rationale for sulfonylurea therapy" (Ed. Pfeiffer, E.F.) Elsevier Science Publishers, B.V., Amsterdam, pp5-17.

COHEN, A.M. y TEITELBAUM, A. (1964)

Effect of dietary sucrose and starch on oral glucose tolerance and insulin like activity.

Am. J. Physiol. 26:105-108.

COLCA, J.R., KOTAGAL, N. LACY, P.E. y MCDANIEL, M.L.(1983)
Modulation of active Ca^{2+} uptake by the islet-cell endoplasmic reticulum.

Biochem. J. 212:113-121.

CONARD, V., FRANCKOSN, J.R.M., BASTENIE, P.A., KESTENS, J. y KOVACS, L. (1953)

Etude critique du triangle d'hyperglycemie intraveineux chez l'homme normal et determination d'un coefficient d'assimilation glucidique.

Arch. Int. Pharmacodyn. XCIII, No. 3-4:277-292.

- COULSTON, A.M., LIU, G.C. y REAVEN, G.M. (1983)
Plasma glucose, insulin and lipid responses to high-carbohydrate low-fat diets in normal humans.
Metabolism 32:52-56.
- CRANE, R.K. y SOLS, A. (1955)
Brain hexokinase. En: "Methods in Enzimology" (Eds. Colowick, S.P. y Kaplan, N.O.) Academic Press Inc., New York, Vol I, pp277-282.
- CRESPIN, S.R., GREENOUGH III, W.B. y STEINBERG, D. (1969)
Stimulation of insulin secretion by infusion of free fatty acids.
J. Clin. Invest. 48:1934-1943.
- CURRY, D.L. y STERN, J.S. (1985)
Dynamics of insulin hypersecretion by obese Zucker rats.
Metabolism 34:791-796.
- CHASE, J.F.A. y TUBBS, P.K. (1972)
Specific inhibition of mitochondrial fatty acid oxidation by 2-bromopalmitate and its coenzyme A and carnitine esters.
Biochem. J. 129:55-65.
- CHASSON, A.L., GRADY, H.J. y STANLEY, M.A. (1960)
Determination of creatinine by means of automatic chemical analysis.
Tech. Bull. Regist. Med. Techn. 30:207-212.
- CHEUNG, W.Y. (1970)
Cyclic 3,5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator.
Biochem. Biophys. Res. Commun 38:533-538.

CHILDS, M.T., TOLLEFSON, J., KNOPP, R.H. y BOWDEN, D.A. (1981)
Lipid metabolism in pregnancy. VIII. Effects of dietary fat
versus carbohydrate on lipoprotein and hepatic lipids and
tissue triglyceride lipases.

Metabolism 30:27-35.

CHRISTIE, M.R. y ASHCROFT, S.J.H. (1985)

Substrates for cyclic AMP-dependent protein kinase in islets
of Langerhans. Studies with forskolin and catalytic subunit.

Biochem. J. 227:727-736.

DALY, J.A. y ERTINGSHAUSEN, G. (1972)

Direct method for determining inorganic phosphate in
serum with the centrifichem.

Clin. Chem. 18:263-265.

DAVAGNINO, J. y URETA, T. (1980)

The identification of extrahepatic "glucokinase" as
N-acetylglucosamine kinase.

J. Biol. Chem. 255:2633-2636.

DELEERS, M., MAHY, M. y MALAISSE, W.J. (1985)

Glucose increases cytosolic Ca^{2+} activity in pancreatic
islet cells.

Biochem. Int. 10:97-103.

DESHAIES, Y., LEBLANC, J. y RICHARD, D. (1983)

Influence of a palatable, high-fat diet, and exercise
training on the high-density lipoprotein to total choles-
terol ratio in the rat.

Metabolism 32:62-65.

DI PRIETO, D.L., SHARMA, C. y WEINHOUSE, S. (1962)

Glucose phosphorylating activities in rat liver homogenates.

Biochemistry 1:455-462.

- DOUMAS, B.T., WATSON, W.A. y BIGGS, H.G. (1971)
Albumin standards and the measurement of serum albumin
with bromcresol green.
Clin. Chim. Acta 31:87-96.
- DUBUC, P.U., RISTIMAKI, S., CAHN, P.J. y WILLIS, P.L. (1983)
Glucose tolerance in aging obese (ob/ob) and lean mice.
Horm. Metab. Res. 15:120-123.
- DUNLOP, M.E. y LARKINS, R.G. (1984)
Lipid associated calcium ionophores in islet cell plasma
membrane following glucose stimulation.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 118:601-608.
- EATON, R.P. y KIPNIS, D.M. (1969)
Effects of high-carbohydrate diets on lipid and carbohydrate
metabolism in the rat.
Am. J. Physiol. 231:713-721.
- EDWARD, A.V. y BLOOM, S.R. (1978)
Nervous control of pancreatic hormones. En: "Gut Hormones"
(Ed. Bloom, S.R.) Churchill Livingstone, Edimburgh, London,
New York, pp 394-405.
- EVANS, M.H., PACE, C.S. y CLEMENTS, R.S. (1983)
Endogenous prostaglandin synthesis and glucose-induced
insulin secretion from the adult rat pancreatic islet.
Diabetes 32:509-515.
- FAJANS, S.S., FLOYD, J.C.Jr., KNOFF, R.F., PEK, S.,
WEISSMAN, P. y CONN, J.W. (1972)
Amino acids and insulin release in vivo.
J. Med. Sci. 8:233-243.

FOLIN, O. y DENIS, W. (1912)

A new colorimetric method for the determination of uric acid in blood.

J. Biol. Chem. 13:469-475.

FONTELA, T., GARCIA-HERMIDA, O., GARCIA-FERNANDEZ, M.C. y GOMEZ-ACEBO, J. (1984)

Incorporation of (U-¹⁴C)-glucose into glycogen in normal rat pancreatic islets.

Rev. Esp. Fisiol. 40:77-82.

FUSSGANGER, R.D., STRAUB, R., GOBERNA, R., JAROS, P.

SCHRODER, K., RAPTIS, S. y PFEIFFER, E.F. (1969)

Primary secretion of insulin and secondary release of glucagon from the isolated perfused rat pancreas following with pancreozymin.

Horm. Metab. Res. Supp. 1:224-227.

GAGLIARDINO, E.E., HARRISON, D.E., CHRISTIE, M.R. y

ASHCROFT, S.J.H. (1980)

Evidence for the participation of calmodulin in stimulus secretion coupling in the pancreatic B-cell.

Biochem. J. 192:919-927.

GIROIX, M.H., SENER, A., PIPELEERS, D.G. y MALAISSE, W.J.

(1984)

Hexose metabolism in pancreatic islets: inhibition of hexokinase.

Biochem. J. 223:447-453.

GITELMAN, H.J. (1967)

An improved automated procedure for the determination of calcium in biochemical specimen.

Anal. Biochem. 18:521-531.

GOBERNA, R. (1968)

Dinámica de la secreción de insulina.

Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia.

GOBERNA, R., KARL, H., FUSSGANGER, R.D., LAUBE, H. y PFEIFFER, E.F. (1971)

Effect of the synthetic progestagen chlormadinone acetate on the insulin response to glucose in normal and subtotally pancreatectomized rats.

Endocrinology 39:974-980.

GOBERNA, R. (1972)

Hormonas gastrointestinales y secreción de insulina.

Actas Soc. Endocrinol. Madrid IV (2):71.

GOBERNA, R., TAMARIT Jr., J., OSORIO, J., FUSSGANGER, R. TAMARIT, J. y PFEIFFER, E.F. (1974)

Action of B-hydroxy butyrate, acetoacetate and palmitate on the insulin release in the perfused isolate rat pancreas.

Horm. Metab. Res. 6:256-260.

GOBERNA, R. (1975)

Glucagón y diabetes experimental.

Diab. Clin. Endocr. y Nutr. X(2): 27-29.

GOBERNA, R., ARILLA, E., HERRERA, M.T., RUIZ, G., SOBRINO, F. y PRIETO, J.C. (1978)

Recuperation of sigmoid kinetics of insulin secretion induced by dibutyryl-cAMP, teophylline and refeeding in prolonged fasting.

Diabetologia 15:235 (resumen).

GOOD, C.A., KRAMER, H. y SOMOGYI (1933)

The determination of glycogen.

J. Biol. Chem. 100:485-491.

GREEN, I.C. y TAYLOR, K.W. (1972)

Effect of pregnancy in the rat on the size and insulin secretory response of the islets of Langerhans.

J. Endocrinol. 54:317-325.

GRILL, V. y CERASI, E. (1975)

Glucose-induced cyclic AMP accumulation in rat islets of Langerhans: preferential effect of the alpha anomer.

FEBS Lett. 54:80-83.

GRILL, V. y CERASI, E. (1976)

Effect of hexoses and mannoheptulose on cyclic AMP accumulation and insulin secretion in rat pancreatic islets.

Biochim. Biophys. Acta 437:36-50.

GRILL, V. y CERASI, E. (1978)

Interacting effects of sulfonylureas and glucose on cyclic AMP metabolism and insulin release pancreatic islets of the rat.

J. Clin. Invest. 61:1346-1354.

GRODSKY, G.M., BATTIS, A.A., BENNETT, L.L., VEELLA, C.Mc., WILLIAMS, N.B. y SMITH, D.F. (1963)

Effect of carbohydrates on secretion of insulin from isolated rat pancreas.

Am. J. Physiol. 205:638-644

GRODSKY, G.M., CURRY, D.L., BENNETT, L.L. y RODRIGO, J.J. (1968)

Factors influencing different rates of insulin release in vitro. En: "Mechanism and regulation of insulin secretion" (Eds. Levine, R. y Pfeiffer, E.F.) Acta Diabetol. Lat. 5 Suppl. 1, pp140-161.

GRODSKY, G.M., CURRY, D.L., LANDAHL, H. y BENNETT, L.L. (1969)

Further studies on the dynamic aspects of insulin release in vitro with evidence for a two-compartmental storage system.

Acta Diabetol. Lat. 6, Suppl. 1:544-579.

GRODSKY, G.M., FANSKA, R., WEST, L. y MANNING, M. (1974)
Anomeric specificity of glucose stimulated insulin
release: evidence for a glucoreceptor?
Science 186:536-538.

GRODSKY, G.M. (1975)
The Kinetics of insulin release. En: "Insulin II"
(Eds. Hasselblatt, A. y Bruchhausen, F.V.) Springer,
Berlin. pp 1-12.

GYLFE, E., HELLMAN, B., SEHLIN, J. y TALJEDAL, I.B. (1984)
Interaction of sulfonylurea with the pancreatic B-cell.
Experientia 40: 1126-1134.

HALLFRISCH, J., LAZAR, F.L., JORGENSEN, C. y RAISER, S.
(1979)
Insulin and glucose responses in rats fed sucrose or starch.
Am. J. Clin. Nutr. 32:787-793.

HARRISON, D.E. y ASHCROFT, S.J.H. (1982)
Effects of Ca^{2+} , calmodulin and cyclic AMP on the phos-
phorylation of endogenous proteins by homogenates of rat
islets of Langerhans.
Biochim. Biophys. Acta 714:313-319.

HEDESKOV, C.J. y CAPITO, K. (1974)
The effect of starvation on insulin secretion and glucose
metabolism in mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 140:423-433.

HEDESKOV, C.J. y CAPITO, K. (1975)
The pentose cycle and insulin release in isolated mouse
pancreatic islets.
Biochem. J. 152:571-576.

HEDESKOV, C.J. (1980)

Mechanism of glucose induced insulin secretion.

Physiol. Rev. 60:442-509.

HELLMAN, B., PETERSSON, B. y HELLERSTROM, C. (1964)

The growth pattern of the endocrine pancreas in mammals.

En: "Structure and metabolism of the pancreatic islets"

(Eds. Brodin, S.E., Hellman, B. y Knutson, H.) Pergamon Press, Oxford, pp 45-60.

HELLMAN, B., SEHLIN, J. y TALJEDAL, I.B. (1971)

Evidence for mediated transport of glucose in mammalian pancreatic beta-cells.

Biochim. Biophys. Acta 241:147-154.

HELLMAN, B., SEHLIN, J. y TALJEDAL, I.B. (1973a)

Transport of 3-O-methyl-D-glucose into mammalian pancreatic B-cells.

Pfluegers Arch. 340:51-58.

HELLMAN, B., LERNMARK, A., SEHLIN, J., TALJEDAL, I.B. y

WHISTLER, R.L. (1973b)

The pancreatic B-cell recognition of insulin secretagogues.

III. Effects of substituting sulphur for oxygen in the D-glucose molecule.

Biochem. Pharmacol. 22:29-35.

HELLMAN, B. IDAHL, L.A., LERNMARK, A., SEHLIN, J. y

TALJEDAL, I.B. (1974a)

The pancreatic B-cell recognition of insulin secretagogues.

VII. Comparaisons of glucose with glyceraldehyde isomers and dihydroxy acetone.

Arch. Biochem. Biophys. 162:448-457.

HELLMAN, B., IDAHL, L.A., LERNMARK, A. y TALJEDAL, I.B.
(1974b)

The pancreatic B-cell recognition of insulin secretagogues:
does cyclic AMP mediate the effect of glucose?

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:3405-3409.

HENQUIN, J. C. y LAMBERT, A.E. (1976)

Bicarbonate modulation of glucose-induced biphasic insulin
release by rat islets.

Am. J. Physiol 231:713-721.

HENQUIN, J. C. (1980)

The potassium permeability of pancreatic islet cells:
mechanisms of control and influence on insulin release.

Horm. Metab. Res. Suppl. 10:66-73.

HENQUIN, J. C. (1981)

Effects of trifluoperazine and pimozide on stimulus secre-
tion coupling in pancreatic B-cells.

Biochem. J. 196:771-780.

HENQUIN, J.C. y MEISSNER, H.P. (1982)

The electrogenic sodium-potassium pump of mouse pancreatic
B-cells.

J. Physiol. 332:529-552.

HENQUIN, J.C. y MEISSNER, H.P. (1983)

Dibutyryl cyclic AMP triggers Ca^{2+} influx and Ca^{2+} -dependent
electrical activity in pancreatic B-cell.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 112:614-620.

HERBERG, L. y COLEMAN, D.L. (1977)

Laboratory animals exhibiting obesity and diabetes syndromes.

Metabolism 26:59-99.

HERRERA, J.L. (1981)

Diabetes mellitus. Etiopatogenia. En: "Diabetes mellitus"
(Ed. Herrera, J.L.) Científico Médica, pp 1-36.

HISSIN, P.J., KARNIELI, E., SIMPSON, I.A., SALANS, L.B.
y CUSHMAN, S.W. (1982)

A possible mechanism of insulin resistance in the rat adi-
pose cell with high-fat/low-carbohydrate feeding. Deple-
tion of intracellular glucose transport systems.
Diabetes 31:589-592.

HOWELL, S.L. y WHITFIELD, M. (1972)

Cytochemical localization of adenyl cyclase activity in
rat islets of Langerhans.
J. Histochem. Cytochem. 20:873-879.

HOWELL, S. L., GREEN, I.C. y MONTAGUE, W. (1973)

A possible role of adenylate cyclase in the long-term
dietary regulation of insulin secretion from rat islets
of Langerhans.
Biochem. J. 136:343-349.

HOWELL, S.L. y MONTAGUE, W. (1973)

Adenylate cyclase activity in isolated rat islets of
Langerhans. Effects of agents which alter rates of insulin
secretion.
Biochim. Biophys. Acta 320:44-52.

HUBINONT, C., BEST, L., SENER, A. y MALAISSE, W.J. (1984)

Activation of protein kinase C by a tumor-promoting phorbol
ester in pancreatic islets.
FEBS Lett. 170:247-253.

- HUNTER, W.M. y GREENWOOD, F. C. (1962)
Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity.
Nature 194: 495-498.
- IDAHL, L.A. y HELLMAN, B. (1971)
Regulation of pancreatic B-cell glycogen through cyclic-3,5-AMP.
Diabetologia 7: 139-142.
- IDAHL, L.A., RAHEMTULLA, F., SEHLIN, J. y TALJEDAL, I.B. (1976)
Further studies on the metabolism of D-glucose anomers in pancreatic islets.
Diabetes 25: 450-458.
- JAFFE, M.Z. (1886)
Ueber den Niederschiag, welchen Pikrinsauer in normalen Harn erzeugt und weber eine nue reaction des Kreatinins.
Zeitschrift Fuer Physiologische Chemie 10: 391-400.
- JANJIC, D. y WOLLHEIM, C.B. (1983)
Interaction of Ca^{2+} , Mg^{2+} and Na^{+} in regulation of insulin release from rat islets.
Am. J. Physiol. 244: E222-E229.
- JOOST, H.G. y BECKMAN, I. (1980)
On the relation of glucose and insulin secretion in the fasting state.
Metabolism 29: 23-27.
- KAKIUCHI, S. y YAMAZAKI, R. (1970)
Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain studies on cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase (3).
Biochem. Biophys. Res. Commun. 41: 1104-1110.

KALOPISSIS, A.D., GIRARD, A. y GRIGLIO, S. (1979)
Diurnal variations of plasma lipoproteins and liver lipids
in rats fed starch sucrose or fat.

Horm. Metab. Res. 11: 118-122.

KESSLER, G. y WOLFMAN, M. (1964)
An automated procedure for the determination of calcium
and phosphorus.

Clin. Chem. 10: 686-703.

KESTON, A.S. (1956)
Specific colorimetric enzymatic analytical reagentes.
Am. Chem. Soc. Dallas, Texas, p 31 (resumen).

KOESKER, D.J., RUSH, W., CHIDECKEL, E., PALMER, J.,
GOODNER, C.J., ENSINCK, J. y GALF, C.C. (1974)
Somatostatin: Hypothalamus inhibition of the endocrine
pancreas.

Science 184: 482-483.

KOLTERMAN, O.G., INSEL, J., SAIKOW, M. y OLEFSKY, J.M.
(1980)

Mechanisms of insulin resistance in human obesity.

J. Clin. Invest. 65: 1272-1284.

KONDRUP, J. (1979)
Metabolism of palmitate in perfused rat liver.

Biochem. J. 184: 63-71.

KOTAGAL, N., COLCA, J.R. y MCDANIEL, M.L. (1983)
Activities of an islet cell plasma membrane ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-
ATPase by calmodulin and Ca-EGTA.

J. Biol. Chem. 258: 4808-4813.

KUO, W.N., HODGINS, D.S. y KUO. J.F. (1973)
Adenylate cyclase in islets of Langerhans.
J.Biol. Chem. 248:2705-2711.

LACY, P.E. y KOSTIANOWSKY, M. (1967)
Method for the isolation of intact islets of Langerhans
from the rat pancreas.
Diabetes 16:35-39.

LACY, P.E., HOWELL, S.L., YOUNG, D.A. y FINK, C.J. (1968)
A new hypothesis of insulin secretion.
Nature 219:1177-1179.

LARSON, L.I., SUNDLER, F. y HAKANSON, R. (1976)
Pancreatic polipeptide—a postulated new hormone: identification of its cellular storage site by light and electron-microscopic immunocytochemistry.
Diabetologia 12:211-226.

LAVAU, M., FRIED, S., SUSINI, C. y FREYCHET, P. (1979)
Mechanism of insulin resistance in adipocytes of rats fed a high fat diet.
J.Lipid. Res. 20:8-16.

LAYCHOCK, S.G. (1982)
Phospholipase A₂ activity in pancreatic islets is calcium-dependent and stimulated by glucose.
Cell Calcium 3:43-54.

LAZO, P.A. y SOLS, A. (1979)
Specific inactivation of animal hexokinase by xilose, in vitro, en situ and in vivo.
FEBS Lett. 98:88-90.

LEON, L.P., SMITH, J.B., SNYDER, L.R. y HORVATH, C. (1978)
Immobilized uricase for the continuous flow assay of uric
acid in serum.

Clin. Chem. 24:1023 (resumen).

LIEBERMANN, C. (1885)

Über das Oxychinoterpen.

Ber. Deut. Chem. Ges. 18:1803-1809.

LITHELL, H., JACOBS, I., VESSBY, B., HELLSING, K. y
KARLSSON, J. (1982).

Decrease of lipoprotein lipase activity in skeletal muscle
in man during a short-term carbohydrate-rich dietary regi-
me with special reference to HDL-cholesterol apolipopro-
tein and insulin concentrations.

Metabolism 31:994-998.

LIU, G.C., COULSTON, A.M. y REAVEN, G.M. (1983)

Effect of high-carbohydrate-low-fat diets on plasma glu-
cose, insulin and lipid responses in hypertriglyceridemic
humans.

Metabolism 32:750-753.

LOMBARDO, Y.B., CHICCO, A., MOCCHIUTTI, N., DE RODI, M.A.,
NUSIMOVICH, B. y GUTMAN, R. (1983)

Effect of sucrose diet on insulin secretion "in vivo" and
"in vitro" and on triglyceride storage and mobilisation of
the heart of rats.

Horm. Metab. Res. 15:69-76.

LORD, J.M. y ASHCROFT, S.J.H. (1984)

Identification and characterization of Ca²⁺-phospholipid-
dependent protein kinase in rat islets and hamster B-cells.

Biochem. J. 219:547-551.

MALAISSÉ-LAGAE, F. y MALAISSÉ, W.J. (1971)

The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release, III. Uptake of 45 Ca by isolated islets of Langerhans.

Endocrinology 88:72-80.

MALAISSÉ, W.J., SENER, A. y MAHY, M. (1974a)

The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Sorbitol metabolism in isolated islets.

Eur.J. Biochem. 47:365-370.

MALAISSÉ, W.J., PIPELEERS, D.G. y LEVY, J. (1974b)

The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XVI. A glucose-like and calcium-independent effect of cyclic AMP.

Biochim. Biophys. Acta 362:121-128.

MALAISSÉ, W.J., SENER, A. y LEVY, J. (1976)

The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXI. Fasting-induced adaptation of key glycolytic enzymes in isolated islets.

J. Biol. Chem. 251:1731-1737.

MALAISSÉ, W.J., SENER, A., KOSER, M., RAVAZOLA, M. y

MALAISSÉ-LAGAE, F. (1977)

The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Insulin release due to glycogenolysis in glucose-deprived islets.

Biochem. J. 164:447-454.

MALAISSÉ, W.J., HUTTON, J.C., KAWAZU, S., HERCHUELZ, A. y

VALVERDE, I. (1979)

The stimulus secretion coupling of glucose induced insulin release. The links between metabolic and cationic effects.

Diabetologia 16:331-341.

MALAISSSE, W.J., SENER, A., CARPINELLI, A.R., ANJANEYULU, K.,
LEBRUN, P., HERCHUELZ, A. y CHRISTOPHE, J. (1980)

The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin
release. XLVI. Physiological role of L-glutamine as a fuel
for pancreatic islets.

Mol. Cell. Endocrinol. 20:171-189.

MALAISSSE, W.J., MALAISSSE-LAGAE, F. y SENER, A. (1982a)

The glycolytic cascade in pancreatic islets.

Diabetologia 23:1-5.

MALAISSSE, W.J., MALAISSSE-LAGAE, F. y SENER, A. (1982b)

Glucose-induced accumulation of fructose-2,6-biphosphate
in pancreatic islets.

Diabetes 31:90-93.

MALAISSSE, W.J.,MALAISSSE-LAGAE, F. y SENER, A. (1983)

Anomeric specificity of hexose metabolism in pancreatic
islets.

Physiol. Rev. 63:773-786.

MALAISSSE, W.J. y MALAISSSE-LAGAE, F. (1984)

The role of cyclic AMP in insulin release.

Experientia 40:1068-1075.

MARCUM, J.M., DEDMAN, J.R., BRINKLEY, B.R. y MEANS, A.R.
(1978)

Control of microtubule assembly-disassembly by calcium-
dependent regulator protein.

Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75:3771-3775.

MARSH, W.H., FINGERHUT, B. y MILLER, H. (1965)

Automated and manual direct methods for the determination
of blood urea.

Clin. Chem. 11:624-627.

MATSCHINSKY, F.M. y ELLERMAN, J.E. (1968)

Metabolism of glucose in the islets of Langerhans.
J.Biol. Chem. 243:2730-2736.

MATSCHINSKY, F.M., TRUS, M., BERNER, D., GHOSH, A.,
ZAWALICH, W. y WEILL, V. (1979)

Dual control of glucose phosphorylation in pancreatic islet.
En: "Diabetes" (Ed. Waldans, W.K.) Excerta Med.ICS.,
Amsterdam, Oxford, Princeton, pp 154-159.

MATSUYAMA, T., HORIE, H., NAMBA, M., NONAKA, K. y
TARUI, S. (1983)

Glucose-dependent stimulation by prostaglandin D₂ of
glucagon and insulin in perfused rat pancreas.
Life Sci. 32:979-982.

MCINTYRE, N. , HOLSWORTH, C.D. y TURNER, D.S. (1965)
Intestinal factors in the control of insulin release.
J.Clin. Endocr. 25:1317-1324.

MEGLASSON, M.D., BURCH, P.I., BERNER, D.K., NAJAFI, H.,
VOGIN, A.P. y MATSCHINSKY, F.M. (1983)
Chromatographic resolution and kinetic characterization
of glucokinase from islets of Langerhans.
Proc. Natl. Acad.Sci. USA 80:85-89.

MEGLASSON, M.D. y MATSCHINSKY, F.M. (1984)
New perspectives on pancreatic islet glucokinase.
Am. J. Physiol. 246:E1-E13.

METZ, S.A., MURPHY, R.C. y FUGIMOTO, W. (1984)
Effects on glucose-induced insulin secretion of lipoxigenase-
derived metabolites of arachidonic acid.
Diabetes 33:119-124.

MICHELL, R.H. (1975)

Inositol phospholipids and cell surface receptor function.
Biochim. Biophys. Acta 115:81-147.

MILNER, R.D.G. y HALES, C.N. (1969)

The interaction of various inhibitors and stimuli of insulin release studied with rabbit pancreas in vitro.
Biochem.J. 113:473-479.

MONTAGUE, W. y HOWELL, S.L. (1973)

Mode of action of cyclic adenosine 3'-5' monophosphate in mammalian islet of Langerhans. Effects of insulin secretagogues on islet cell protein kinase activity.
Biochem. J. 134:321-327.

MORGENSTERN, S., RUSH, R. y LEHMAN, D. (1973)

SMAC: Chemical methods for increased specificity. En: "Advances in automated analysis Technicon International Congress"
White Plains, New York, Mediad Inc. pp 27-31.

MORISAKI, N., MATSUOKA, N., SAITO, Y. y KUMAGAI, A. (1984)

Lipid metabolism in nephrotic rats induced by daunomycin injection.
Metabolism 33:405-410.

MULLER, W.A. y SHARP, G.W.G. (1974)

Cyclic AMP dependent protein kinase and phosphoprotein phosphatase in rat islets.
Diabetologia 10:380-381.

NAKAI, T., OIDA, K., KUTSUMI, Y., HAYASHI, T., MIYABO, S., TAKEDA, R., YAMADA, N. y MURASE, T. (1985)

Effects of insulin on hypercholesterolemia in the streptozotocin-induced diabetic rats fed a high cholesterol diet.
Artery 13:61-76.

NAKAKY, T., NAKADETE, T., ISHII, K. y KATO, R. (1981)
Postsynaptic alpha-2-adrenergic receptors in isolated rat
islets of Langerhans: inhibition of insulin release and
cyclic 3':5'- adenosine monophosphate accumulation.
J.Pharmac. Exp. Ther. 216:607-611.

O'CONNOR, M.D.L., LANDAHL, H. y GRODSKY, G.M. (1980)
Comparison of storage-and signal-limited models of pan-
creatic insulin secretion.
Am. J. Physiol. 238: R378-R389.

OLEFSKY, J.M. y SAEKOW, M. (1978)
The effects of dietary carbohydrate content on insulin and
glucose metabolism by isolated rat adipocytes.
Endocrinology 103:2252-2263.

ORTIZ, S. (1980)
Regulación de la secreción de los islotes de Langerhans
durante el ayuno.
Tesis Doctoral Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.

OSORIO, J. , CAMPILLO, J.E., GARCIA DE LOS ARCOS, J.,
PAJES, I., RODRIGUEZ, E. , MARASCO, M. y MELANI, F. (1976)
Inhibition of the glucose induced insulin release by soma-
tostatin in the isolated perfused rat pancreas. Action of
cyclic AMP, glucagon and glibenclamide.
Rev. Esp. Fisiol 32:211-216

PACE, C.S., MATSCHINSKY, F.M., LACY, P.E. y CONANT, S. (1977)
Electrophysiological evidence for the autoregulation of
B-cell secretion by insulin.
Biochim. Biophys. Acta 497:408-414.

PATTON, G.S., IPP, E., DOBBS, R.E., ORCI, L., VALE, W. y
UNGER, R.H. (1977)
Pancreatic immunoreactive somatostatin.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74:2140-2143.

PFEIFFER, E.F. (1973)

Obesidad y Diabetes mellitus. En: "I Jornadas Endocrinológicas de Sevilla" (Eds. Aznar, A. Herrera, E. y Diaz, M.) Public. de la Universidad de Sevilla, pp 17-30.

PERSHADSINGH, H.A., MCDANIEL, M.L., LANDT, M., BRY, C.G., LACY, P.E. y MCDONALD, J.M. (1980)

Ca²⁺-activated ATPase and ATP-dependent calmodulin stimulated Ca²⁺-transport in islet cell plasma membrane.

Nature 288:492-495.

PINTADO, E. (1977)

Estudio secuencial de las modificaciones metabólicas durante el ayuno prolongado.

Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla.

PRENTKI, M., JANJIC, D. y WOLLHEIM, C.B. (1983)

The regulation of extramitochondrial steady state free Ca²⁺ concentration by rat insulinoma mitochondria.

J. Biol. Chem. 258:7597-7602.

PRENTKI, M. y WOLLHEIM, C.B. (1984)

Cytosolic free Ca²⁺ in insulin secreting cells and its regulation by isolated organelles.

Experientia 40:1052-1060.

RANDLE, P.J., ASHCROFT, S.J.H. y GILL, J.R. (1968)

Carbohydrate metabolism and release of hormones. En:

"Carbohydrate metabolism and its disorders" (Eds. Dickens, F., Randle, P.J. y Whelan, W.J.) Academic, London, vol.1,

pp 427-447.

RAO, J., PELAVIN, M.A. y MORGENSTERN, S. (1973)
SMAC: high-speed continuous flow, ion-selective electrodes
for sodium and potassium. En: "Advances in automated analysis,
Technicon International Congress, 1972" Clinical Chemistry
Methods, Mediad Inc, New York, vol. I, pp 33-36.

RAPTIS, S., KISSING, J., DOLLINGER, H., SCRODER, K.E. y
PFEIFFER, E.F. (1973)

The effect of oral and intravenous administration of fat
on the function of the endocrine and exocrine pancreas
in man.

Excerpta Med. ICS 280:37 (resumen).

RASMUSSEN, H. (1970)

Cell communication, calcium ion and cyclic adenosine
monophosphate.

Science 107:104-106.

RASMUSSEN, H y BARRETT, P. Q. (1984)

Calcium messenger system: an integrated view.

Physiol. Rev. 64:938-984.

REYES, A., RABAJILLE, E., CARDENAS, M.L. y NIEMEYER, H.
(1984)

Stability of hexokinases A,B and C and N-acetylglucosamine
kinase in liver cells isolated from rats submitted to
diabetes and several dietary conditions.

Biochem.J. 221:311-315.

ROBERTSON, R.P. (1979)

Prostaglandins as modulators of pancreatic islet function.

Diabetes 28:943-948.

RODGERS, N.W., SQUIRES, E. y DU, B.P. (1970)

Improved glucose tolerance in asymptomatic diabetics on diets high in simple sugar content.

Diabetes 19:399-405.

RODKEY , F.L. (1965)

Direct spectrophotometric determination of albumin in human serum.

Clin. Chem. 11:478-487.

ROMANS, R.G., SCOTT, D.A. y FISHER, A.M. (1940)

Preparation of crystalline insulin.

Ind. Engng. Chem. 32:908-912.

ROOS, I., CROMPTON, M. y CARAFOLI, E. (1978)

The effect of phosphoenolpyruvate on the retention of calcium by liver mitochondria.

FEBS Lett. 4:418-421.

ROSEN, O.M. y ERLICHMAN, J. (1975)

Reversible autophosphorylation of a cyclic 3'-5' AMP dependent protein kinase from bovine cardiac muscle.

J. Biol. Chem. 250:7788-7792.

ROSSELIN, G., ASSAN, R., YALOW, R.S. y BERSON, S.A. (1966)

Separation of antibody and unbound peptide hormones labeled with iode 131 by talcum powder and precipitated silica.

Nature 212:355-357.

ROSSINI, A.A., CAHILL, G.F. Jr., JEANLOZ, D.A., y

JEANLOZ, R.W. (1975)

Anomeric specificity of 3-O-methyl-D-glucopyranose against alloxan diabetes.

Science 187:70-71.

- SALAS, J., SALAS, M., VIÑUELA, E. y SOLS, A. (1965)
Glucokinase of rabbit liver. Purification and properties.
J. Biol. Chem. 240:1014-1018.
- SAMOLS, E., MARRI, G. y MARKS, V. (1965)
Promotion of insulin secretion by glucagon.
Lancet 2:415-416.
- SAMOLS, E., TYLER, J.M. y MARKS, V. (1972)
Glucagon-insulin interrelationships. En: "Glucagon molecular
physiology. Clinical and therapeutical implications"
(Eds. Lefebvre, P.J. y Unger, R.H.) Pergamon Press, Oxford,
pp 151-173.
- SCHREY, M.P. y MONTAGUE, W. (1983)
Phosphatidylinositol hydrolysis in isolated guinea-pig
islets of Langerhans.
Biochem. J. 216:433-441.
- SEHLIN, J. (1978)
Chloride ions, in B-cell stimulus-secretion coupling.
Diabetologia 15:269 (resumen)
- SENER, A. y MALAISSE, W.J. (1978)
The metabolism of glucose in pancreatic islets.
Diabete Metab. 4:127-133.
- SENER, A., SOMERS, G., DEVIS, G. y MALAISSE, W.J. (1981)
The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced
insulin release. Biosynthetic and secretory responses of
rat pancreatic islet to L-leucine and L-glutamine.
Diabetologia 21:135-142.
- SENER, A. y MALAISSE, W.J. (1984)
Nutrient metabolism in islet cells.
Experientia 40:1026-1035.

SENER, A., VAN SCHAFTINGEN, E., VAN DE WINKEL, M.,
PIPELEERS, G., MALAISSE-LAGAE, F., MALAISSE, W.J. y
HERS, H. (1984)

Effects of glucose and glucagon on the fructose 2,6-biphosphate content of pancreatic islets and purified pancreatic B-cells.

Biochem. J. 221:759-764.

SHARP, D.W., KEMP, C.B., KNIGHT, M.J., BALLINGUER, W.F. y
LACY, P.E. (1973)

The use of ficoll in the preparation of viable islets of Langerhans from the rat pancreas.

Transplantation 16:686-689.

SIEGEL, E., WOLLHEIM, C.B., KIKUCHI, M., RENOLD, A.E. y
SHARP, G.W.G. (1980)

Dependency of cyclic AMP-induced insulin release on intra and extracellular calcium in rat islets of Langerhans.

J.Clin.Invest. 65:233-241.

SKEGGS, L.T. y HOCHSTRASSER, H. (1964)

Multiple automatic sequential analysis.

Clin. Chem. 10:918-936.

SOLS, A. y CRANE, R. (1954)

Substrate specificity of brain hexokinase.

J.Biol. Chem. 210:581-595.

STEVENS, F.C. (1983)

Calmodulin: an introduction.

Can. J. Biochem. Cell. Biol. 61:906-910.

STREB, H., IRVINE, R.F., BERRIDGE, M.J. y SHULZ, S. (1983)

Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-triphosphate.

Nature 306:67-69.

SUGDEN, M.C. y ASHCROFT, S.J.H. (1978)

Effects of phosphoenolpyruvate, other glycolytic intermediates and methylxantines on calcium uptake by a mitochondrial fraction from rat pancreatic islets.

Diabetologia 15:173-180.

SUGDEN, M.C., CHRISTIE, M.R., y ASHCROFT, S.J.H. (1979a)

Presence and possible role of calcium-dependent regulator (calmodulin) in rat islets of Langerhans.

FEBS Lett. 105:95-100.

SUGDEN, M.C. ASHCROFT, S.J.H. y SUGDEN, P.H. (1979b)

Protein kinase activity in rat pancreatic islets of Langerhans.

Biochem. J. 180:219-229.

SUSSMAN, K.E., WAUGHAN, G.D. y TIMMER, R.F. (1966)

An in vitro method for studying insulin secretion in the perfused isolated rat pancreas.

Metabolism 15:466-476.

TAKAI, Y., KISHIMOTO, A., KIKKAWA, V., MORI, T. y

NISHIZUKA, Y. (1979)

Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 91:1218-1224.

TALJEDAL, I.B. (1969)

Presence and possible role of glucose 6-phosphatase in mammalian pancreatic islets.

Biochem. J. 114:387-394.

TAMARIT, J., TAMARIT-RODRIGUEZ, J., GOBERNA, R. y LUCAS, M. (1974a)

Inhibition of insulin secretion "in vitro" by somatostatin.

Rev. Esp. Fisiol. 30:299-302.

TAMARIT, J., GOBERNA, R., TAMARIT-RODRIGUEZ, J., LUCAS, M.,
CEBEIRA, M. y SOBRINO, F. (1974b)

Inhibitory effects of serotonin (5HT) and lisozyme on
glucose induced insulin secretion in the isolated rat
pancreas.

Diabetologia 10:388 (resumen).

TAMARIT, J., GOBERNA, R., SOMOLINOS, R., LUCAS, M. y
PRIETO, J.C. (1976)

Inhibiting effect of thyrocalcitonin upon glucose induced
insulin secretion in isolated perfused pancreas.

Excerta Med. ICS 400:19 (resumen)

TAMARIT-RODRIGUEZ, J., VARA, E. y TAMARIT, J. (1984a)

Starvation-induced secretory changes of insulin, somatos-
tatin, and glucagon and their modification by 2-Bromostearate.

Horm. Metab. Res. 16:115-119.

TAMARIT-RODRIGUEZ, J., VARA, E. y TAMARIT, J. (1984b)

Starvation-induced changes of palmitate metabolism and
insulin secretion in isolated rat islets stimulated by glucose.

Biochem. J. 221:317-324.

THAMS, P., CAPITO, K. y HEDESKOV, C.J. (1984)

Characteristics of an adenylate cyclase enhancig factor from
mouse pancreatic islet cytosol.

Diabetologia 26:375-378.

TOMLINSON, S., WALKER, S.W. y BROWN, B.L. (1982)

Calmodolin and insulin secretion.

Diabetologia 22:1-5.

TRUS, M.D., ZAWALICH, W.S., BURCH, P.T., BERNER, A.K.,
WEILL, A. y MATSCHINSKY, F.M. (1981)

Regulation of glucose metabolism in pancreatic islets.

Diabetes 30:911-922.

UNGER, R.H. (1981)

The milieu interieur and the islets of Langerhans.

Diabetologia 20:1-11.

VALVERDE, I., VANDERMEERS, A., ANJANEYULU, R. y MALAISSE, W.J. (1979)

Calmodulin activation of adenylate cyclase in pancreatic islets.

Science 206:225-227.

VALVERDE, I., SENER, A. y HERCHUELZ, A. (1981)

The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release XL-VII. The possible role of calmodulin.

Endocrinology 108:1305-1312.

VANKO, M. y MEOLA, J. (1978)

SMAC: Sodium ion selective electrode: a preliminary evaluation. En: "Advances in automated analysis, Technicon Congress" Clinical Chemistry Methods, Mediad Inc, New York, pp 37-39.

VON SHAFTINGEN, E., HUE, L. y HERS, H.G. (1980)

Fructose 2-6 biphosphate: the probable structure of the glucose and glucagon sensitive stimulator of phosphofructokinase.

Biochem.J. 192:897-901.

WEICHSELBAUM, T.E. (1946)

Determination of protein of human serum.

Am. J. Clin. Pathol. 16:40-44.

WOLLHEIM, C.B., SIEGEL, E.G., KIKUCHI, M., RENOLD, A.E. y SHARP, G.W.G. (1980)

The role of extracellular Ca^{++} and islet calcium stores in the regulation of biphasic insulin release.

Horm. Metab. Res. Suppl. 10:108-115.

WOLLHEIM, C.B. y SHARP, G.W.G. (1981)

Regulation on insulin release by calcium.

Physiol. Rev. 61:914-973.

YALOW, R.S. y BERSON, S.A. (1959)

Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods.

Nature 21:1648-1649.

ZALL, D.M., FISHER, D. y GARNER, M.Q. (1956)

Photometric determination of chlorides in water.

Anal. Chem. 28:1665-1668.

ZAWALICH, W. S., KARL, R. C., FERRENDELLI, J.A. y
MATSCHINSKY, F.M. (1975)

Factors governing glucose induced elevation of cyclic 3'5'-AMP levels in pancreatic islets.

Diabetologia 11:231-235.

ZAWALICH, W.S., RONGTAD, R., PAGLIARA, A.S. y MATSCHINSKY,
F. M. (1977a)

A comparaisn of the utilization rates and hormone releasing action of glucose, mannose and fructose in isolated pancreatic islets.

J.Biol. Chem. 252:8519-8525.

ZAWALICH, W.S., PAGLIARA, A.S. y MATSCHINSKY, F.M. (1977b)

Effects of iodoacetate, mannoheptulose and 3-O-methylglucose on the secretory function and metabolism of isolated pancreatic islets.

Endocrinology 100:1276-1283.

ZAWALICH, W.S. (1979)

Intermediary metabolism and insulin secretion from isolated rat islets of Langerhans.

Diabetes 28:252-262.

ZAWALICH, W. S., BROWN, C. y RASMUSSEN, H. (1983)

Insulin secretion: combined effect of phorbol ester and A 23187.

Biochem. Biophys. Res. Commun.117:448-455.

FACULTAD DE FARMACIA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D.^o REMERIOS RAMIREZ CARDENAS titulada "ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LA CELULA β DEL PANCREAS ENDOCRINO EN RATAS SOMATIDAS A DIFERENTES DISTAS."

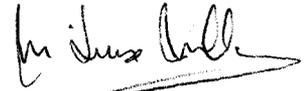
acordó otorgarle la calificación de Apto "Cum laude"

Sevilla, 14 de NOVIEMBRE de 1.986

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,



El Presidente,

El Secretario,

El Doctorado,

