

T. D.
5/7/91

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA. FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA MEDICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 217 número 77 del libro
correspondiente.
Sevilla, 29 MAYO 1991

El Jefe del Negociado de Tesis,

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Antonio Sánchez", written over a horizontal line.

**PAPEL DE LA PANCREASTATINA EN LA HOMEOSTASIS
DE LA GLUCOSA**

**Tesis presentada por el Licenciado
V́ctor Sánchez Margalet
para optar al grado de Doctor en Medicina**

Sevilla, Mayo de 1991

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA. FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA MEDICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**

***PAPEL DE LA PANCREASTATINA EN LA HOMEOSTASIS
DE LA GLUCOSA***

AUTOR: VICTOR SANCHEZ MARGALET

DIRECTOR: RAIMUNDO GOBERNA ORTIZ

Sevilla 1991



AVDA. SANCHEZ PIZJUAN, 4
TELEFONO 37 78 70

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA MEDICA Y
BIOLOGIA MOLECULAR
41009 - SEVILLA

El Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de
Medicina de Sevilla,
con fecha 9 de abril de 1991, acordó conceder la suficiencia investigadora a
D. Víctor Sánchez Margalet.

Sevilla, 15 de abril de 1991

El Director del Departamento



R. Goberna

Fdo: R. Goberna



DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA MEDICA Y
BIOLOGIA MOLECULAR
41009 - SEVILLA

Sánchez Margalet Víctor Manuel, dentro del programa de doctorado "Bioquímica Clínica", ha realizado la tesis en el departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina, con el título "Papel de la pancreastatina en la homeostasis de la glucosa".

D. Raimundo Goberna Ortiz, Catedrático, como Jefe del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular, y como Director de la Tesis de referencia autoriza su presentación.



R. Goberna

Fdo: R. Goberna

Director del Departamento y

Director de la tesis

Sevilla 22 de Mayo de 1991

A Encarni

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Goberna por sus enseñanzas y estímulo constante.

A José María López y Remedios Ramírez, de su mano di los primeros pasos en la investigación endocrinológica.

A Juan Ramón Calvo, por su ayuda en los experimentos con las membranas hepáticas y producción de AMPc, también por facilitarme parte de la bibliografía. Gracias a él pude contactar con el Prof. Marc Laburthe.

Al Prof. Marc Laburthe, que puso a mi disposición todo su material bibliográfico de la Unidad 178 de investigación del Instituto Nacional para la Salud y la Investigación Médicas (INSERM) en París (Francia). Por su generosidad, he podido establecer en el Departamento de Bioquímica una línea tumoral de células secretoras de insulina.

Al Prof. Viktor Mutt del Instituto Karolinska de Estocolmo (Suecia), por enviarnos en el año 1987 la primera muestra de pancreastatina con la que comenzamos a trabajar.

Al Dr. Vaquero del servicio de Análisis Clínicos de la Ciudad Sanitaria Virgen del Rocío, que nos facilitó las determinaciones de catecolaminas plasmáticas.

Al Prof. Lucas por su ayuda en la determinación de la actividad proteina quinasa C, por facilitarme el trabajo con su crítica y discusión científica, así como su material bibliográfico.

Al resto de profesores y compañeros doctores y doctorandos del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular por su estímulo y colaboración.

"Sabéis que en efecto la sangre, como medio interno en el que viven todos los elementos anatómicos del organismo, presenta y debe presentar normalmente, una composición más o menos constante. Entre sus elementos de composición constante se encuentra el azúcar. Ya que esta substancia es superabundante, su exceso es tan sensible al organismo, que el filtro renal la elimina inmediatamente; pero si la fuente hepática continúa produciéndola más de lo normal, los tejidos, a pesar de esta eliminación incesante, están siempre bañados por una sangre demasiado azucarada. Este contacto puede producir en ellos problemas y lesiones materiales, que ellos mismos pueden constituir uno de los peligros de la hiperglucemia. Todavía no sabemos nada sobre el mecanismo patológico de la acción de este exceso de azúcar en la sangre".

Claude Bernard

Leçons sur la Diabète, 1877.

INDICE

	1
I. <u>INTRODUCCION</u>	p 9
1. LOS ISLOTES DE LANGERHANS: LA ORGANIZACION DE UN SISTEMA ENDOCRINO	p 10
2. LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA	p 13
2.1. Estado postprandial	
2.2. Estado postabsortivo	
2.2.1. Glucogenolisis	
2.3. Estado de ayuno	
2.3.1. Gluconeogénesis	
3. MECANISMOS DE ACCION HORMONAL EN EL HIGADO	p 23
3.1. El receptor de la insulina	
3.1.1. Estructura	
3.1.2. Transducción de la señal de la insulina	
3.2. Control hormonal de la glucógenolisis	
3.3. Respuestas mediadas por Ca²⁺ en el hígado	
4. PANCREASTATINA	p 36
4.1. Estructura	
4.2. Actividad biológica	
4.3. Pancreastatina y enfermedad	
5. CROMOGRANINA A	p 45
5.1. Estructura de CGA	
5.2. Funciones de CGA	
5.3. CGA y páncreas endocrino	

	2
6. OBJETIVOS	p 50
II. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	p 52
1. TECNICA DE LA PERFUSION DEL PANCREAS AISLADO	p 53
1.1. Descripción de la técnica operatoria	
1.2. Descripción del método de perfusión	
1.2.1. Circulación del líquido de perfusión	
1.2.2. Oxigenación del líquido de perfusión	
1.2.3. Registro de la presión de perfusión	
1.2.4. Mantenimiento de la temperatura	
1.2.5. Conexiones y cámara de perfusión	
1.2.6. Infusión de sustancias en el pancreas	
1.2.7. Obtención de las muestras	
1.2.8. Líquido de perfusión	
2. ESTUDIO IN VIVO DE LA GLUCOGENOLISIS HEPATICA Y LA REGULACION DEL PANCREAS ENDOCRINO	p 64
2.1. Animales	
2.2. Diseño experimental	
2.3. Preparación de péptidos	
2.4. Aislamiento y cuantificación del glucógeno hepático	
2.4.1. Aislamiento del glucógeno hepatico	
2.4.2. Determinación del glucógeno	
2.5. Determinación de la glucosa	

2.6. Determinación de la insulina

2.6.1. Fundamento de la prueba

2.7. Determinación del glucagón

2.7.1. Fundamento de la prueba

3. ESTUDIO IN VIVO DE LAS CATECOLAMINAS PLASMATICAS 75

3.1. Animales

3.2. Diseño experimental

3.3. Determinación de catecolaminas plasmáticas

4. AISLAMIENTO E INCUBACION DE HEPATOCITOS

p 77

4.1. Antecedentes

4.2. Aparato de perfusión

4.3. Medio de perfusión y resuspensión de hepatocitos

4.3.1. Medio de perfusión

4.3.2. Medio de resuspensión

4.4. Perfusión hepática. Técnica operatoria

4.5. Desarrollo de la perfusión

4.6. Aislamiento de hepatocitos

4.6.1. Test de viabilidad de los hepatocitos

4.7. Estudio de producción de glucosa y lactato por los hepatocitos

4.7.1. Procedimiento

4.7.2. Determinación de glucosa

4.7.3. Determinación de lactato

- 5. AISLAMIENTO DE MEMBRANAS PLASMATICAS DE HIGADO DE RATA** p 84
- 5.1. Material
- 5.2. Método
- 6. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ADENIL-CICLASA** p 88
- 6.1. Producción de AMPc por hepatocitos aislados
- 6.1.1. Reactivos
- 6.2.2. Incubación
- 6.2. Producción de AMPc por las membranas hepáticas
- 6.2.1. Reactivos
- 6.2.2. Incubación
- 6.3. Determinación de AMPc
- 7. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEINA QUINASA C** 93
- 7.1. Obtención de la fracción cruda citosólica
- 7.2. Reactivos
- 7.3. Método
- 8. REACTIVOS Y APARATOS** p 96
- 8.1. Reactivos
- 8.2. Aparatos
- 9. ANALISIS ESTADISTICO** p 98

III. RESULTADOS Y DISCUSION

5

p 99

1. EFECTO DE LA PANCREASTATINA SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN PANCREAS AISLADO Y PERFUNDIDO

p 100

1.1. Discusión

2. ACCION DE LA PANCREASTATINA SOBRE EL PANCREAS ENDOCRINO Y LA GLUCOGENOLISIS HEPATICA IN VIVO

p 103

2.1. Efecto de la pancreastatina sobre la glucemia, insulina y glucagón plasmático. Comparación con el glucagón y el VIP

2.2. Efecto del fragmento C-terminal de la pancreastatina (33-49) sobre la glucemia, la insulina y el glucagón plasmáticos.

2.3. Efecto combinado de pancreastatina + glucagón y fragmento C-terminal (33-49) + glucagón sobre la glucemia y la insulina plasmática

2.4. Efecto de la pancreastatina sobre la glucogenolisis hepática in vivo. Comparación con el glucagón y el VIP

2.5. Discusión

3. EFECTO DE LA PANCREASTATINA SOBRE LA SECRECION DE CATECOLAMINAS IN VIVO

p 119

3.1. Discusión

4. EFECTO DE LA PANCREASTATINA SOBRE LA PRODUCCION DE GLUCOSA Y LACTATO EN HEPATOCITOS AISLADOS. COMPARACION CON GLUCAGON Y VASOPRESINA

p 122

4.1. Estimulación hormonal de la producción de glucosa

4.2. Dosis-respuesta de la estimulación hormonal en la producción de glucosa

4.3. Dosis-respuesta de la inhibición hormonal de la producción de lactato

4.4. Dependencia de Ca^{2+} Del efecto hormonal sobre la liberación de glucosa

4.5. Discusión

5. ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCION DE LA

PANCREASTATINA EN LOS HEPATOCITOS

p 13

IV. EPILOGO

p 143

V. CONCLUSIONES

p 149

VI. BIBLIOGRAFIA

P 153

ABREVIATURAS

aa: Aminoácidos.

ABTS: Azino-di-etil-benzotiazolina.

Ac: Anticuerpo.

Ag: Antígeno.

Ag*: Antígeno marcado radiactivamente con ^{125}I .

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico.

ATP: Adenosín trifosfato.

BG: Betagranina.

BSA: Albúmina sérica bovina.

CaM: Calmodulina.

CCK: Colecistoquinina.

CGA: Cromogranina A.

DG: Diacilglicerol.

DMNID: Diabetes mellitus no insulín dependiente.

DNA: Acido desoxirribonucléico.

EGTA: Acido etilenglicolaminotetraacético.

ELISA: Enzima-inmuno-análisis.

ESM: Error estandar de la media.

GDP: Difosfato de guanosina

GH: Hormona del crecimiento.

GIP: Péptido inhibidor gástrico o insulíntrópico dependiente de insulina.

GTP: Trifosfato de guanosina.

h: Horas.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

IBMX: 3-isobutil-1-metil xantina.

IP₂: Inositol 4,5 difosfato.

IP₃: Inositol 1,4,5 trifosfato.

M: Molar.

min: minutos.

PAM: Monoxigenasa de amidación de peptidil-glicina.

PIP₂: Fosfatidil-inositol 4,5 difosfato.

PKC: Protein quinasa C.

POD: Peroxidasa-O-dianisina.

PST: Pancreastatina.

TB: Tris 50 mM suplementado con BSA 2%.

TBB: Tris 50 mM suplementado con BSA 2% y bacitracina 2 mg/ml.

TCA: Acido tricloroacético.

TRH: Hormona liberadora de hormona tireotropa.

VIP: Péptido intestinal vasoactivo.

I. INTRODUCCION

1. LOS ISLOTES DE LANGERHANS:

ORGANIZACION DE UN SISTEMA ENDOCRINO

La estructura y la función de la célula B debe ser entendida en un contexto tanto ontogénico como evolutivo para comprender mejor su contribución al sistema neuroendocrino difuso, y su conexión funcional con la mucosa del tracto gastrointestinal. El ejemplo más claro es la específica constitución celular de los islotes de Langerhans según su localización dentro del páncreas, el cual se desarrolla a partir de dos brotes endodérmicos (dorsal y ventral), que parten del tubo digestivo y que conservarán con el desarrollo una diferente vascularización. Así, el brote dorsal dará lugar al lóbulo esplénico (cuerpo y cola) cuyos islotes son ricos en células A productoras de glucagón; y el brote ventral dará lugar al lóbulo duodenal (cabeza), con unos islotes ricos en células PP productoras de polipéptido pancreático, manteniéndose homogénea la proporción de células B y D (Orci 1982, López 1986).

En el curso de la evolución, los péptidos reguladores neurohormonales parecen haberse originado en el sistema nervioso, y más tarde localizarse en las células endocrinas que se desarrollan en las especies más evolucionadas de invertebrados. Esta localización dual de los péptidos reguladores se mantiene en todo el reino animal (Van Noorden 1984). En los vertebrados queda ejemplificado en el eje cerebro-tubo digestivo (Reinecke y Forssmann 1984).

Las células neuroendocrinas reguladoras del metabolismo de los carbohidratos evolucionaron a partir de poblaciones de células dispersas en animales vertebrados,

y se convirtieron en órganos endocrinos separados en la mayoría de los vertebrados mas desarrollados (Falkmer et al 1984), en los que persistió una estrecha conexión funcional entre la mucosa gastrointestinal con sus células endocrinas y los islotes via el eje "enteroinsular" (Creutzfeldt 1979), del cual el péptido inhibidor gastrico (GIP), hoy conocido como péptido insulínico dependiente de glucosa, es uno de los constituyentes identificados.

La ontogenia de los islotes de mamíferos parece seguir el origen filogénico. Durante los primeros estadios de embriogénesis, en asociación con la deslaminación ectodermal, algunas células deben adquirir una determinación especial para su futura diferenciación, marcada por la adquisición de la capacidad de captar y decarboxilar precursores de aminas (una característica neural). Estas células constituyen el sistema neuroendocrino difuso (Pearse y Takor-Takor 1979). El sistema gastro-entero-pancreatico es el componente de la división periférica de este sistema, y comprende mas de 20 tipos de células endocrinas. Ha sido descrito como el mayor órgano endocrino de la economía.

La inervación parasimpática y simpática de los islotes, así como sus funciones respectivas de inducir hipoglucemia (la acetil colina) e hiperglucemia (adrenalina y noradrenalina) han sido bien evaluados (Beriter et al 1981; Amenta et al 1983; Campfield y Smith 1983). Sin embargo, el papel funcional de las inervaciones serotoninérgicas y dopaminérgicas (Bird et al 1980; Koevary et al 1980 y 1983; Lindstrom 1982), GABAérgicas (Gerber y Hare 1979; Reusens-Billen et al 1984) y peptidérgicas (VIP, encefalinas, sustancia P, CCK, NPY, galanina) (Rehfeld et al 1980; Bishop et al 1980; Smith y Madson 1981; Sundler et al 1983; Bauer et al

1986) permanece por aclarar. Más aún, las células del islote contienen aminas y péptidos neurales diferentes de sus propios productos hormonales (Larsson 1980; Hakanson 1983). La naturaleza paraneuronal de estas células endocrinas es la expresión mas evidente de sus características (Fujita y Kobayashi 1981).

Por el momento sin embargo, el significado funcional de las intrincadas relaciones del sistema nervioso durante el desarrollo de los islotes es desconocido. La inervación definitiva no parece necesaria para la adecuada formación de los islotes, como se demuestra por el cultivo in vitro de rudimentos pancreaticos; aunque una posible actividad moduladora neural debe intervenir. En los últimos estadíos del desarrollo, la íntima inervación de células endocrinas y capilares es aparente, y receptores para neuromediadores están presentes en las células del islote (Milner y De Gasparo 1981). Por otra parte, su origen relacionado con el primordio del tracto gastrointestinal apoya la existencia de un eje gastroenteropancreático (Sundler y Hakanson 1984), que ha sido substanciado por estudios estructurales, bioquímicos y clínicos (Steiner et al 1984).

En el feto humano no se encuentran células endocrinas a las 7 semanas, pero a las 9 semanas ya se encuentran células A, B, D y PP en islotes primitivos o en células aisladas adyacentes a las células ductales (Like y Orci 1972; Stephan et al 1982; Clark y Grant 1983). La aparición de células productoras de gastrina en los islotes fetales duran poco tiempo y estan ausentes en los islotes adultos.

2. LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

La homeostasis de la glucosa requiere unos mecanismos apropiados que respondan a la provisión intermitente de nutrientes exógenos. Tras la ingestión de comida se activan procesos de almacenamiento, mientras que durante los períodos de ayuno se activan procesos requeridos para la liberación de energía. Así pues la regulación de la homeostasis de la glucosa determina la capacidad del organismo de sobrevivir a los cambios imprevisibles de aporte y demanda de energía.

La concentración normal de glucosa en sangre en un individuo en ayunas oscila entre 80 y 120 mg/dl. Después de una comida que contenga carbohidratos, esta cifra se incrementa para volver en unas horas a los niveles basales. Si el período de ayuno se prolonga, la glucosa desciende pero nunca por debajo de 50-60 mg/dl. Es decir, en el hombre, los niveles de glucosa se mantienen dentro de ciertos límites, aún en las condiciones más adversas. La razón fundamental es que el sistema nervioso requiere un aporte continuo de glucosa, siendo esta en condiciones normales, la única fuente energética. Sólo después de períodos de ayuno prolongado, el sistema nervioso comienza a metabolizar cuerpos cetónicos.

Una parte fundamental de esta regulación se debe al sistema endocrino donde intervienen las catecolaminas, las hormonas gastrointestinales y fundamentalmente, la insulina y el glucagón. En efecto, después de incrementar la glucosa en sangre por encima de 120 mg/dl comienza a estimularse la célula B de los islotes de Langerhans. En segundos, esta célula B segrega insulina. La relación entre concentración de glucosa circulante y secreción de insulina no es lineal (Goberna

1978). Se trata de un sigmoide, donde la rama ascendente comienza entre los 120 y 140 mg/dl. La célula está preparada para responder cuando la glucosa sobrepasa los 120 mg/dl. Por debajo de esta cantidad la secreción de insulina se mantiene baja (Goberna 1978). Globalmente, puede decirse que después de una comida rica en carbohidratos, la concentración de insulina en sangre aumenta 4 ó 5 veces sobre los niveles basales.

El sistema es muy sensible, y los incrementos, tanto de la glucosa como del subsiguiente de insulina, pueden ser moderados si la absorción de la glucosa en el tubo digestivo es más lenta. En efecto, los alimentos naturales deben ser degradados en el tubo digestivo antes de su absorción, lo que enlentece el transporte de monómeros como la glucosa. Los carbohidratos en forma de sacarosa o glucosa necesitan una mínima o ninguna degradación y son rápidamente transportados a la sangre. La hiperglucemia resultante es compensada por una secreción de insulina que es capaz de normalizar la glucemia. Pero la insulina tiene otros efectos, como por ejemplo una acción lipogénica. Puede comenzar así un círculo hiperglucemia--> hiperinsulinemia--> obesidad--> resistencia a la insulina--> hiperglucemia, que puede conducir a un deterioro de la asimilación de la glucosa con hiperinsulinismo. En algunos casos esta situación termina en una diabetes no insulín dependiente o diabetes del adulto. Este es uno de los motivos de la recomendación de tomar carbohidratos no purificados en la dieta, así como el añadir fibra a los alimentos, con el fin de retardar la absorción de la glucosa y disminuir la respuesta insulínica.

Por el contrario, como veremos más adelante, el ayuno provoca un descenso de la glucosa sólo hasta ciertos límites gracias a la acción del glucagón (Foa et al

la glucosa se eleva. De este modo, determinados tejidos, como el sistema nervioso central, siempre tienen el aporte necesario de glucosa.

Sin embargo, esta regulación se complica con otras hormonas (Orci 1982), cuyas acciones son difíciles de interpretar en ocasiones. Así la somatostatina inhibe la secreción de insulina y glucagón con independencia de la glucosa. El polipéptido pancreático aumenta su secreción ante un estímulo vagal o tras una comida rica en proteínas, sin que sepamos su significado fisiológico.

Por otra parte, las hormonas gastrointestinales están relacionadas con el páncreas endocrino. La pancreocimina (Goberna 1971, Pfeiffer 1970), el péptido inhibidor gástrico (GIP) (Tze 1975) o el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Arilla 1981) son estimuladores de la secreción de insulina, incluso antes de aumentar la glucemia, probablemente por las relaciones entre la mucosa intestinal y los islotes, el llamado eje enteroinsular.

Así pues, la fisiología de la regulación de la glucemia depende del momento fisiológico, que podríamos dividir en estado postprandial, estado postabsortivo y el estado de ayuno.

2.1. ESTADO POSTPRANDIAL

La concentración plasmática de glucosa depende de la cantidad de comida ingerida (Sevice et al 1983), su composición (Crapo et al 1976, 1977) y la hora del día de su ingesta (Service et al 1983).

La insulina es el principal modulador de la homeostasis de la glucosa (Madison 1969 y Wall et al 1957) (Tabla 1).

Tabla I. Control hormonal de la homeostasis de la glucosa. La adrenalina es aproximadamente diez veces mas potente que la norepinefrina, y su acción esta principalmente mediada por un mecanismo β -adrenérgico.

Hormona	Producción hepática de glucosa	Utilización extrahepática de glucosa	Producción de glucosa basal
Insulina	↓	↑	↓
Glucagón	↑	-	↑
Catecolaminas	↑	↓	-
Cortisol	↑	↓	↑
GH	↑	↓	-

El incremento en la concentración de glucosa e incretinas (principalmente el péptido inhibidor gástrico) que sigue a la ingestión de comida estimula la secreción de insulina. La insulina suprime la producción de glucosa hepática y estimula la utilización de la glucosa. Estudios isotópicos de producción de glucosa han mostrado que el 90% o más de la glucosa ingerida (Perley y Kipnis 1967; Radzius et al 1978; Pehling et al 1984) alcanza la circulación periférica. Sin embargo, como la producción hepática de glucosa se reduce en un 60-70% postprandialmente, la adición neta de glucosa a la circulación periférica se reduce en alrededor de un 35%. La elevación postprandial de los niveles plasmáticos de insulina por un lado, favorece la formación de glucógeno al activar la glucógeno sintetasa y suprimir a la fosforilasa (Larner et al 1978); y por otro disminuye la concentración de precursores gluconeogénicos (Manchester 1970), aminoácidos de cadena ramificada (Carlsten et al 1965), ácidos grasos libres (Zierler y Rabinowitz 1963) y cuerpos cetónicos (Balasse y Havel 1971). La supresión de la producción de glucosa (Rizza et al 1981) y la inhibición de glucogenolisis (Chiasson et al 1976) son más sensibles a incrementos de la concentración plasmática de insulina que la estimulación de la utilización de la glucosa y la inhibición de la gluconeogénesis. Tras la ingestión de 100 g de glucosa, alrededor de 10 g de glucógeno se forman directamente de la captación de la glucosa y de 10 a 15 g se forman por gluconeogénesis (Radziuk 1978 y 1982).

Al ir disminuyendo la glucosa del tracto intestinal y con el predominio de la utilización de la glucosa sobre su producción al final del período postprandial, la concentración plasmática de glucosa cae y consecuentemente la concentración de insulina plasmática disminuye.

2.2. ESTADO POSTABSORTIVO

Alrededor de las 4 a 6 horas tras la ingestión de la comida, la concentración plasmática de glucosa es de 80 a 90 mg/dl y los valores de utilización y producción de glucosa son aproximadamente de 2 mg/kg.min. La producción de glucosa es principalmente (70-80%) a partir de la glucogenolisis hepática, con una contribución menor (20-25%) de la gluconeogénesis (Dietze et al 1976; Wahren et al 1971; Nilsson 1973). Tras una noche de ayuno el hígado contiene 40-50 g de glucosa en forma de glucógeno. Si se supone una utilización obligatoria de 1-1.5 mg/Kg.min, las reservas de glucógeno se terminarían tras 24-36 h de ayuno. En el estado postabsortivo, el glucagón estimula la producción de glucosa incrementando la glucogenolisis (Cherrington et al 1976) y la gluconeogénesis (Exton 1972) e inhibiendo la glucolisis (Larner et al 1978). El glucagón activa la glucógeno fosforilasa e inactiva la glucógeno sintetasa (Hers 1976). No se conoce que el glucagón tenga efecto directo sobre la captación extrahepática de glucosa (Pozefsky et al 1976). Niveles basales de catecolaminas no parecen influir en la homeostasis de la glucosa en el estado postabsortivo (Chon et al 1979; Mjendahl et al 1979; Silverberg et al 1978).

El cortisol parece tener un efecto permisivo sobre el metabolismo de la glucosa. Se necesita su presencia para la síntesis normal del glucógeno (Long et al 1950; Altszuler et al 1968) y para acelerar la producción de glucosa por el glucagón y la adrenalina (Sutherland y Rall 1960) . El cortisol antagoniza las acciones de la insulina y por ello acelera la gluconeogenesis, la lipolisis (Havel y Goldfein 1959), la cetogénesis (Schade et al 1978) y la proteolisis (Smith y Long 1967) y disminuye la utilización de la glucosa (Riddick et al 1962; Munck 1962). El efecto hiperglucémico del cortisol no es inmediato sino retrasado en 2 horas (Gerich et al 1981). El cortisol también disminuye la sensibilidad hepática y extrahepática a insulina (Rizza et al 1981).

2.2.1. Glucogenolisis

El glucógeno es un polímero que sirve como reservorio para la glucosa. Aunque el glucógeno se almacena en el hígado y el músculo esquelético, sólo el hígado posee el enzima (glucosa 6-fosfatasa) capaz de producir glucosa libre. En el músculo, el metabolismo del glucógeno produce finalmente lactato, el cual tras ser transportado al hígado puede entrar en la vía gluconeogénica (ciclo de Cori).

La glucogenolisis afecta la actividad de varias enzimas. La fosforilasa, que es estimulada por el glucagón y la adrenalina pero inhibida por la insulina; libera glucosa-1-fosfato de uniones -1-4 hasta 3-5 unidades de glucosa, hasta que llega al punto de ramificación -1-6. Tras la acción de la oligo 1,4-1,6 glucán transferasa (enzima desramificador) que rompe los enlaces 1-6, la actividad de fosforilasa continúa. Amilo 1,6 glucosidasa libera glucosa libre. La fosfoglucomutasa convierte

la glucosa-1-fosfato en glucosa-6-fosfato, la cual puede ser hidrolizada en glucosa libre por la glucosa-6-fosfatasa. Puesto que esta última enzima sólo está presente en el hígado y el riñón, sólo estos órganos pueden suministrar glucosa libre. Un déficit de glucosa-6-fosfatasa producen una severa hipoglucemia. En cambio, un déficit de fosforilasa y enzimas desramificadores causan grados leves de hipoglucemia (Hems y Whitton 1980; Field 1966).

Aproximadamente la mitad de la glucosa utilizada (1 mg/kg.min) se emplea en la captación obligada de glucosa por el cerebro no mediada por insulina (Huang et al 1980). Hay que destacar que cuando la glucosa plasmática en pacientes con insulinoma alcanza concentraciones de hipoglucemia, la tasa de utilización de glucosa es de 1.3 mg/Kg.min (Rizza et al 1981).

En el estado postabsortivo, el consumo diario de glucosa por una persona de 70 kg es aproximadamente de 30 g por los músculos, 120 g por el cerebro, 34 g por los elementos formes de la sangre y 2 g por la médula adrenal (Cahill y Owen 1968; Jackson et al 1984).

2.3. ESTADO DE AYUNO

Tras varios días de ayuno, la concentración de glucosa cae hasta 45-60 mg/dl; estos niveles se pueden mantener durante varias semanas (Owen y Reichard 1971). La tasa de utilización de glucosa disminuye hasta aproximadamente 1 mg/Kg.min en la que permanece constante (Wahren et al 1977).

Durante este período, las concentraciones de ácidos grasos libres y cuerpos cetónicos se incrementan y sirven como fuente de energía para el músculo (Havel

1972). Es más, los cuerpos cetónicos sustituyen a la glucosa como el combustible predominante para los tejidos neurales, reduciéndose así la captación obligada de glucosa por el cerebro (Owen et al 1967). Se sabe que las mujeres no toleran tan bien el ayuno como los hombres (Merimee y Fineberg 1973).

2.3.1. Gluconeogénesis

La gluconeogénesis es el proceso por el cual se sintetiza nueva glucosa a partir de precursores no carbohidratados. Puesto que este proceso mantiene la producción de glucosa después de la depleción del glucógeno, la hipoglucemia que se alcanza tras fallar la gluconeogénesis, sólo será evidente después de un ayuno prolongado. El lactato, el piruvato, el glicerol y los aminoácidos son los posibles sustratos gluconeogénicos. Puesto que no todas las enzimas glucolíticas son reversibles, otra serie de enzimas (piruvato carboxilasa, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, fructosa-1-6-difosfatasa y glucosa-6-fosfatasa) son necesarias para la conversión de sustratos gluconeogénicos en glucosa libre. La contribución relativa a la gluconeogénesis es la siguiente: lactato y piruvato, 60%; glicerol, 13%; y aminoácidos, 29% (Nilsson y Hultman 1973). La disponibilidad de sustrato puede ser un importante modulador de la gluconeogénesis, ya que las concentraciones de estos precursores en el estado postabsortivo están por debajo de las necesarias para los niveles máximos de la gluconeogénesis (Exton y Park 1967).

El lactato proviene fundamentalmente de los eritrocitos, músculo esquelético, cerebro y piel (Kreisberg 1972). El tejido adiposo es la fuente de glicerol. El músculo esquelético es la fuente principal de alanina y glutamina, los sustratos

aminoácidos más importantes para la gluconeogénesis (Felig 1973). La alanina se forma fundamentalmente de la transaminación del piruvato a partir de aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina) que actúan como donadores, suponiendo un 60% del nitrógeno de la alanina (Haymond y Miles 1981). La importancia de los aminoácidos en la homeostasis de la glucosa durante el ayuno queda ilustrada por la hipoglucemia que ocurre cuando se reduce la disponibilidad de alanina por una alteración en el metabolismo de la leucina en la enfermedad del jarabe de Arce (Haymond et al 1978).

La gluconeogénesis a partir de alanina está incrementada en un 100% tras 48 h de ayuno. En ayuno mas prolongado la contribución de la alanina a la gluconeogénesis disminuye (Chiasson et al 1978). En cambio, la concentración de lactato no disminuye durante el ayuno prolongado y su contribución a la gluconeogénesis permanece constante en un 50% por encima de los niveles postabsortivos (Kreisberg 1972).

3. MECANISMOS DE ACCION HORMONAL EN EL HIGADO

Dado que la membrana plasmática constituye un obstáculo para las hormonas peptídicas, es necesario que su mensaje sea transmitido al interior celular por medio de otras moléculas de la propia membrana y del citosol celular. Tal transmisión, a pesar de producirse por mecanismos complejos, es rápida.

Una vez que la hormona se ha combinado con su receptor, la molécula de éste sufre un cambio conformacional que aumenta su afinidad por otros componentes de la membrana los cuales, a su vez, activan sistemas efectores de la acción hormonal a través de los denominados "segundos mensajeros".

En la membrana plasmática existen tres de estos sistemas efectores que regulan los niveles de intracelulares de los segundos mensajeros. Tales sistemas son:

- 1.- Sistemas generadores de nucleótidos cíclicos como el AMPc (3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina).
- 2.- Enzimas de la membrana plasmática que modifican la concentración y distribución de Ca^{2+} en el interior celular.
- 3.- Receptores (como por ejemplo el de la insulina) que poseen intrínsecamente actividad tirosina-quinasa.

3.1. EL RECEPTOR DE LA INSULINA

Los primeros estudios bioquímicos indicaban que el receptor de la insulina era un oligómero con 2 cadenas α y 2 β (fig. 1), con pesos moleculares de 130.000 y 95.000 respectivamente y unidas por dos puentes disulfuro (Czech y Massague 1982; Jacobs y Cuatrecasas 1981). Las dos subunidades están glicosiladas, lo que indica que ambas tienen dominios extracelulares (Herzberg et al 1985). El receptor se sintetiza inicialmente como un proreceptor con un peso molecular de 210.000, que al ser roto da las cadenas maduras α y β (Hedo et al 1983; Jacobs et al 1983). Este posreceptor es ya capaz de ligar a la insulina; sin embargo su afinidad es significativamente menor (Blackshear et al 1983; Rees-Jones et al 1983). Estudios de cross-linking usando insulina marcada con I-125 han mostrado que el dominio del receptor maduro que se une a la insulina se encuentra fundamentalmente en la subunidad α (Jacobs et al 1979; Pilch y Czech 1979; Yip et al 1980). Además, la proteólisis de la subunidad β no altera apreciablemente la unión con la insulina (Roth et al 1983; Shia y Pilch 1983). La subunidad α es fundamentalmente extracelular y la subunidad β esta compuesta por un dominio intracelular y otro extracelular. (Hedo y Simpson 1984). Así pues, el receptor contiene un dominio transmembrana en la subunidad β que lo ancla en la membrana plasmática.

La unión de la insulina a la subunidad α induce una rápida fosforilación del dominio intracelular de la subunidad β (Kasuga et al 1982, 1982). La subunidad β contiene un posible sitio de unión a ATP, como se ha visto por marcajes de afinidad a ATP (Roth y Cassell 1983; Van Obberghen et al 1983). Más tarde se identificaría la actividad intrínseca quinasa dependiente de tirosina, que formaba parte del

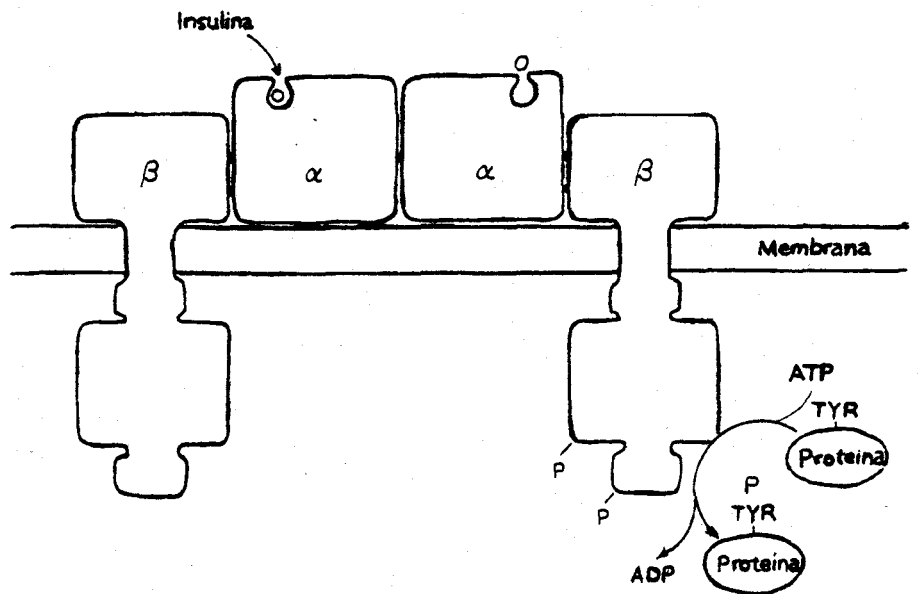


Fig. 1. Estructura del receptor de la insulina. Las cadenas alfa están en el exterior de la membrana y contienen el dominio de unión a la insulina. Las cadenas beta atraviesan la membrana, y el dominio intracitoplasmático es el que tiene actividad tirosina quinasa.

receptor. La actividad enzimática del receptor es activada por la unión a la insulina, lo que produce un incremento en la tirosin-fosforilación de la subunidad β así como otras proteínas celulares.

3.1.1. Transducción de la señal de la insulina

Un número creciente de receptores de hormonas de crecimiento (como por ejemplo la insulina, factor de crecimiento I o "insulin-like", el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas y el factor estimulador de colonias tipo I) y oncogenes (src, abl, fgr) presentan actividad intrínseca tirosina quinasa (Hanks et al 1988; Hunter y Cooper 1985). Todas estas proteínas son importantes en el crecimiento celular, desarrollo y procesos metabólicos. Es por tanto tentador especular que la actividad tirosina quinasa es un importante mediador de la respuesta celular asociado a estas proteínas. De hecho, hay una gran cantidad de evidencias implicando las actividades tirosina quinasa de estas diferentes proteínas con sus actividades biológicas (Yarden y Ullrich 1988; Hunter y Cooper 1988). En el caso del receptor de la insulina, la mutagénesis dirigida del residuo de lisina, implicado en la unión a ATP (residuo 1030) fue empleado para probar el papel de la quinasa de receptor en la acción de la insulina (Ebina et al 1987; Chou et al 1987; McClain et al 1987). Si en lugar de la lisina se coloca una arginina, alanina o metionina, resulta que el receptor une normalmente a la insulina pero no tiene actividad kinasa. El conjunto de la estructura del receptor no parecía afectarse ya que el receptor reaccionaba normalmente con anticuerpos monoclonales específicos de diferentes conformaciones (Ebina et al 1987). Estos receptores no eran capaces

de producir algunas respuestas biológicas, como la captación de 2-deoxiglucosa, la fosforilación ribosomal S6, la incorporación de timidina, y la síntesis de glucógeno. Estos datos suponen que la quinasa es esencial para la mediación de la acción de la insulina. Otra manera de probar el papel de la quinasa del receptor es utilizando un anticuerpo monoclonal que se une e inhibe el dominio quinasa del receptor de la insulina. Este anticuerpo también producía una inhibición en varias respuestas a la insulina (Morgan y Roth 1987).

La función más probable de la quinasa del receptor es la fosforilación de substratos endógenos, que median las respuestas a la insulina. La quinasa intrínseca puede actuar ocasionando cascadas de quinasas, fosfatasas, u otras clases de segundos mensajeros. Ha habido muchos intentos de identificar y caracterizar fisiológicamente substratos relevantes para la proteína kinasa del receptor de la insulina (White et al 1985, Bernier et al 1987, Margolis et al 1988). Sin embargo, no se han presentado evidencias que indiquen que alguno de estos posibles substratos son esenciales mediadores de la acción de la insulina.

El dominio con actividad quinasa del receptor de la insulina también contiene varios locus de autofosforilación. Algunos estudios demostraron que el receptor autofosforilado permanecía activado incluso tras separarse de la insulina (Rosen et al 1983). La tirosina 1162 ocupa una posición equivalente al sitio de mayor autofosforilación del producto proteico del oncogen viral src; este residuo se autofosforila en el receptor y tiene un papel regulador. Además, la tirosina 1163 y 1158 también se autofosforilan y juegan un papel en la activación de la quinasa del receptor (Herrera y Rosen 1986; Tornqvist et al 1988; White et al 1988; Ellis et al

1986). El receptor autofosforilado se une específicamente a anticuerpos antipeptido más fácilmente que el receptor no fosforilado. Se podría pensar que la fosforilación de estos residuos de tirosina añaden suficiente carga negativa para hacer el sitio activo del receptor más accesible a los substratos, y que estos substratos fosforilados inducirían las acciones de la insulina. Por otro lado, se podría también pensar que la autofosforilación cambia la estructura del receptor de forma que interaccionaría con una proteína próxima, y activaría algunas propiedades de esta proteína sin fosforilarla.

Además de ser fosforilada en los residuos de tirosina, la subunidad β también es fosforilada en serinas y treoninas. Dos serina/treonina quinasas, la proteína quinasa dependiente de AMPc y la proteína quinasa C, fosforilan el dominio citoplasmático del receptor de la insulina (Bollag et al 1986; Roth y Beaudoin 1987). Además, una nueva quinasa dependiente de insulina también fosforilaría la subunidad β (Czech et al 1988, Smith et al 1988). Esta fosforilación de serina y treonina parece regular negativamente la actividad tirosina quinasa del receptor de la insulina (Takayama et al 1984, 1988). Esto podría explicar los efectos negativos de la adrenalina y el glucagón, hormonas que activan la proteína quinasa dependiente de AMPc, sobre la respuesta a insulina (Håring et al 1986; Stadtmauer y Rosen 1986). La excesiva fosforilación de serina del receptor podría también explicar la disminución reversible de la actividad tirosina quinasa observada en la diabetes no insulino dependiente (Freidenberg et al 1987; Caro et al 1986; Comi et al 1987; Takayama et al 1988).

3.2 CONTROL HORMONAL DE LA GLUCOGENOLISIS (Stalmans 1976; Hers 1976, 1980; Hue 1979) y Hems y Whitton 1980). Fig. 2.

La enzima glucógeno-fosforilasa cataliza la etapa limitante de las reacciones por las que el glucógeno se degrada a glucosa en el hígado. Hay dos formas de fosforilasa en el hígado; una forma activa (fosforilasa a) y otra considerablemente menos activa (fosforilasa b) que se interconvierten por reacciones específicas catalizadas enzimáticamente. La fosforilasa a se forma a partir de fosforilasa b por fosforilación de esta última enzima, catalizada por la fosforilasa quinasa. La fosforilasa b se forma a partir de la fosforilasa a por una desfosforilación catalizada por una fosfatasa que, a diferencia del músculo, parece específica de la fosforilasa a. La fosforilasa quinasa existe también en dos formas, activa e inactiva (o menos activa); la activación tiene lugar por otra reacción de fosforilación, catalizada en este caso por la enzima proteína quinasa, mientras que la inactivación la cataliza una proteína fosfatasa. Las formas activas e inactivas de fosforilasa b quinasa hepática se activan con Ca^{2+} . La actividad de la proteína quinasa A se controla por la concentración de AMPc, el cual se regula a su vez por las actividades de adenilato ciclasa y fosfodiesterasa. La adenilato ciclasa tiene dos subunidades. Una subunidad catalítica y otra reguladora acoplada a un receptor peptidérgico, el cual al unirse a la hormona separa las dos subunidades, liberando la subunidad catalítica que cataliza la transformación de ATP en AMPc. En este mecanismo está implicada una proteína de transferencia regulada por el GTP. La fosfodiesterasa a su vez es regulada por derivados xantínicos que la inhiben y la Ca^{2+} -calmodulina que la estimula (aunque con una K_m elevada).

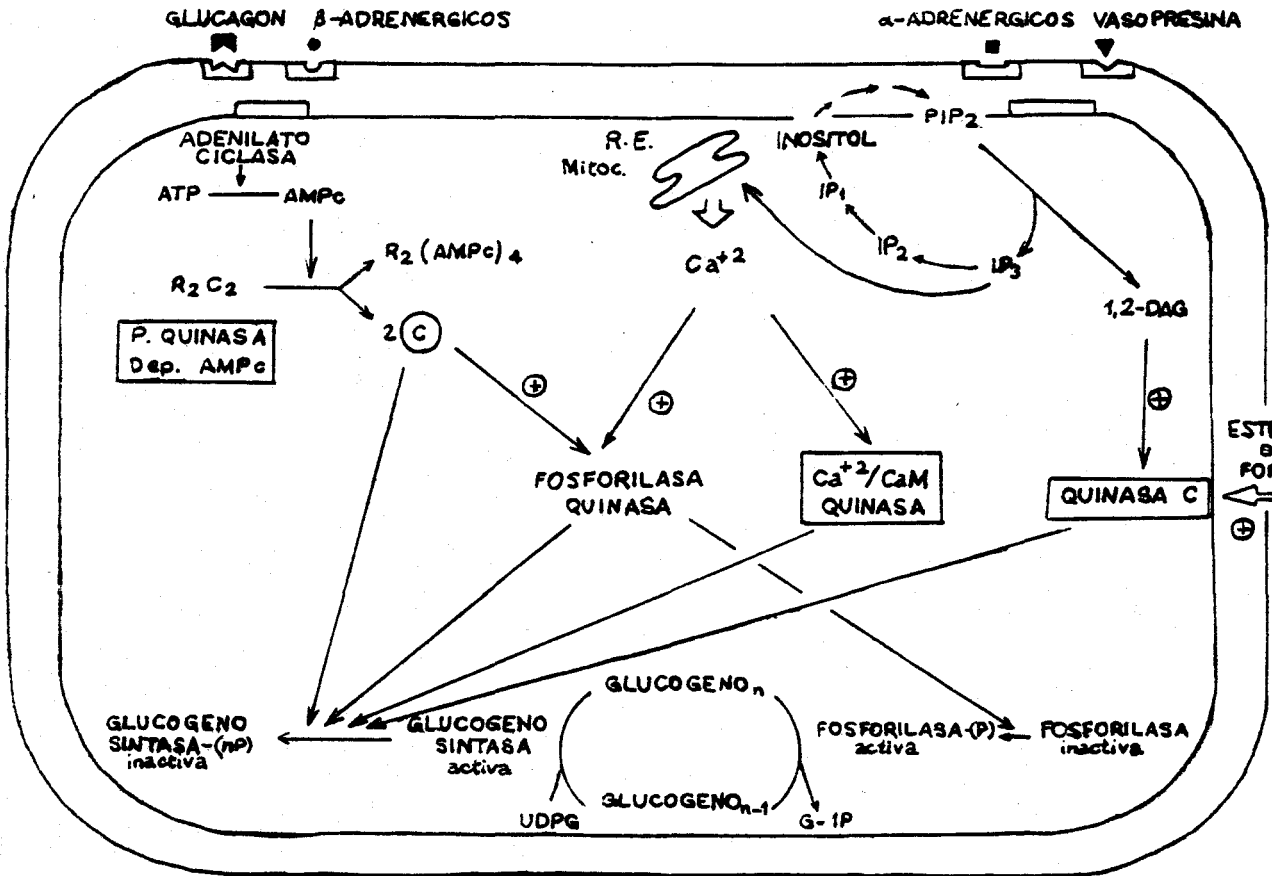


Fig. 2. Esquema general de la regulación hormonal del metabolismo del glucógeno en el hígado. DAG (diacilglicerol), R (subunidad reguladora de adenilato ciclasa), C (subunidad catalítica de adenilato ciclasa).

Por otra parte el hígado contiene una protein kinasa B dependiente de calmodulina que fosforila la fosforilasa quinasa y la glucógenosintasa.

A su vez la glucógeno sintasa también es inhibida por la proteín quinasa C. Por lo cual se completa la acción hormonal de los péptidos que actúan en el recambio de fosfolípidos de membrana, al estimular la fosfolipasa C. El inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) formado actúa en alguna organela celular (retículo endoplasmático, sarcoplasmas) donde favorece la salida de Ca^{2+} hacia el citosol, activándose la fosforilasa quinasa. Pero también se forma por acción de la fosfolipasa C el diacilglicerol (DG) que activa a la protein quinasa C, que por acción del Ca^{2+} se había traslocado a la membrana plasmática (fig. 3).

3.3. RESPUESTAS MEDIADAS POR Ca^{2+} EN EL HIGADO

Las hormonas dependientes de Ca^{2+} (agonistas α -adrenérgicos, vasopresina y angiotensina II) afectan muchos procesos metabólicos en el hígado (Exton 1986; Williamson et al 1981; Blackmore y Exton 1985).

Aunque hay evidencias de que las acciones α_1 -adrenérgicas de nor-adrenalina en el hígado tienen una significación fisiológica en muchas especies, el papel de vasopresina y angiotensina II en la regulación de la función hepática in vivo está menos claro: El glucógeno se almacena junto a una considerable cantidad de agua "estructural". Este agua se libera cuando el glucógeno se degrada. Así, se ha sugerido un papel importante para mantener el volumen extracelular (por ejemplo durante el "shock" hemorrágico y para suministrar glucosa a la sangre (Hems y Whitton 1980).

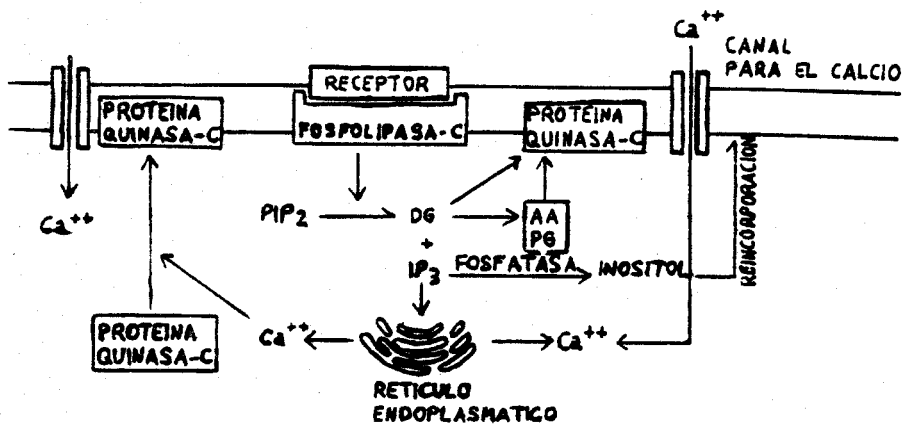


Fig. 3. Metabolismo de los fosfoinosítidos de membrana iniciado por la activación de la fosfolipasa C tras la interacción de un agonista como la vasopresina. La fosfolipasa C hidroliza los fosfoinosítidos como el fosfatidilinositol-4-5-bifosfato (PIP₂), produciendo inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DG). IP₃ favorece la entrada de calcio al citosol. Este catión facilita la traslocación de la proteína quinasa C citoplasmática a la membrana, donde puede activarse por el diacilglicerol (DG) y el calcio. La proteína quinasa C puede a su vez fosforilar una fosfatasa que degrada el IP₃, facilitando el turnover del fosfatidil inositol.



Los efectos de estos agentes incluyen la estimulación de la glucogenolisis, la gluconeogénesis, la respiración, la oxidación de ácidos grasos, el transporte de ácidos grasos y los flujos de K^+ .

La estimulación de la glucogenolisis es debida a la activación de la fosforilasa que sigue a la estimulación por Ca^{2+} de fosforilasa b quinasa, la cual contiene a la calmodulina como su subunidad δ . La actividad del enzima se incrementa entre 0.1 μM y 1 μM , lo cual está dentro del margen de concentración intracelular de Ca^{2+} .

Las hormonas dependientes de Ca^{2+} también inactivan la glucógeno sintasa, y para ello varias enzimas pueden intervenir. La fosforilasa b quinasa puede fosforilar e inactivar a la glucógeno sintasa, pero también pueden hacerlo la proteín quinasa dependiente de calmodulina. Los activadores de proteín quinasa C pueden también fosforilar e inactivar la glucógeno sintasa, pero sus efectos no parecen provenir de una acción directa, ya que no se conoce aún la función de las proteínas fosforiladas por la proteín quinasa C.

Los mecanismos moleculares de la regulación de otras respuestas fisiológicas producidas por hormonas dependientes de Ca^{2+} están menos claramente definidas. En el caso de la gluconeogénesis el Ca^{2+} puede actuar estimulando la transferencia de equivalentes de reducción desde el citosol a la mitocondria por activación alostérica de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial. Los agonistas dependientes de Ca^{2+} pueden también fosforilar e inactivar la piruvato quinasa y el enzima responsable parece ser la proteína quinasa multifuncional dependiente de calmodulina. Estos agonistas también estimulan la carboxilación del piruvato.

Las hormonas dependientes de Ca^{2+} incrementan el Ca^{2+} libre citosólico en hepatocitos desde un estado basal de aproximadamente $0.2\text{-}0.6\ \mu\text{M}$. El incremento en el Ca^{2+} precede al incremento de activación de fosforilasa a y otras respuestas fisiológicas, y ocurre tras un segundo con una dosis efectiva máxima de hormona.

Hay evidencias de que estímulos hormonales que incrementan el AMPc pueden estimular la entrada de Ca^{2+} , y un incremento del pH por encima de 7.7 puede también estimularla.

Otro mecanismo por el que las hormonas pueden elevar el Ca^{2+} citosólico es inhibiendo la bomba de calcio ATPasa dependiente de Ca^{2+} y de Mg^{2+} de la membrana plasmática. Estas hormonas producen una lenta inhibición de la actividad de la bomba en una forma dosis-dependiente. Cada hormona produce un grado diferente de inhibición de la actividad de la bomba que se correlaciona con sus capacidades para alterar el metabolismo de los polifosfoinosítidos.

Como vimos anteriormente, el mensajero que produce el incremento de Ca^{2+} es el inositol I-P_3 . Todas las hormonas dependientes de Ca^{2+} incrementan el nivel de inositol I-P_3 . La vasopresina es el más potente; los α -agonistas y angiotensina II tienen aproximadamente la mitad de efectividad de vasopresina. Hay muchas evidencias de que el acoplamiento de receptores movilizadores de Ca^{2+} por hidrólisis de fosfatidil inositol $4,5\text{-P}_2$ en la membrana plasmática de hígado está mediado por una proteína reguladora que liga nucleótidos de guanina (Uhing et al 1986; Lynch et al 1986).

Las hormonas dependientes de calcio incrementan rápidamente los niveles de 1,2-diacilglicerol en el hígado, llevando a la activación de protein quinasa C (Bockino et al 1985).

4. PANCREASTATINA

En Diciembre de 1986 aparece en la revista Nature (Tatemoto et al, 1986) el descubrimiento de un nuevo péptido con actividad biológica, que llamaron pancreastatina (pancreastatin) por su actividad inhibitoria de la secreción de insulina. El péptido fue aislado a partir de pancreas porcino y purificado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El análisis de la secuencia de aminoácidos dio como resultado un péptido de 49 aminoácidos con una estructura amida en el extremo carboxi-terminal (fig. 4). Así, la pancreastatina tiene un peso molecular de 5.103 y su estructura primaria es diferente de cualquier familia de péptidos. Sin embargo, tiene algunas similitudes en algunas partes de su estructura. Así por ejemplo, comparte con la gastrina la estructura -Glu-Glu-Glu-Glu-Glu (los residuos 34-38), y con la vasopresina la estructura carboxiterminal -Arg-Gly-NH₂. Se sugirió entonces que la pancreastatina pertenecería a una familia de péptidos desconocida hasta el momento.

En 1987, en el mismo número de la revista Nature, publican independientemente Eiden, y Huttner junto con Benedum, la homología estructural entre la pancreastatina porcina y una porción de cromogranina A (homología del 70%) bovina, cuya secuenciación también acababa de realizarse por clonación de DNA complementario de una genoteca de médula adrenal bovina (Benedum et al 1986, Iancangelo et al 1986). Poco después Koneki et al (1987) en el grupo de Huttner y Benedum publican la estructura primaria de la cromogranina A humana que contiene una secuencia homóloga a la pancreastatina porcina entre los

aminoácidos 250 y 301, estando además esta secuencia flanqueada por lugares de típico procesamiento proteolítico. Considerando el 30-35% de variación debido a la diferencia entre especies, se sugirió que la cromogranina A podría ser la precursora de una molécula de pancreastatina humana.

Al mismo tiempo, en 1985 se había purificado otra proteína del granulo beta que tenía relación con la cromogranina de la médula adrenal (Hutton et al 1985), de forma que su estructura coincidía con el extremo amino-terminal de la cromogranina A. Se trataba de una proteína de 20-21 KDa de peso molecular que llamaron Beta-granina. Hutton et al (1987,1988) describieron que el precursor de la betagranina y la pancreastatina, que no es sino la cromogranina A, era procesada en paralelo con la proinsulina, por la acción de una endopeptidasa dependiente de Ca^{2+} y una carboxipeptidasa H (Fig. 5).

Así pues, el granulo beta ve incrementado el número de componentes peptídicos que como la TRH (hormona liberadora de hormona tireotropa), y prolactina, además de aminas biógenas, podrían modular la secreción de la hormona principal, mediar en la autoregulación o estar implicados en la regulación de tejidos próximos.

4.1. LOCALIZACION HISTOLOGICA DE LA PANCREASTATINA

La localización histológica de pancreastatina ha sido estudiada en diversas especies con diferentes resultados, y por lo general coincide con la inmunorreactividad para cromogranina A.

1 5 10 15
Gly-Trp-Pro-Gln-Ala-Pro-Ala-Met-Asp-Gly-Ala-Gly-Lys-Thr-Gly-Ala-

 20 25 30
Glu-Glu-Ala-Gln-Pro-Pro-Glu-Gly-Lys-Gly-Ala-Arg-Glu-His-Ser-Arg-

33 40 45
Gln-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Thr-Ala-Gly-Ala-Pro-Gln-Gly-Leu-Phe-Arg-

Gly-NH₂

Fig. 4. Secuencia completa de aminoacidos de la pancreastatina porcina, con el fragmento activo del 33 al 49 aa.

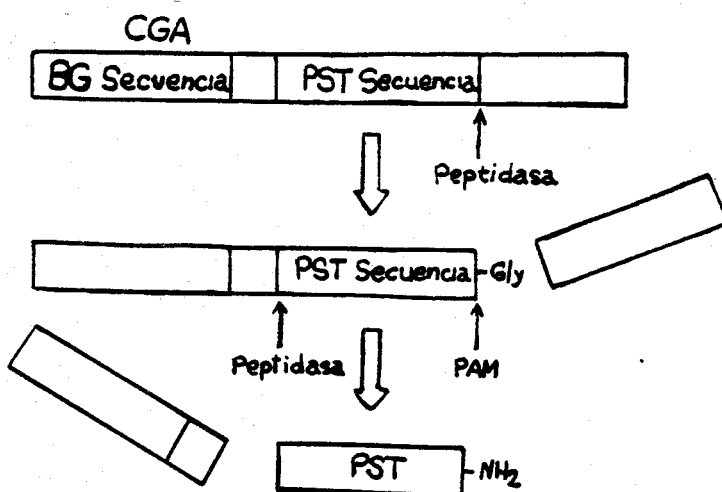
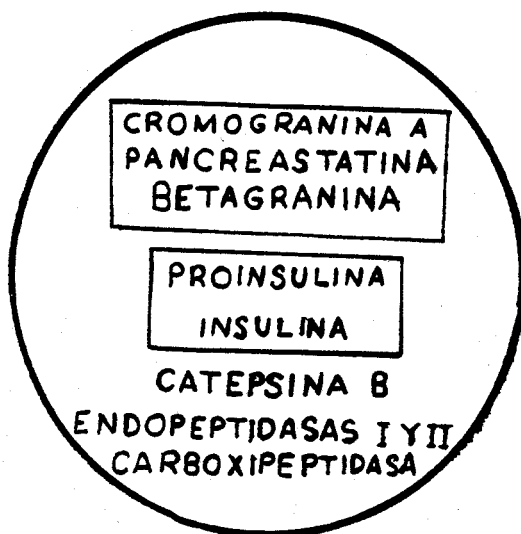


Fig. 5. Esquema del contenido hormonal y enzimático del gránulo beta. Debajo se representa el posible mecanismo de síntesis de pancreastatina a partir de cromogranina A. CGA (cromogranina A), BG (betagranina), PST (pancreastatina). El mismo sistema enzimático sirve para el procesamiento de la proinsulina que para el de la cromogranina A, co-secretándose la pancreastatina con la insulina.

En el cerdo (Ravazzola et al 1988 y Bretherton-Watt et al 1988) se ha encontrado inmunorreactividad a pancreastatina (con anticuerpos de conejo) en el páncreas, mucosa gastrointestinal y adenohipófisis. En el páncreas, las células que la contienen están localizadas en los islotes de Langerhans o dispersas entre las células acinares exocrinas. Aparece en los gránulos secretorios de las células B y D (productoras de insulina y somatostatina). En el tubo digestivo la inmunorreactividad a pancreastatina aparece en fundus y antro del estómago, duodeno, yeyuno, ileo y colon. Otros estudios (Lamberts et al 1990) han encontrado la inmunorreactividad en células secretoras de insulina, somatostatina y glucagón, pero nunca en células productoras de polipéptido pancreático. Con el microscopio electrónico vieron que el péptido se encontraba en el núcleo electrón denso de los gránulos secretorios de las células B y D y en el halo de los granulos de las células A. En el antro gástrico las células inmunorreactivas fueron las secretoras de gastrina, somatostatina y las enterocromafines. Las células de la médula adrenal también eran fuertemente positivas a la inmunorreacción. En la adenohipófisis, la pancreastatina se encuentra en las células productoras de gonadotropinas y en las tireotropas.

En el hombre se ha investigado la presencia de pancreastatina en tumores neuroendocrinos, insulinomas (Schmidt et al 1988), glucagonomas (Sekiya et al 1988) y en metastasis hepáticas de insulinoma (Funakoshi et al 1989). Los estudios de inmunotinción en islotes humanos (Schmidt et al 1988) mostraron la presencia de pancreastatina en las células A y D. Las células cromafines de médula adrenal también se teñían fuertemente (no distinguiéndose de la inmunorreactividad a cromogranina A). Por último, Hartschuh y Weihe (1989) describieron

inmunorreactividad a pancreastatina en células de Merkel en epidermis de cerdo y humana.

Aparte de los estudios histológicos, se ha demostrado que la pancreastatina es cosecretada con la insulina tras estimular el páncreas porcino perfundido con glucosa o con estimulación eléctrica vagal (Östenson et al 1989).

4.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Desde su descubrimiento por Tatemoto et al (1986), la pancreastatina fue clasificada como un nuevo péptido inhibidor de la secreción de insulina, aunque su potencia no era comparable a la de otras hormonas como la somatostatina o la galanina (McDonald et al 1985; Ahren et al 1988). Así la pancreastatina inhibe el primer pico de la secreción de insulina estimulada por glucosa en páncreas aislado y perfundido (Tatemoto et al 1986, Silvestre et al 1988), y en islotes aislados (Efendic et al 1987). También parece inhibir la secreción de insulina estimulada por arginina y tolbutamida (Efendic et al 1987; Silvestre et al 1988).

In vivo, un estudio en el ratón ha mostrado que la pancreastatina inhibe los niveles basales de insulina, inhibe la secreción estimulada de insulina, y estimula la secreción basal de glucagón (Ahren et al 1988).

También in vivo, pero en la rata, se ha descrito una inhibición de la secreción de insulina estimulada por glucosa y la secreción de glucagón e insulina estimulada por arginina (Funakoshi et al 1989), pero no afecta los niveles basales de insulina ni de glucagón. Funakoshi et al (1989) también describieron esta misma actividad utilizando el fragmento C-terminal de pancreastatina de rata.

En el perro (Ribes et al 1990) se ha descrito que la pancreastatina inhibe la secreción pancreática de insulina, pero sólo en condiciones normoglucémicas, y que estimula la secreción de glucagón pancreático y de somatostatina tanto en condiciones normoglucémicas como hiperglucémicas.

Otras acciones menos claras, incluyen la modulación de la captación de glucosa por adipocitos de rata (Östenson et al 1987).

Lorinet et al (1989) encontraron que la inhibición de la secreción de insulina estimulada por carbacol (estímulo colinérgico) en la línea tumoral de insulinoma Rin m 5F era abolida por el pretratamiento durante 18 h con toxina pertúsica, sugiriendo un mecanismo de acción independiente de AMPc, en el que estaría involucrada una proteína G sensible a toxina pertúsica. Sin embargo Östenson et al (1989) describían una inhibición por pancreastatina de la secreción de insulina estimulada por IBMX (3-isobutil-1-metil xantina) en islotes de rata sin alterar la biosíntesis de pancreastatina ni la oxidación de la glucosa, sugiriendo que actuaría en el sistema AMPc de las células del islote. Por otra parte, Schmidt et al (1987) han comunicado la inhibición de la secreción de insulina estimulada con GIP (un péptido que actúa estimulando la adenilato-ciclasa) en islotes pancreáticos de rata incubados con pancreastatina.

En la rata in vivo se ha demostrado (Funakoshi et al, 1988,1989) que la pancreastatina porcina y humana tienen una acción inhibitoria de la secreción pancreática exocrina, tanto en la secreción de proteína como de flujo, sin alterar las concentraciones plasmáticas de colecistoquinina. También parece inhibir la secreción

exocrina pancreática estimulada por el octapéptido de colecistoquinina, pero no por secretina.

La pancreastatina infundida in vivo intracranealmente en la rata (inyección intraventricular) parece elevar la glucosa, los ácidos grasos libres y la corticosterona sanguíneos (Gunion 1988).

Administrada periféricamente a la rata, la pancreastatina parece mejorar la retención de la memoria y revertir la amnesia producida por escopolamina (Flood et al 1988) sin incrementar los niveles sanguíneos de glucosa.

En células de paratiroides porcino en cultivo, la pancreastatina inhibe la secreción de parathormona inducida por Ca^{2+} 0.5 mM de forma reversible (Fasciotto et al 1989). Por lo que coincidiría en estas células el papel modulador autocrino de la pancreastatina con el observado en los islotes de Langerhans.

4.3. PANCREASTATINA Y ENFERMEDAD

Niveles elevados de pancreastatina se han detectado en un caso de insulinoma (Tateishi et al 1989) tanto en plasma (2.9 pmol/ml, unas 200 veces mayor que el valor normal) como en páncreas (2.9 nmol/g de peso húmedo, unas 450 veces el valor normal).

También se han encontrado niveles elevados de pancreastatina en plasma en otras enfermedades como la insuficiencia renal crónica y cirrosis (Tateishi et al 1989), sugiriendo que el riñón puede ser el lugar principal de degradación de pancreastatina; y que el hígado podría también estar implicado en su degradación. En pacientes con carcinoma de células pequeñas de pulmón, también se han

encontrado niveles elevados de pancreastatina por los mismos autores, pero no en diabetes mellitus no insulino-dependiente, ni en pancreatitis crónica o en cancer de páncreas.

En un estudio de sobrecarga oral de glucosa (Funakoshi et al 1990), se ha observado un mayor incremento de pancreastatina plasmática tras la ingestión de glucosa, comparado con los controles sanos. Sin embargo, era en los pacientes tratados con sulfonil-ureas, en los que estaban más claramente elevados los niveles plasmáticos de pancreastatina estimulados por la sobrecarga oral de glucosa.

5. CROMOGRANINA A

Los gránulos secretorios de las células cromafines sintetizan, almacenan y liberan catecolaminas por exocitosis. Además de adrenalina y noradrenalina, los gránulos cromafines contienen un gran número de moléculas, esencialmente proteínas, las cuales son co-secretadas con las catecolaminas. Las proteínas acídicas solubles de los granulos cromafines han recibido el nombre de cromograninas (Blaschko et al 1967). La cromogranina A (CGA) es la proteína mayoritaria, representando el 40% de las proteínas solubles de los granulos cromafines de la médula adrenal (Winkler et al 1976). Desde que se caracterizó por vez primera hace 20 años (Helle et al 1966), la CGA ha sido muy estudiada. Sus propiedades físicoquímicas han sido analizadas en detalle. Sin embargo hasta 1986 no se obtuvo la secuencia primaria completa de la CGA del granulo cromafín bovino (Benedum et al 1986).

En 1982 los grupos dirigidos por Winkler y Cohn conjuntamente descubrieron comparando sus datos que la CGA y la proteína secretoria I eran proteínas idénticas (la proteína secretoria I es secretada por la glándula paratiroidea junto a la parathormona) (Cohn et al 1982). La CGA está presente (a menudo en gran cantidad) en una amplia variedad de células endocrinas y neuroendocrinas (O'Connor et al 1983 y 1984; Willson y Lloyd 1984)). La CGA nunca se ha detectado en tejido exocrino normal o en tejidos no secretorios. Parece coexistir en los gránulos secretorios con la hormona nativa de la célula con la que se co-secreta (Ravazzola et al 1978; Winkler y Carmichael 1982; Arps et al 1987).

CGA es una molécula que parece haber sobrevivido a lo largo de la evolución. Ha sido detectada con antisueros de mamíferos en peces (Tisserand-Jochem et al 1987; Deftos et al 1987) y en el paramecio (Peterson et al 1987). Pero su significación fisiológica queda aún por aclarar.

5.1. ESTRUCTURA DE CGA

DNAs complementarios procedentes de genotecas bovina (Benedum et al 1986; Ahn et al 1987) de rata (Iancangelo et al 1988), de cerdo (Iancangelo et al 1988), y humana (Konecki et al 1987; Helman et al 1988) han sido clonados y secuenciados, proporcionando la secuencia completa de aminoácidos de la CGA. Dependiendo de las especies, CGA contiene 430-448 aa (peso molecular aproximado de 50.000) generada a partir de una preproteína que contiene una secuencia de 16-18 aa hidrofóbicos. Aproximadamente un tercio de los aa son Glu o Asp, dando un punto isoeléctrico de aproximadamente 4.8. Cada especie tiene un enlace disulfuro formado entre los residuos de cisteína en las posiciones 17 y 38. La mayoría de las especies contiene una región con Arg-Gly-Asp que ha sido implicada en otras proteínas como un factor de unión a membranas (Ruoslahti y Piersbacher 1986).

Recientemente se ha encontrado que CGA es una proteína ligadora de Ca^{2+} (Reiffen y Gratzl 1986). Un posible sitio de unión puede estar dentro de la región correspondiente a la pancreastatina (Helman et al 1988). La molécula de CGA está fosforilada (Cohn et al 1982) y sulfatada (Rosa et al 1985). La naturaleza de las anteriores modificaciones postranslacionales y posiblemente otras pueden ser específicas de cada tipo celular (Kumarasamy y Cohn 1986).

5.2. FUNCIONES DE CGA

La amplia distribución de CGA en tejidos endocrinos y neuroendocrinos ha conducido a demasiadas especulaciones de su potencial papel fisiológico. Estas incluyen un papel en a) maduración de gránulos secretorios; b) modulación del metabolismo de la prohormona dentro del gránulo; c) marcando o señalando a los gránulos secretorios la superficie celular apropiada para la exocitosis; y d) como una prohormona. Recientemente se han obtenido fuertes evidencias en favor de esta última función.

5.3. CGA Y PANCREAS ENDOCRINO

Inmunorreactividad anti-CGA ha sido demostrada en páncreas endocrino por numerosos autores (O'Connor et al 1983; Willson y Lloyd 1984; Cohn et al 1984; Varndell et al 1985). Sin embargo, se han publicado resultados contradictorios sobre el tipo de células que contienen CGA. En islotes bovinos, inmunorreactividad anti-CGA ha sido detectada en células productoras de insulina, glucagón y somatostatina. Estudios ultraestructurales con técnicas de tinción aural muestran que la inmunorreactividad a CGA estaba confinada exclusivamente a los gránulos secretorios que contienen hormonas. Sin embargo, mientras la hormona se localiza principalmente en la parte central de las vesículas, la CGA se encuentra en la perifería (Ehrhart et al 1986). Esta localización, que es peculiar de CGA ha sido observada en islotes pancreáticos humanos (Hearn 1987) pero su significación no está clara. En estudios hechos en 12 especies de mamíferos se ha demostrado que excepto en algunas excepciones, todas las células endocrinas pancreáticas son

inmunorreactivas (Grube et al 1987). Sin embargo cada especie tiene su propio patrón de inmunorreactividad a CGA.

El análisis del páncreas endocrino bovino por electroforesis muestra que la mayor banda inmunorreactiva migra idénticamente a CGA (Yoshie et al 1987). La tinción inmune de las bandas también revela la presencia de una especie adicional que migra más lentamente que la CGA de 75 KDa (CGA-proteoglicanos). Además, otras especies con menor peso molecular también se observan y probablemente son productos de degradación. Estos datos coinciden con los obtenidos en páncreas humano (Hagn et al 1986), pero no con los de rata (Hutton et al 1985 y 1987). En el páncreas de rata normal o en insulinoma se aisló un proteína de 20 KDa (llamada B-granina) que es reconocida fuertemente por anticuerpos contra CGA bovina y que se localiza con la insulina en las células B pancreáticas de rata. Como vimos anteriormente su secuencia ha sido determinada y es idéntica a la secuencia N-terminal de CGA (Iancangelo et al 1988; Hutton et al 1988). Es probable que la B-granina sea un fragmento proteolítico de CGA expresado solamente en el páncreas endocrino de la rata. La B-granina parece ser el mayor componente de los gránulos secretorios de insulinomas de rata (Hutton et al 1987). El DNA complementario correspondiente al RNAm que codifica la forma precursora de la B-granina de insulinoma de rata tiene una secuencia idéntica a la CGA de médula adrenal de rata. La estructura primaria de la CGA porcina deducida de la secuencia de un DNA complementario clonado de CGA de médula adrenal muestra que CGA es el precursor potencial de la pancreostatina porcina (Iancangelo et al 1988). Las CGAs de rata (Hutton et al 1988), buey (Eiden 1987) y humana (Konecki et al 1987;

Helman et al 1988) contienen una secuencia que según las especies es un 59-71% idéntica a la de la pancreastatina porcina. Las diferencias observadas son debidas a variaciones de especie, por lo que se sugiere que la pancreastatina podría derivar de CGA antes que de otra proteína.

La estructura primaria de un péptido encontrado en ciertos tumores endocrino-pancreáticos (glucagonoma pancreático) ha sido determinada tras su identificación por un anticuerpo específico contra pancreastatina porcina. La secuencia de este péptido pancreastatina-like humano de 28 aa es un 75% homóloga con la de pancreastatina porcina (Sekiya et al 1988).

6. OBJETIVOS

Desde su descubrimiento, la pancreastatina engrosó las filas de los péptidos reguladores que inhibían la secreción de insulina, teniendo posiblemente un papel autocrino en la modulación de la secreción del granulo β . Esta inhibición no se acerca en intensidad a la producida por hormonas como la somatostatina, ni siquiera a la producida por el neuropéptido galanina. Sin embargo, cuando empezamos a trabajar con la pancreastatina, observamos que tenía un efecto sobre los niveles de glucemia en la rata. Así pues nos dispusimos a estudiar en este modelo animal la actividad biológica del nuevo péptido en relación a la glucosa, así como sus posibles mecanismos de acción.

Para alcanzar dicho objetivo realizamos estudios a diferentes niveles:

a) Indirectamente, estudiando el efecto de la pancreastatina sobre las hormonas encargadas de regular el metabolismo de la glucosa:

- Estudio de la acción de pancreastatina sobre el páncreas endocrino en el animal intacto y en el páncreas aislado y perfundido.
- Estudio de la acción de la pancreastatina sobre los niveles plasmáticos de catecolaminas.

b) Directamente, estudiando la acción de la pancreastatina sobre la producción hepática de glucosa.

- Estudio de la acción de la pancreastatina sobre el contenido de glucógeno hepático "in vivo".

- Estudio de la acción de la pancreastatina sobre la producción de glucosa en hepatocitos de rata "in vitro".

c) Estudio del posible mecanismo de acción de la pancreastatina en los hepatocitos, y su sistema efector.

II. MATERIALES Y METODOS

1. TECNICA DE LA PERFUSION DEL PANCREAS AISLADO

1.1. DESCRIPCION DE LA TECNICA 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).

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 5 mg/100g de peso. Se practicó una laparotomía media seguida de dos incisiones laterales para conseguir un campo operatorio amplio. A continuación, se desplaza hacia la derecha las asa intestinales y hacia abajo la grasa epididimaria, apareciendo el colon descendente cuya porción distal esta 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 eplion y despegandolo de las asas a las que está unido hasta hacerse visible la arteria mesentérica superior. Seguidamente, 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 apreciandose 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 localiza el duodeno en cuya porción distal, en el primer ojal que queda entre los vasos arqueados, se hace una ligadura doble; seccionando a continuación el duodeno-yeyuno. En ese momento, la arteria mesentérica superior se corta lo más distalmente posible y se corta 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.

El siguiente objetivo es 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 se extiende entre el bazo, estómago y duodeno, recubriendo el páncreas. Tirando del borde externo del bazo pueden verse los vasos esplénicos en número variable, siendo tres los más importantes. Se hacen tres ligaduras dobles, se cortan y se retira el bazo de la cavidad abdominal.

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 hacen dos ligaduras en dicha arteria y se corta 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. El esófago se secciona 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 las ligaduras se corta distalmente a ellas. A continuación, se hace una ligadura entre estómago y duodeno, seccionando proximalmente 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 la arteria hepática que se dirigen hacia el hilio hepático. Con una pinza muy fina se disecciona la porta separándola del colédoco y de la arteria hepática. El problema en este paso es que se puede desgarrar la porta o ligar la arteria pancreático-duodenal superior, pues la ligadura de la hepática se hace muy próxima a ellas.

Posteriormente, el pedículo renal izquierdo, arteria y vena, uréter y arteria suprarrenal se seccionan entre dos ligaduras. Mediante disección roma, se aprecia en este momento la aorta abdominal, requiriéndose una nueva ligadura para liberarla del tejido paraaórtico de este lado del diafragma. La arteria renal derecha se visualiza 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. A continuación se liga todo el tejido paraaórtico de este lado del diafragma.

En la aorta abdominal se hace 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 abre el tórax del animal y se pinza la aorta a nivel del cayado; se disecciona, se separa de la vena cava y se hace una incisión transversal en la aorta torácica lo más distal posible, que permita la introducción de una cánula por la que fluirá 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. 6). En este momento, se busca la ligadura que se hizo en la arteria hepática y se secciona distalmente a ésta. Esta sección incluye a la porta, a través de la cual sale el líquido de perfusión.

Tras liberar la aorta de los músculos prevertebrales y diafragma, se introduce el páncreas en la cámara de perfusión.

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 el experimento, 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.

1.2. DESCRIPCION DEL METODO DE PERFUSION

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

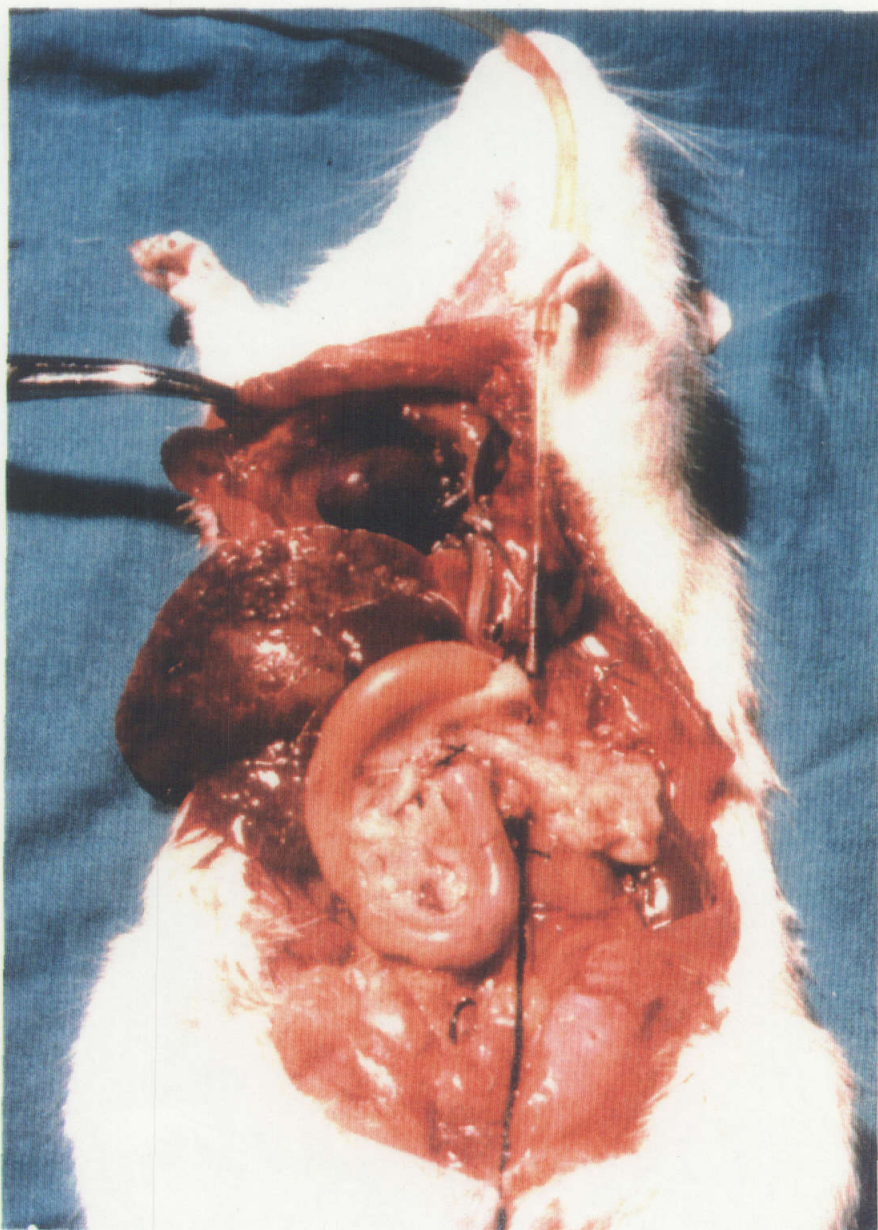


Fig. 6. Etapa final del aislamiento del páncreas. Se observa la aorta torácica canulada, y la aorta abdominal ligada. El páncreas aparece perfundiéndose junto al marco duodenal. Puede apreciarse cómo poco antes de cortar la vena porta, el hígado comienza a palidecer al sustituirse la sangre por el medio de perfusión.

de los márgenes fisiológicos que se dan normalmente "in vivo" (Fig. 7). Cada una de estas unidades, que describimos a continuación, cumple una función determinada.

1.2.1. Circulación del líquido de perfusión

Esta función 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.

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 comprimen. En nuestro caso, utilizamos un flujo de 2.5 ml/min, que supone un adecuado aporte de oxígeno y el mantenimiento de la presión hidrostática de perfusión.

1.2.2. Oxigenación del líquido de perfusión

Esta función la realiza un oxigenador de membrana tipo "cerrado" (el gas y el líquido están separados por una membrana permeable al gas). Consiste en un recipiente de sección tronco-cónica con cuatro entradas en su cara superior. Dos de ellas, son para la entrada y salida del líquido de perfusión. Las otras dos entradas de la cámara de oxigenación están ocupadas por los extremos de un huso constituido por multitud de finísimos conductos de polímero de celulosa suspendidos en el

interior de la cámara, por donde circula la mezcla gaseosa. El oxígeno difunde a través de la pared de estos conductos para solubilizarse en el líquido de perfusión, que se mantiene en continua agitación mediante un agitador magnético. La mezcla gaseosa utilizada, está constituida por un 95% de oxígeno y un 5% de anhídrido carbónico (carbógeno) que se inyecta en la cámara a una presión de 0.4 Kg/cm² (789.4 mmHg).

1.2.3. 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 cada perfusión, se comprueba la respuesta vasoconstrictora a la adrenalina, considerandose la elevación de la presión como signo de viabilidad del preparado, criterio que no siempre coincide con el estudio de la secreción de la insulina.

1.2.4. 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.

1.2.5. Conexiones y cámara de perfusión

En la figura 7 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 a un serpentín de calentamiento. De aquí pasa a un captador de burbujas (tubo en T con una rama vertical) que impide la 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.

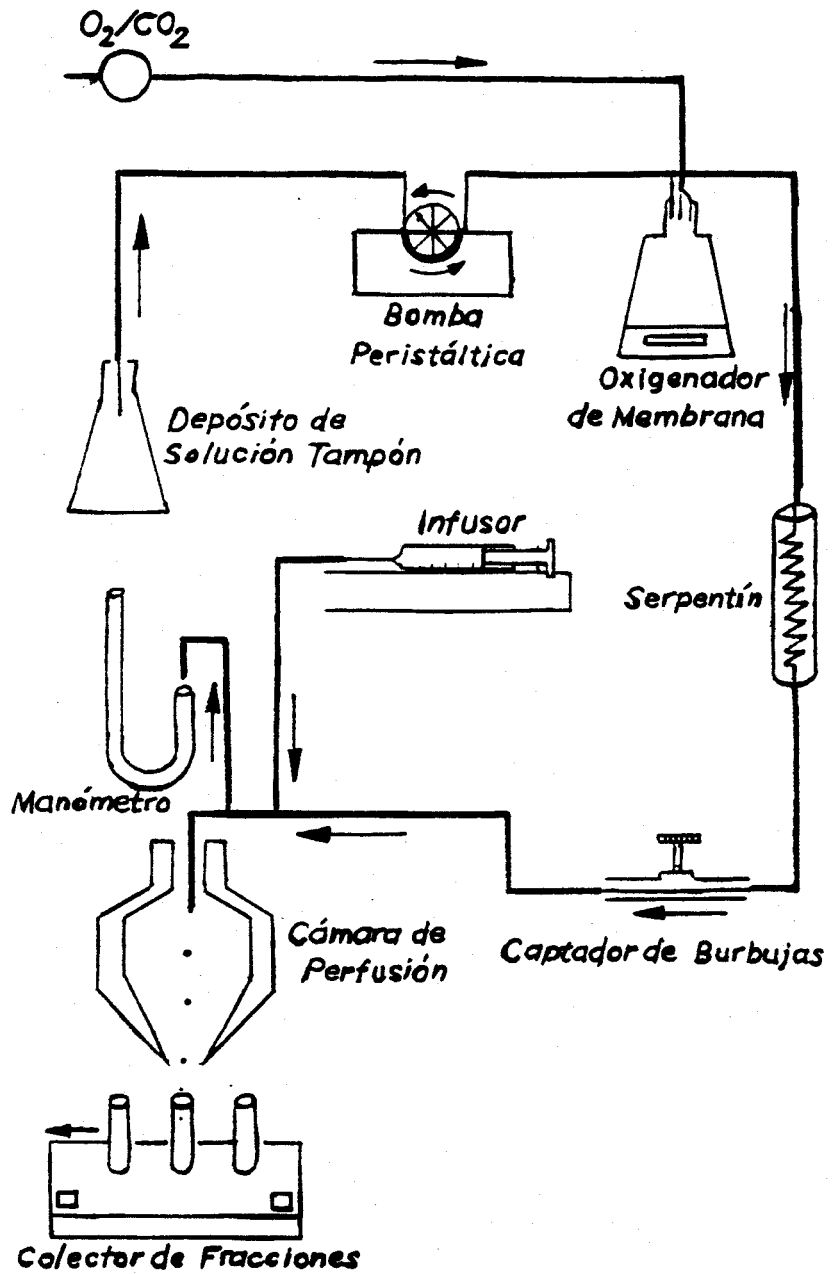


Fig. 7. Esquema del aparato de perfusión.

1.2.6. Infusión de sustancias en el páncreas

Para conseguir aumentos rápidos de la concentración de las sustancias utilizadas en el líquido aferente al páncreas, sin necesidad de circular por todo el sistema ni de diluirlas en los depósitos del líquido, 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 que se va a infundir. El flujo depende del calibre de la jeringa y de la velocidad de empuje del motor, que proporciona un flujo de 9.7 ml/hora ó 0.16 ml/min. Según este flujo, se calcula la concentración necesaria de la sustancia para obtener la deseada cuando se mezcle con el líquido de perfusión al ser infundida. La sustancia que se infunde se prepara siempre en tampón KRB pH 7.4, BSA 0.5%.

1.2.7. Obtención de muestras

El líquido perfundido, que fluye de la vena porta, 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 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.

1.2.8. Líquido de perfusión

Se ha utilizado como líquido de perfusión una solución salina de Krebs Ringer bicarbonato (KRB), pH 7.4, suplementada con albúmina y dextrano. 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 del 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, se gasea la solución final obtenida durante 10 min con carbógeno (95% O₂, 5% CO₂), ajustándose el pH a 7.4. Se añade albúmina sérica bovina en la proporción de 1%, dextrano 2%, y trasylol 250 U/ml (para inhibir la proteolisis), volviéndose a comprobar el pH. La presión oncótica de la albúmina y el dextrano contribuyen a retrasar la aparición del edema tisular que ocurre siempre en este tipo de preparados.

2. ESTUDIO IN VIVO DE LA GLUCOGENOLISIS HEPATICA Y

LA REGULACION DEL PANCREAS ENDOCRINO

2.1 ANIMALES

Se han utilizado ratas anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/Kg de peso) intraperitoneal, tras un ayuno matinal de 4-6 horas para que los animales estén en el estado postabsortivo.

La comida se les retiraba a las 8 de la mañana y los experimentos se llevaban a cabo desde las 12 hasta las 14 horas, para aprovechar los hábitos nocturnos de la rata, por los que se alimenta fundamentalmente durante la madrugada y dormita por la mañana. Así, los animales se encuentran en estado postabsortivo y tienen una buena reserva de glucógeno hepático.

2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

30 minutos después de administrar la anestesia se practica una laparotomía media desde el apéndice xifoideo hasta el ombligo. En el cuello se disecan las yugulares externas de ambos lados para facilitar la toma de muestras de sangre.

Las muestras de hígado se toman tras practicar una ligadura en una porción de los lóbulos principales (izquierdo, medio y derecho). El hilo debe ser muy grueso (0.5 mm) para evitar cortar el pedículo vascular (fig. 8).

Para la administración de los péptidos, se busca la vena mesentérica superior que cruza la tercera porción del duodeno y se sigue retrógradamente hasta la desembocadura de la vena ileo-cólica, donde se practica la inyección con jeringuilla

y aguja de insulina (fig. 9). El volumen inyectado fue siempre de 1 ml de salino-BSA 1%, tanto para los controles como para la inyección de péptidos. Un minuto después de la inyección la aguja se retira cuidadosamente, y se coloca una pequeña torunda de algodón para evitar la hemorragia que a veces ocurría, y que invalidaba el experimento.

Las muestras de sangre se toman con jeringuilla de insulina heparinizada, pero con una aguja de mayor calibre (intramuscular) para evitar la hemólisis. Se punciona la yugular a través del músculo pectoral mayor para no desgarrarla. El volumen de sangre tomado fue de 0.9 ml en cada muestra. 20 μ l se utilizaron para determinar la glucosa sanguínea y el resto se centrifugó a 800 x g. El plasma fue separado y congelado en alícuotas de 100 μ l hasta el día de las determinaciones hormonales de insulina y glucagón.

2.3 PREPARACION DE PEPTIDOS

Los péptidos: glucagón, VIP, pancreastatina 1-49 y pancreastatina 33-49 se disolvieron en CIH 5 mM y se congelaron alícuotas con una concentración de 10^{-5} M. Para el experimento se diluían los péptidos hasta una concentración que se ajustaba para una dosis de 300 pmol/Kg en un volumen de 1 ml de BSA-1%-salino (alrededor de 10^{-7} M).

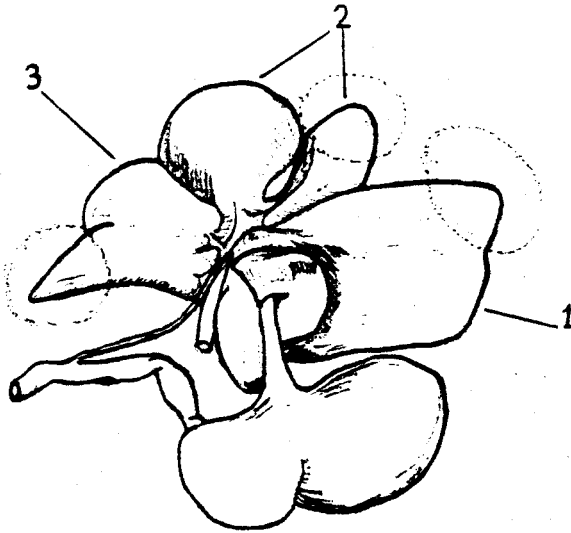
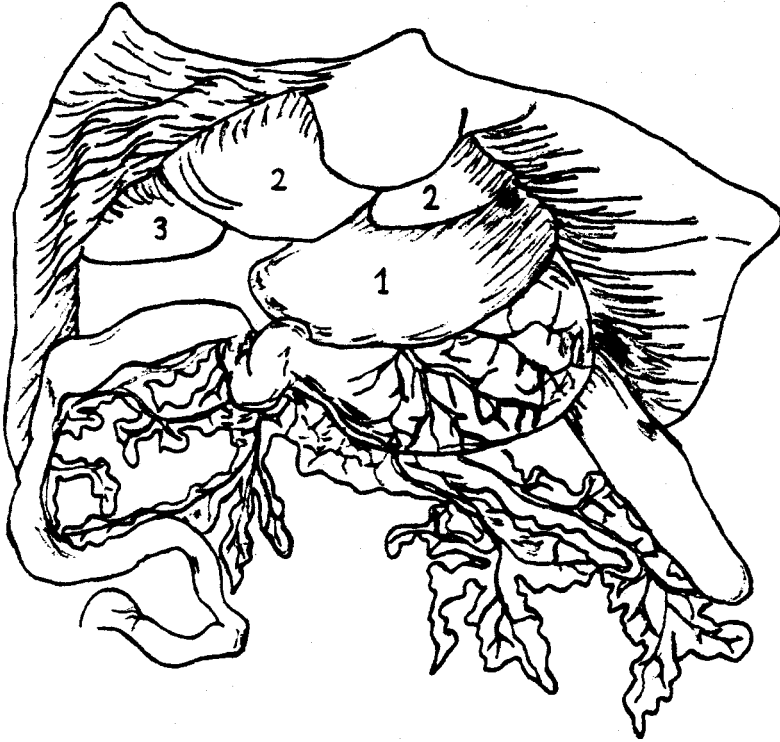


Fig. 8. Relación topográfica del hígado (se observan los lóbulos izquierdo (1), medio (2) y derecho (3)) con el estómago, marco duodenal, páncreas, bazo y apéndice xifoideo. En el dibujo inferior se señala dónde se realizaban las ligaduras de los lóbulos izquierdo (1), medio (2) y derecho (3).

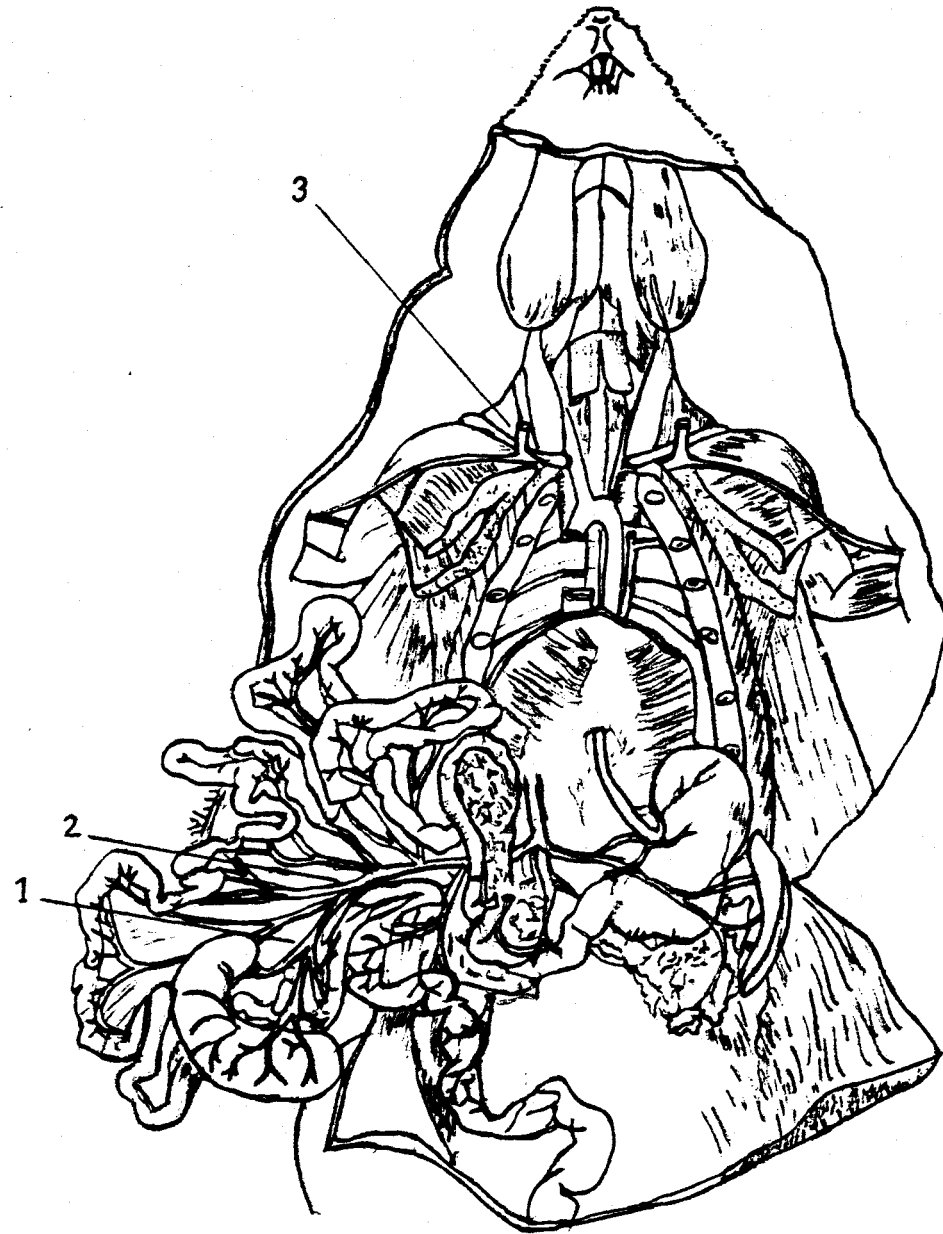


Fig. 9. Esquema anatómico del sistema vascular venoso mesentérico de la rata. Se señalan los lugares de inyección: la vena ileo-cólica (1), la vena mesentérica superior (2), y el punto de extracción de sangre, la vena yugular interna (3).

2.4. AISLAMIENTO Y CUANTIFICACION DEL GLUCOGENO

HEPATICO

2.4.1. Aislamiento de glucógeno hepático

El glucógeno se puede aislar de los tejidos animales por digestión de estos 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.

Para el aislamiento del glucógeno se siguieron las siguientes etapas:

a) Digestión del tejido

Se parte de 0.3 g de hígado. El tejido se digiere en una solución de KOH al 30% caliente durante 30 min. El extracto resultante se centrifuga a 3.000 r.p.m. durante 10 min, en una centrífuga de mesa refrigerada. El sobrenadante se recogió con cuidado, y se le añade 100 μ l de SO_4Na_2 15%, con el fin de facilitar la formación y precipitación del glucógeno sólido.

b) Precipitación alcohólica

Se añaden 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 guarda 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 separa por centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 10 min el glucógeno (precipitado) y se desecha el sobrenadante.

c) Lavado del glucógeno

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

2.4.2. Determinación del glucógeno

a) Hidrólisis con amiloglucosidasa

Consiste en hidrolizar 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 (precipitado de glucógeno disuelto en 1 ml de agua destilada) se le añaden 100 μ l de amiloglucosidasa (5 mg/ml de tampón acetato 1 M, pH 5). Se incuba durante 1 h a 37°C de temperatura.

b) Analisis del glucógeno como glucosa

Tras la incubación se toman 2 alícuotas de la disolución (25 y 100 μ l) y se determina la glucosa. Para el análisis del glucógeno como glucosa, se utilizó el método de la glucosa oxidasa.

2.5. DETERMINACION DE LA GLUCOSA

La determinación de la concentración de glucosa en plasma y la producida por la hidrólisis enzimática del glucógeno se realizó por 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 ortodiansidina en presencia de peroxidasa dando un complejo de color verde, midiendo su intensidad por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm.

2.6 DETERMINACION DE INSULINA

Para medir las concentraciones plasmáticas de insulina se empleó un método basado en el principio de enzima inmunoanálisis, facilitado por Boehringer Mannheim.

2.6.1. Fundamento de la prueba

La insulina de la muestra reacciona con los anticuerpos fijados en la fase sólida (el tubo de incubación), así como a los anticuerpos marcados con POD (complejo peroxidasa-O-diansidina), formando un complejo sandwich, en una reacción de 2 horas. La cantidad de complejos sandwich formados es la medida del contenido de insulina en la muestra. En la fase de separación se eliminan el conjugado POD no ligado y todos los componentes séricos.

Tras lavar se añade el H_2O_2 y el cromógeno (ABTS, azino-di-etil-benzotiazolina ácido sulfónico-sal amónica) y se incuba nuevamente. Luego, la actividad de POD ligada a la pared del tubo es determinada fotométricamente. La intensidad del color que aparece después de una hora de incubación, es medida frente a la solución de substrato-cromógeno. La intensidad de la reacción de color es directamente proporcional a la concentración de insulina en la muestra. La evaluación se efectúa

mediante una curva de calibración que se construye con diferentes concentraciones conocidas de insulina de rata (fig. 10).

2.7 DETERMINACION DE GLUCAGON

Para medir las concentraciones plasmáticas de glucagón, se ha utilizado la técnica del radioinmunoanálisis facilitado por Medgenix.

2.7.1. Fundamento de la prueba

El radioinmunoanálisis se basa en el principio de competición entre un antígeno marcado con un isótopo radiactivo (Ag^*) y un antígeno no marcado (Ag) por anticuerpos específicos (Ac).

En presencia de cantidades crecientes de antígeno no marcado, más cantidad de $Ag-Ac$ y menos de Ag^*-Ac se formará. Una curva de referencia se construye añadiendo cantidades conocidas crecientes de Ag a unas cantidades conocidas de Ag^* y Ac .

Después de la incubación, el anticuerpo unido al antígeno se separa de los reactantes libres y se mide su radiactividad. La curva de referencia expresa la disminución de Ag^*-Ac (eje Y) como una función de la concentración de la concentración de antígeno (eje X), (fig. 11). Para determinar la concentración de Ag en una muestra, un volumen de ésta se incuba con el Ag^* y el Ac . El Ag^*-Ac se mide como cantidad de radiactividad en un contador gamma (cuentas por minuto). La concentración de Ag en la muestra se determina por interpolación sobre la curva de referencia.

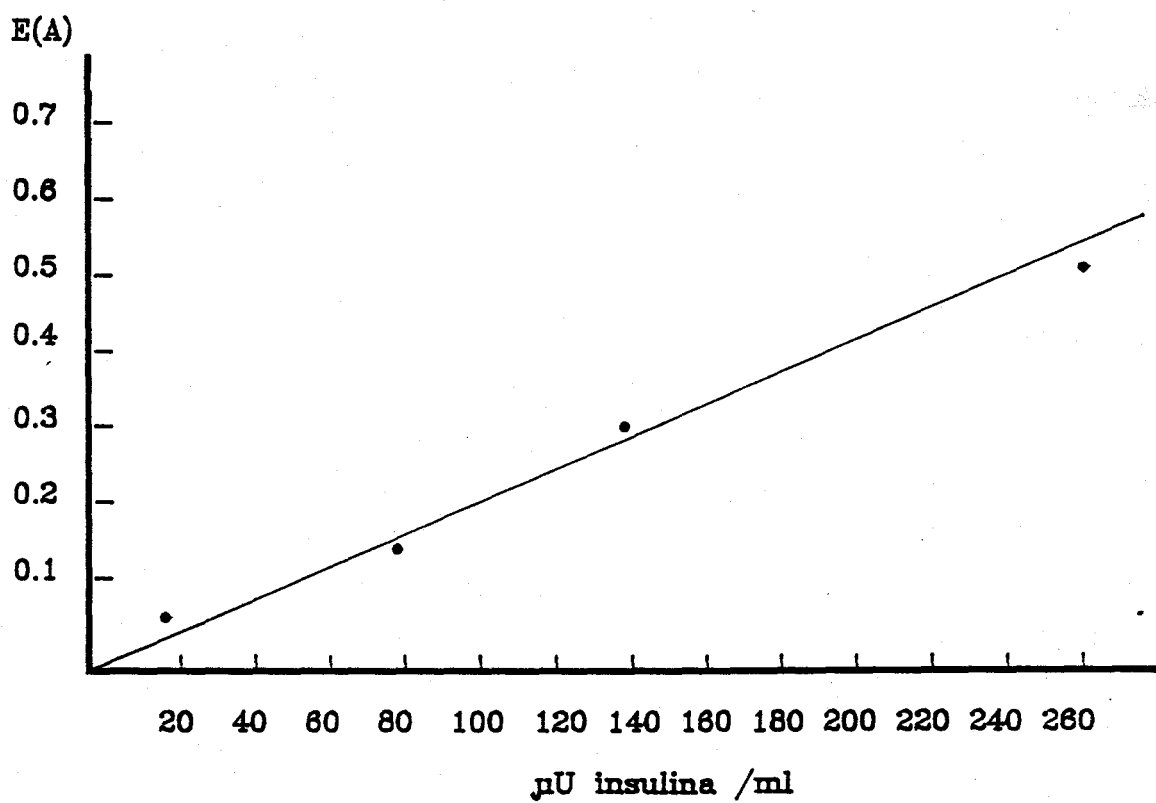


Fig. 10. Curva de calibración con insulina de rata para el ELISA. E(A): extinción o absorbancia.

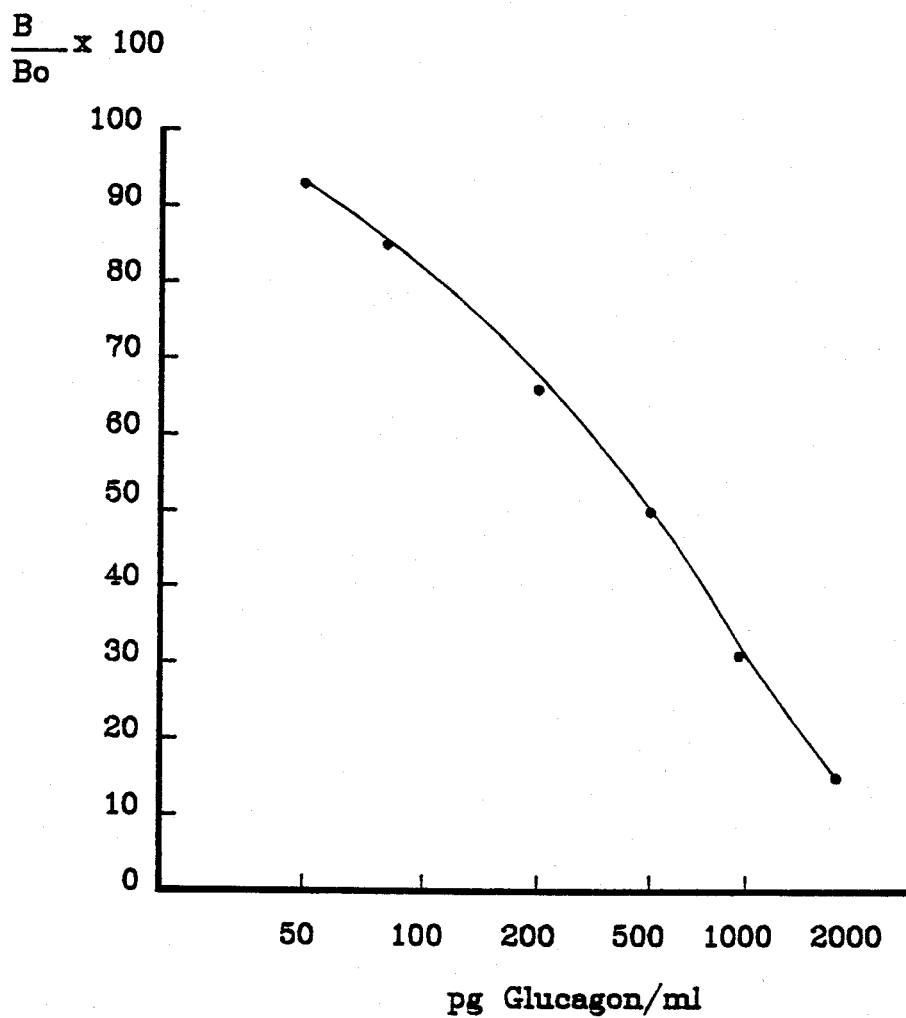


Fig. 11. Curva de referencia del RIA de glucagón. $B/B_0 \times 100$: porcentaje respecto del máximo (B_0) de radiactividad por tubo.

Se puede incrementar la sensibilidad incubando, en un primer paso, el antígeno no marcado con los anticuerpos. El trazador se añade después de la preincubación en un segundo paso. Esta técnica se denomina de saturación secuencial, y ha sido la utilizada para determinar el glucagón.

Se incuban cantidades conocidas de glucagón no marcado (curva de referencia) o un volumen dado de muestras con un antisuero anti-glucagón durante 3 horas (a 2-8°C). Después se añade el ^{125}I -glucagón, y la reacción continua durante 18-24 horas a 2-8°C. Se añade entonces a todos los tubos antisuero con anti-gammaglobulinas de conejo mezcladas con polietilen glicol, celulosa y Tween 20. La celulosa se añade para obtener un precipitado estable con un volumen suficiente. Después de una incubación de 20 min precipitan todos los complejos Ag-Ac. Los tubos se centrifugan a 3.000 r.p.m. durante 10 min, y se mide la radiactividad en el precipitado. Se construye la curva patrón y las concentraciones de glucagón de las muestras se determinan por interpolación con esta curva.

3. ESTUDIO IN VIVO DE LAS CATECOLAMINAS PLASMATICAS

3.1. ANIMALES

Los animales empleados y las condiciones en que fueron tratados son las mismas que para el estudio de glucogenolisis y regulación del páncreas endocrino.

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

El procedimiento fue el mismo que el seguido para los estudios de glucogenolisis, aunque la sangre se obtuvo de la aorta abdominal.

La rata, media hora después de ser anestesiada con pentobarbital sódico intraperitoneal, se coloca en la tabla de operaciones y se le practica una laparotomía media. Se busca la vena íleo-cólica siguiendo el curso retrógrado de la vena mesentérica superior. Se inyecta 1 ml de cada péptido empleado disuelto en suero salino BSA 1%, la misma solución es utilizada para el grupo control.

A los 10 min se tomaron las muestras de sangre de la arteria aorta abdominal. Esta arteria se disecciona con facilidad, y puede ser abordada para la extracción con una aguja intramuscular doblada previamente con un ángulo de concavidad superior (aproximadamente 120-150°), para que la jeringuilla pueda ser manejada sin dificultad. Se extraen 4 ml de sangre, y se colocan en un tubo con heparina-litio, para evitar la coagulación. Inmediatamente la sangre se centrifuga a 3.000 r.p.m. durante 10 min para separar el plasma, y este es guardado a -80°C hasta el día de las determinaciones.

3.3. DETERMINACION DE CATECOLAMINAS PLASMATICAS

Las catecolaminas plasmáticas fueron determinadas por cromatografía líquida de alta resolución con un detector electroquímico.

Las muestras de plasma fueron purificadas con cartuchos de filtración (Sep-Pack) de Waters, para evitar interferencias en el sistema, ya que el detector es muy sensible.

4. AISLAMIENTO E INCUBACION DE HEPATOCITOS

4.1. ANTECEDENTES

Howard et al (1967) utilizaron por vez primera enzimas para aislar hepatocitos. Su técnica consistía en incubar trozos de hígado con colagenasa e hialuronidasa. Sin embargo, el rendimiento de este método era sólo del 5% del tejido original.

En 1969, Berry y Friend utilizaron un nuevo método enzimático. Consistía en perfundir el hígado con un medio conteniendo colagenasa e hialuronidasa, quedando así expuestas todas las células a la acción de los enzimas.

Para llevar a cabo la obtención de hepatocitos en este trabajo se ha utilizado este último método, empleando sólo colagenasa, ya que posteriormente se comprobó que la adición de hialuronidasa era innecesaria (Ingerbreten y Wagle, 1972).

4.2. APARATO DE PERFUSION

El mismo descrito en el apartado 1.2. pero sin la cámara de perfusión.

4.3. MEDIO DE PERFUSION DEL HIGADO Y DE RESUSPENSION DE HEPATOCITOS

El medio básico corresponde a una solución de Krebs Ringer bicarbonato descrita en el apartado 1.2.8.

4.3.1. Medio de perfusión

. Perfusión de la solución de Krebs Ringer bicarbonato con glucosa 20 mM, sin calcio y con heparina (0.4 U/L). La ausencia de calcio según los autores del método, facilita su salida al espacio intercelular facilitando así la acción de la colagenasa.

. Perfusión de la solución Krebs Ringer bicarbonato con glucosa 20 mM, cloruro de calcio 2.5 mM, heparina (0.4 U/L) y colagenasa 0.4 g/L.

4.3.2. Medio de resuspensión

El medio de resuspensión e incubación de hepatocitos es el mismo del apartado anterior pero sin heparina ni colagenasa y con glucosa 20 mM.

Las soluciones anteriores se gasearon (O₂/CO₂; 95:5) durante 20 min. Al final de la oxigenación se verificó que el pH era de 7.4.

4.4. PERFUSION HEPATICA. TECNICA OPERATORIA

La técnica de perfusión empleada ha sido la descrita por Hem et al (1966) en la cual el hígado es perfundido "in situ".

Las ratas se anestesiaron aproximadamente 15 min antes de la operación mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (5 mg/100 g de peso).

Se realiza una laparotomía media, ampliada con dos incisiones transversales. Las asas intestinales son desplazadas para dejar libre el hilio hepático y la vena porta.

En la figura 12 se esquematiza la técnica. Tras la laparotomía, se provoca una hiperlordosis, colocando a la rata sobre un rodillo. Seguidamente, se realizan las ligaduras en las siguientes posiciones: la primera ligadura, sin cerrar, es colocada

alrededor de la vena cava inferior por encima de la salida de la vena renal derecha. Seguidamente se colocan otras dos ligaduras sin cerrar en la vena porta: la primera pasa por el triángulo formado por el colédoco, la vena esplénica y la vena porta; y la segunda 2 centímetros por debajo de la primera (fig. 12). La cánula de entrada conectada al sistema de perfusión es introducida en la vena porta, cerrándose las ligaduras de dicha vena.

Seguidamente, la vena cava inferior es seccionada por debajo de la ligadura primera, facilitando el lavado del hígado de la sangre que lo irrigaba.

A continuación se abre el tórax y se coloca una ligadura laxa alrededor de la vena cava inferior, entre el corazón y el diafragma.

Tras una incisión en la vena cava superior, la cánula de salida se introduce hasta la vena cava inferior y la ligadura es cerrada, así como la ligadura primera (en la cava abdominal). Así se logra que todo el líquido de perfusión que entra por la porta salga por la cánula situada en vena cava superior.

Cuando la perfusión ha finalizado, el hígado toma un color marrón claro uniforme. En caso de perfusión defectuosa, algunas zonas del hígado permanecen de color oscuro, lo cual servía de control para utilizar o no el hígado perfundido.

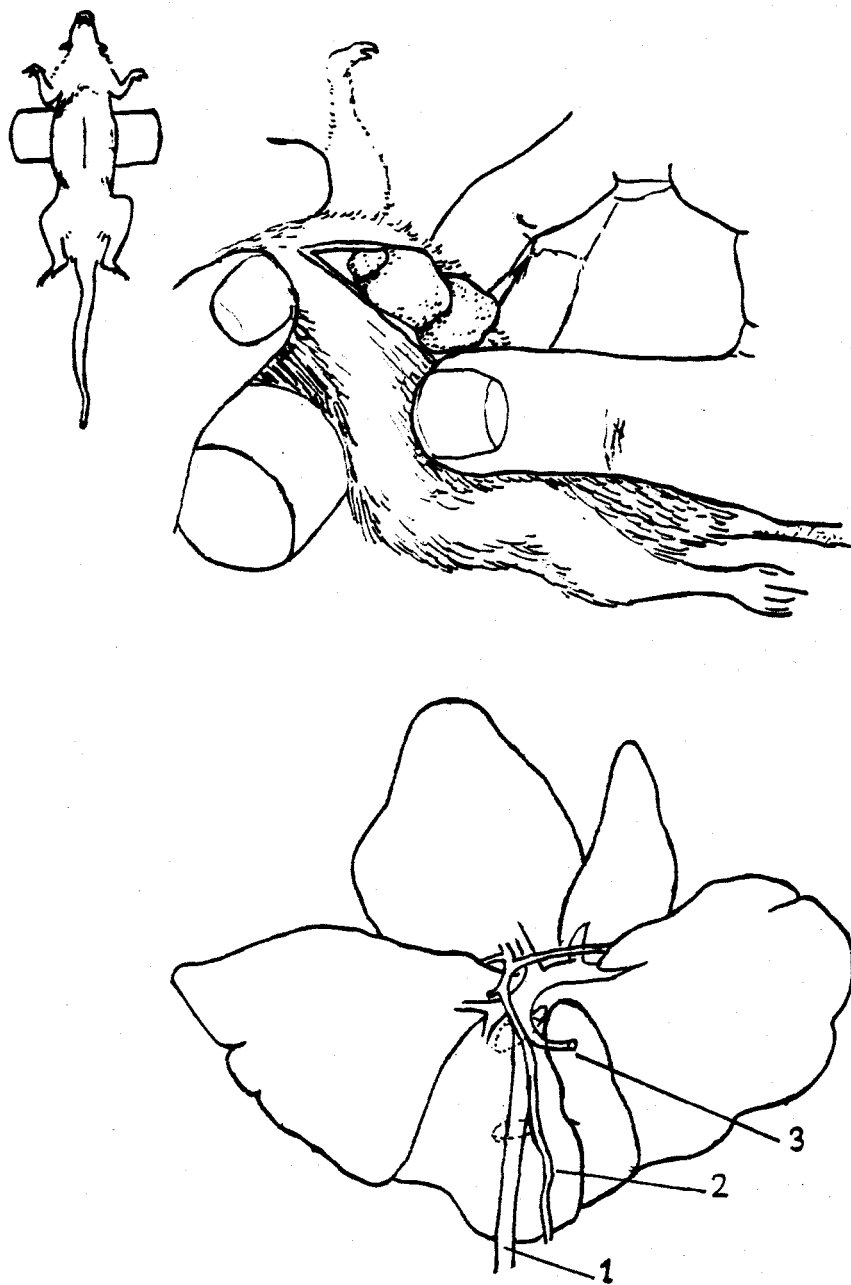


Fig. 12. Tras la laparotomía media aparecen los lóbulos hepáticos izquierdo y medio (arriba). Al retirar las asas intestinales aparece la imagen ventral del hígado (abajo). Se señalan los lugares de las 2 ligaduras de la vena porta (1), antes y después de la desembocadura de la vena esplénica (3), el colédoco (2) es ligado en una de ellas.

4.5. DESARROLLO DE LA PERFUSION

El flujo del líquido de perfusión es regulado y mantenido en un valor medio de 30 ml/min. Los primeros 200 ml de perfusión a la salida del hígado se desechan, cambiándose entonces al medio de digestión con calcio y colagenasa. La perfusión se realiza entonces en circuito cerrado. A los 12-15 min el hígado se reblandece, se detiene la perfusión y el hígado se separa del animal.

4.6. AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS

El hígado se coloca en una placa Petri con el medio de perfusión con colagenasa. Con una espátula de plástico se aplasta suavemente. La suspensión obtenida se filtra a través de una media de nylon, y se centrifuga durante 45 segundos a 800 r.p.m.

El precipitado de las células se resuspende en un medio fresco, Krebs Ringer bicarbonato oxigenado con calcio, glucosa 20 mM y albúmina sérica bovina al 1%. Se vuelve a filtrar la suspensión con una media de nylon y se vuelve a centrifugar 45 segundos a 800 r.p.m. Los hepatocitos son finalmente resuspendidos en el medio descrito en el apartado 4.3.2.

4.6.1. Test de viabilidad de los hepatocitos

La viabilidad de las células se controló por el método del azul tripan. Las células vivas excluyen el azul tripan, mientras que las células muertas y alteradas se colorean de azul. Se incuban durante 5 min a temperatura ambiente 20 μ l de la suspensión celular con 5 μ l de una solución de azul tripan (0.2 g% en salino). La viabilidad obtenida era habitualmente del 80-90%.

4.7. ESTUDIO DE PRODUCCION DE GLUCOSA Y LACTATO POR LOS HEPATOCITOS

4.7.1. Procedimiento

Los hepatocitos suspendidos en el medio de aislamiento (KRB con glucosa 20 mM y BSA 0.1% son preincubados durante 10 min a 37°C. Con una centrifugación suave (100 x g) durante 2 min se cambia el medio por el de incubación (KRB con glucosa 1.5 mM) suplementado con tris 5 mM, BSA 0.2%.

En este medio y con una concentración celular aproximada de $2-3 \times 10^6$ /ml (correspondiente a unos 10-15 mg de proteína/ml), los hepatocitos (2.5 ml) se colocan en matraces erlenmeyer de 50 ml de capacidad tapados con un tapón de goma con un orificio por donde se introduce el tubo conectado a una bombona de carbógeno (95% O₂ - 5% CO₂), lo que permite la oxigenación durante el experimento.

Tras una preincubación a 37°C con agitación (80 ciclos/min) de 5 min se toma una alícuota para determinar la concentración de glucosa del medio, para lo cual hay que centrifugar previamente la alícuota a 3.000 r.p.m. y 4°C durante 3 min. Después se añade a la suspensión celular el péptido que se quiere estudiar, a una concentración de 10^{-10} - 10^{-7} con lo que comienza la incubación. En el control se añade medio de incubación. A los 10 y a los 20 min se vuelven a tomar alícuotas para la determinación de glucosa del medio. La producción de glucosa se calcula con la diferencia de la concentración de glucosa en un punto con la concentración basal tras la preincubación

A los 20 min se recupera toda la suspensión y se centrifuga a 3.000 r.p.m y 4°C durante 3 min. En el sobrenadante se determina el lactato y el precipitado se utiliza para determinar la actividad de proteína quinasa C.

Para estudiar el papel del calcio en la acción glucogenolítica de estas hormonas, se incubaron los hepatocitos con los mismos agonistas, pero con un medio KRB sin Cl_2Ca y EGTA 2 mM pH 7.4.

4.7.2. Determinación de glucosa

La glucosa de la suspensión de hepatocitos se determinó por el método de glucosa oxidasa, explicado en el apartado 2.5.

4.7.3. Determinación de lactato

El lactato se determinó por un método enzimático (Noll 1987)

El método consiste en la reacción del NAD^+ con el lactato en presencia de lactato deshidrogenasa para formar piruvato y $\text{NAD}^+ + \text{H}$. Como el equilibrio de la reacción está desplazado hacia la formación de lactato, el piruvato producido se hace desaparecer convirtiéndolo en alanina por una reacción de transaminación con el L-glutamato como sustrato. El incremento en la concentración de NADH, medida como absorbancia a 365 nm es directamente proporcional a la cantidad de lactato

5. AISLAMIENTO DE MEMBRANAS PLASMATICAS DE HIGADO DE RATA

Realizado según el método de Neville (1968) con algunas modificaciones.

5.1. MATERIAL:

Animales: ratas Wistar hembras de 170-220 g de peso y aproximadamente 2 meses de edad. Alimentadas hasta el momento del sacrificio con una dieta standard y agua "ad libitum".

. Reactivos:

- Medio: NaHCO_3 1 mM.

- Sacarosa 69%: se disuelven 69 g de sacarosa en 31 ml de agua bidestilada y desionizada. Calentar hasta la disolución. Tras enfriar se comprueba la concentración con un refractómetro y se ajusta exactamente a 69%.

- Sacarosa 42%: se disuelven 42 g de sacarosa en 57 ml de agua bidestilada y desionizada. Ajustar exáctamente la concentración a 42% con el refractómetro.

. Todas las operaciones deben realizarse a 4°C.

. Centrífuga de alta velocidad (Beckman-J21).

. Ultracentrífuga (Beckman-L5)

. Homogenizador de vidrio (25 ml).

5.2. METODO

1. Se decapitan y sangran 7 u 8 ratas. Se laparotomizan y se extrae el hígado, que se coloca en un vaso de precipitado. Se tritura con una batidora durante 1 minuto.

2. Se homogeneiza en Potter de vidrio, mediante 8 vigorosos golpes de émbolo.

Todo el homogenado se pasa a un vaso de precipitado que contiene 250 ml de medio y se agita durante 5 min.

3. Se filtra a través de una gasa doble. Se vuelve a filtrar a través de una gasa cuádruple.

El filtrado se agita y se toman 2 alícuotas de 0.3 ml para poder determinar la concentración de proteínas.

4. Se centrifuga el filtrado a 15.000 x g (equivalente en la centrífuga Beckman J-21 y rotor J A-20 a 6500 rpm) durante 30 min a 4°C. Se desecha el sobrenadante por decantación, teniendo cuidado de que no se desprenda el sedimento. Este se remueve con una espátula.

5. Se trasvasa el sedimento, con ayuda de una pipeta Pasteur, a un homogenizador Potter de idénticas características al utilizado anteriormente. Se homogeniza mediante 3 vigorosos golpes de émbolo.

6. El homogeneizado se lleva a un erlenmeyer que contenga aprox. 34 ml de sacarosa al 69%. Se agita vigorosamente. Mediante el refractómetro se ajusta la solución al 44% (añadiendo a la solución agua bidestilada o solución de sacarosa al 69% según sea necesario).

7. Se reparte la solución ajustando al 44% en tubos de ultracentrífuga Beckman modelo L5-65). Se añade cuidadosamente, con pipeta Pasteur, sacarosa al 42% hasta

conseguir un gradiente discontinuo 44%/42%. Se equilibra el peso de los tubos, puestos ya en sus fundas correspondientes del rotor.

Se centrifuga a a 90.000 x g (equivalente en la centrifuga utilizada por nosotros a 25.000 rpm) durante 120 min a 4°C.

8. Se recogen las membranas que flotan con una espátula de cuchara y se trasvasa a un tubo de plástico que contenga 10 ml de medio. Se agita fuertemente y se llena el tubo con medio, con objeto de diluir la sacarosa de la suspensión de membranas plasmáticas.

9. Se centrifuga a 3.000 x g (equivalente en la centrifuga J-21 a 15.000 rpm) durante 10 min a 4°C. Se desecha el sobrenadante.

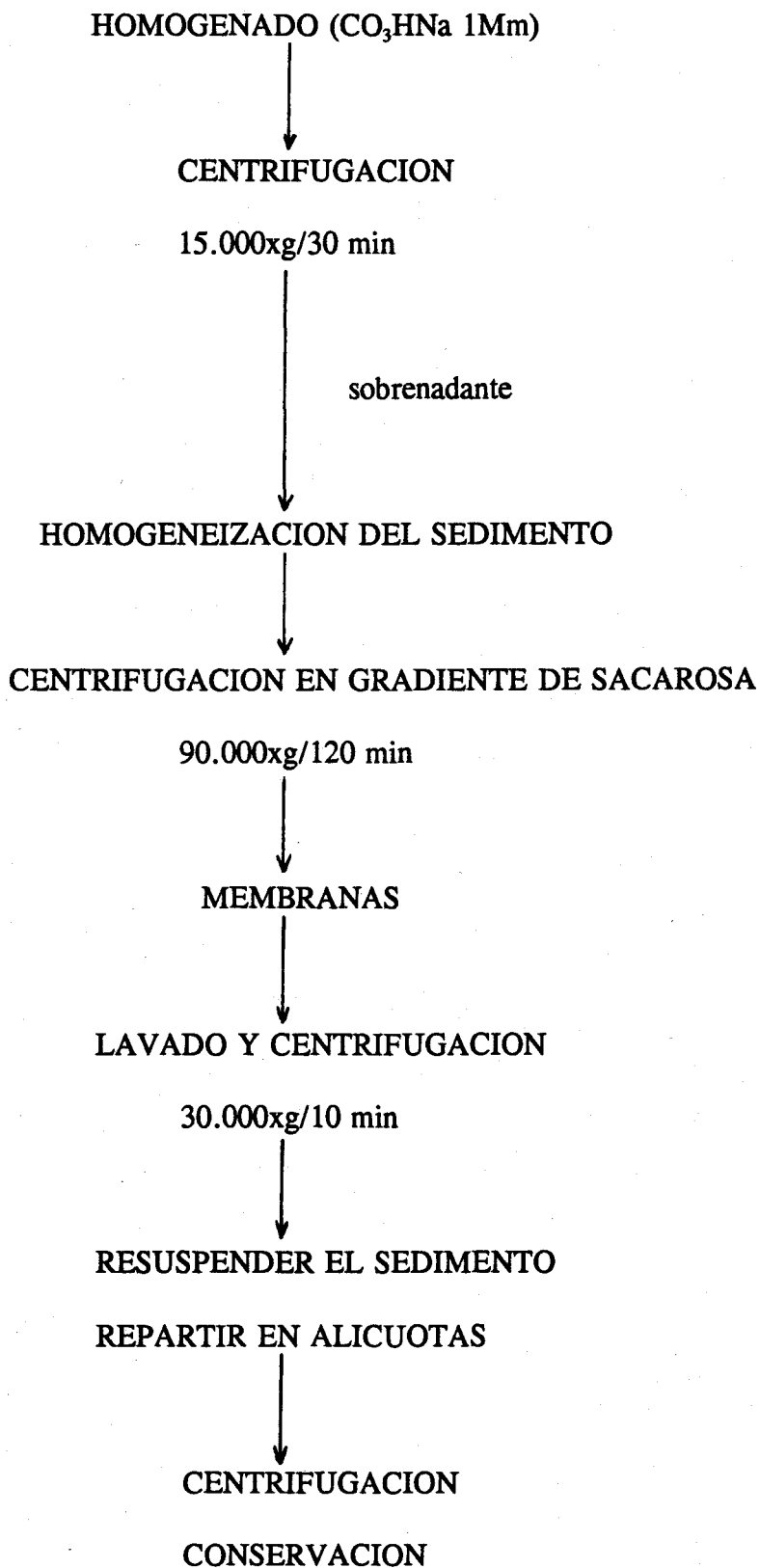
10. Se resuspende de nuevo el medio hasta un volumen final de 20 ml. Se agita fuertemente para conseguir una suspensión homogénea de membranas plasmáticas; y se distribuye en alícuotas de 0.5 ml.

11. Se centrifugan las alícuotas en tubos pequeños cónicos (Eppendorf) y se desecha el sobrenadante. Los precipitados se conservan a -80°C.

En el esquema de la página siguiente aparecen las distintas fases del proceso de aislamiento.

5.3. DETERMINACION DE PROTEINAS

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford facilitado por Bio-Rad, utilizando un patrón de albúmina sérica bovina.

AISLAMIENTO DE MEMBRANAS HEPATICAS - NEVILLE, 1968.

6. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ADENIL-CICLASA

Para la determinación de la adenil-ciclasa se midió la producción de AMPc por los hepatocitos y las membranas hepáticas.

6.1. PRODUCCION DE AMPc POR LOS HEPATOCITOS

6.1.1 Reactivos

- TBB/IBMX: Tris 50 mM, BSA 2%, bacitracina 2 mg/ml, isobutil-metil-xantina 0.4 mM, pH 7.5.
- TB: Tris 50 mM, BSA 2%, pH 7.5.
- Los péptidos se diluyen en TB de forma que en el ensayo queden a concentraciones comprendidas entre 10^{-11} y 10^{-6} M.
- Metanol.
- Preparación celular: los hepatocitos aislados se resuspenden en KRB BSA 0.1%, glucosa 1.5 mM de forma que queden a una concentración final de 0.5×10^6 cel/ml.

6.1.2. Incubación

Se realiza la incubación en tubos de plástico de 3 ml con un volumen final de 0.5 ml. Se añaden por este orden:

- 250 μ l de TBB/IBMX
- 50 μ l de TB
- 50 μ l del péptido que se esté probando a una concentración de 10^{-11} - 10^{-6} (25 μ l a una concentración doble si se incubaba con dos péptidos), o 50 μ l de TB como basal.

- La reacción se inicia añadiendo 150 μ l de la preparación celular. De esta forma en el volumen final de incubación los diversos reactivos quedan a las siguientes concentraciones:

- Tris 35 mM, pH 7.5
- BSA 1.6%
- Bacitracina 1 mg/ml
- IBMX 0.2 mM
- ClNa 50 mM

Se incuba durante 45 min a 15°C. La reacción se detiene añadiendo 1.25 ml de metanol que precipita la fracción proteica. Se centrifuga 10 min a 3.000 r.p.m. Alícuotas de 200 μ l del sobrenadante se pasan a tubos de vidrio (2 ml) en los que se deja evaporar el metanol en una estufa a 60°C, quedando la fracción soluble, con el AMPc producido, adherida a la pared del tubo. Esta fracción se guarda a -80°C hasta el día de la determinación, en el que se resuspende con el buffer del radioinmunoensayo de AMPc.

6.2. PRODUCCION DE AMPc POR MEMBRANAS HEPATICAS

6.2.1. Reactivos

. TBB/ATP: solución que contiene un sistema regenerador de ATP:

- EDTA 2.5 mM
- Creatín-quinasa 0.25 mg/ml
- Creatín-fosfato 5 mM
- IBMX 0.5 mM

- ATP 0.25 mM
- Tris 50 mM, pH 7.5
- BSA 2%
- Bacitracina 2 mg/ml

. TB/Mg²⁺

- Cl₂Mg 25 mM
- Tris 50 mM, pH 7.5
- BSA 2%

. TBB

. TB

- . Los péptidos se preparan en TB para una concentración final de 10⁻¹¹ - 10⁻⁶M.
- . Fluoruro de sodio (FNa) 0.1 M (concentración final) como control de estimulación de la adenil-ciclasa.

. GTP 10⁻⁶ M (concentración final), en los tubos que se especifican en los resultados.

. Preparado de membranas: Las membranas se descongelan lentamente y se diluyen en tampón TBB, hasta una concentración de 1.250 µg/ml, para dar en la mezcla de la reacción una concentración final de 250 µg/ml.

6.2.2. Incubación

Se realiza la incubación en tubos de plástico de 3 ml, en un volumen final de 250 µl. Se añaden por el siguiente orden:

- 100 µl TBB/ATP
- 50 µl TB/Mg²⁺

- 50 μ l de la dilución de péptidos (10^{-11} - 10^{-6}) en TB

- 50 μ l de membranas disueltas en TBB

Se incuba durante 45 min a 15°C. La reacción se detiene añadiendo 1.25 ml de metanol que precipita la fracción proteica. Se centrifuga 10 min a 3.000 r.p.m. Alícuotas de 200 μ l del sobrenadante se pasan a tubos de vidrio (2 ml) para evaporar el metanol en estufa (60°C). Los extractos se guardan a -80°C hasta el día de las determinaciones de AMPc.

6.3. DETERMINACION DE AMPc

La determinación de AMPc se llevó a cabo por un método de radioinmunoanálisis, facilitado por Amersham.

El método se basa en la competición entre el AMPc, y una cantidad fija de AMPc marcado con ^{125}I por un número limitado de sitios de unión en un anticuerpo específico. Con una cantidad fija de anticuerpo y ligando radiactivo, la cantidad de ligando radiactivo unido al anticuerpo será inversamente proporcional a la concentración de ligando no radiactivo que se añada a la incubación.

El anticuerpo unido al AMPc reacciona después con un segundo anticuerpo que esta fijado a unas partículas de polímero. La separación de la fracción de anticuerpo unido se efectúa por centrifugación y decantación del sobrenadante.

La medición de la radiactividad en el precipitado hace posible el cálculo de la cantidad de AMPc marcado en la fracción unida al anticuerpo. La concentración de AMPc no marcado de la muestra se determina mediante la interpolación en una curva patrón (fig. 13).

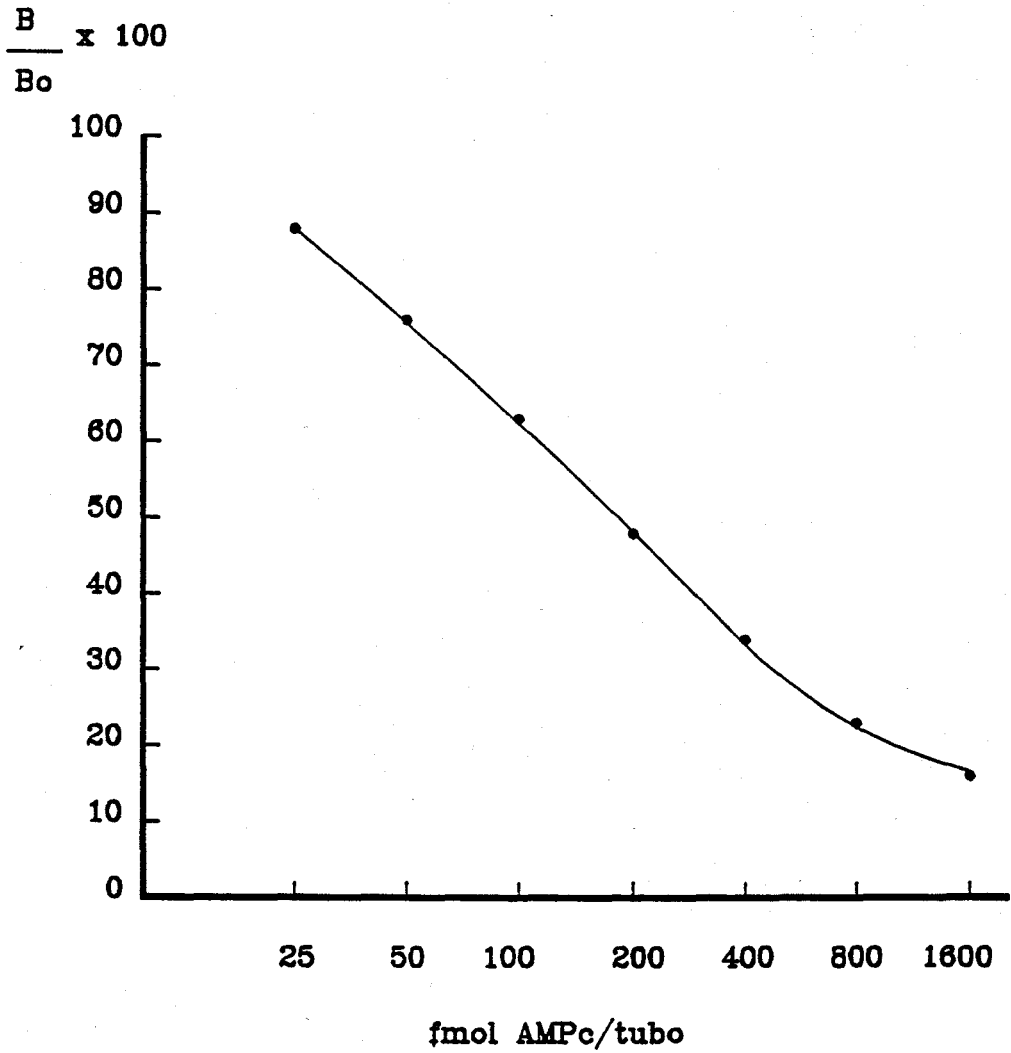


Fig. 13. Curva patrón del RIA de AMPc. $B/B_0 \times 100$: porcentaje de radiactividad referido al máximo (B_0).

7. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEINA QUINASA C

La actividad proteina quinasa C se determinó por el procedimiento de Kuo et al (1980), como la fosforilación dependiente de Ca^{2+} y sensible a fosfolípido y a histona rica en lisina.

7.1. OBTENCION DE LA FRACCION CRUDA CITOSOLICA

Los hepatocitos separados del medio de incubación por centrifugación, se resuspenden en medio Hanks libre de calcio y magnesio:

- NaCl 140 mM
- KCl 6 mM
- KH_2PO_4 0.4 mM
- Na_2HPO_4 0.3 mM

Tras resuspender el precipitado celular en este medio de homogenización se sonica durante 15 segundos a $4^{\circ}C$, y se realiza una primera centrifugación a aproximadamente 100 x g para retirar los restos celulares no homogenizados.

Se recupera el sobrenadante y se somete a otra centrifugación a 15.000 x g durante 10 min. El sobrenadante se consideró como la fracción cruda citoplasmática de los hepatocitos.

7.2. REACTIVOS

- . Tampón de incubación:
 - Tris 25 mM, pH 7.5
 - MgCl₂ 10 mM
 - CaCl₂ 0.1 mM
- . Fosfatidil serina 2.5 mg/ml)
- . Dioleina 6 mg/ml
- . Histona rica en residuos de lisina 1 mg/ml
- . ³²P-ATP 100 μCi/ml 0.5 mM
- . Filtros Whatman (2.5 cm de lado)
- . Acido tricloroacético 10% (TCA)

7.3. METODO

Se preparan 2 tipos de tubos con un volumen final de 200 μl:

1. Problemas: - 20 μl de histona
 - 20 μl de fosfatidil serina
 - 20 μl de dioleina
 - 4 μl de ³²P-ATP
 - 20 μl de la fracción cruda citosólica
 - 116 μl de tampón de reacción
2. Tubos blanco: Igual que el problema pero añadiendo 20 μl de tampón en vez del sobrenadante.

Se incubó a 37°C durante 15 min. La reacción se para pipeteando 100 μ l de la mezcla en filtros Whatman. Los filtros se introducen en una solución de TCA 10% durante 15 min para precipitar las proteínas, y se dan otros dos lavados más de 10 min cada uno. Para calcular el estándar, se mezclan los tubos problemas y se pipetean 10 μ l en un filtro. La radiactividad de los estándares se mide directamente, sin lavar los filtros.

Los filtros se dejan secar y la radiactividad se cuenta en viales con 3 ml de líquido de centelleo.

Los valores se calculan como pmol de ATP incorporados a la histona después de restar la radiactividad del tubo blanco.

8. REACTIVOS Y APARATOS

8.1. REACTIVOS

De Amersham procedían el ATP-³²P y los reactivos para el RIA de AMPc.

De Bio-rad el reactivo de Bradford.

De Boehringer la colagenasa, la arginina-vasopresina, la amiloglucosidasa, el ATP, el creatín-fosfato y la creatina-quinasa, los reactivos para determinar la glucosa, el lactato y el ELISA de insulina.

De Medgenix los reactivos para el RIA de glucagón.

De Sigma se adquirió: la albúmina sérica bovina, el dextrano T-70, el Tris, la sacarosa y el IBMX.

De Novo el glucagón porcino, y la insulina de rata.

El VIP y la pancreastatina porcinos de Peninsula.

8.2. APARATOS

Las homogenizaciones se hicieron en un homogenizador de vidrio Potter o con sonicador MSE, MK2.

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro LKB modelo IIE.

Las incubaciones se realizaron en un baño termostatzado Selecta (con compresor para enfriar) modelo Unitronic-320.

Los contajes de radiactividad se hicieron en un contador de centelleo líquido Kontron modelo Betamatic y en un contador gamma de LKB modelo 1261.

La infusión de sustancias en el pancreas se realizó con un infusor Sage Instruments modelo 352.

Para la perfusión de pancreas e hígado se utilizó una bomba peristáltica de Gilson modelo Minipuls 2.

La recogida de muestras de la perfusión de pancreas se efectuó con un colector de fracciones modelo 1200 PVP.

9. ANALISIS ESTADISTICO

Para determinar la significación estadística de las diferencias encontradas en los experimentos, se utilizó el test de la t de Student. Se ha considerado una diferencia significativa cuando el valor de p es menor de 0.05, lo que supone que hay menos de un 5% de probabilidades de que las diferencias sean debidas al azar. La n fue siempre mayor o igual a 4.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

1. EFECTO DE LA PANCREASTATINA SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA EN PANCREAS AISLADO Y PERFUNDIDO

La adición de pancreastatina (10 nM) al medio de perfusión inhibió marcadamente la primera fase de la secreción de insulina estimulada por glucosa 16.7 mM ($p < 0.001$) en el páncreas aislado y perfundido de rata. Sólo hemos representado la 1ª fase de la secreción, ya que el estímulo que utilizamos fueron pulsos de glucosa de corta duración (5 min) y descansos de 15 min. En la figura 14 se representa el primer pulso. En los estímulos siguientes, la secreción de insulina no se vio modificada por la pancreastatina.

1.1. DISCUSION

Desde la descripción de su descubrimiento por Tatemoto et al (1986) la pancreastatina ha sido considerada como miembro de una nueva familia de péptidos con una función inhibitoria de la secreción de insulina. Posteriores hallazgos han descrito su localización en el mismo granulo beta, alfa o delta, según la especie estudiada; proponiendo así un posible papel fisiológico de la pancreastatina modulando la secreción de insulina de una forma tanto paracrina como autocrina. Nuestros resultados concuerdan con los de la literatura en que la pancreastatina es un inhibidor poco potente de la insulino-secreción en el pancreas aislado y estimulado con glucosa. Y además es lógico que sea una moderada regulación, ya

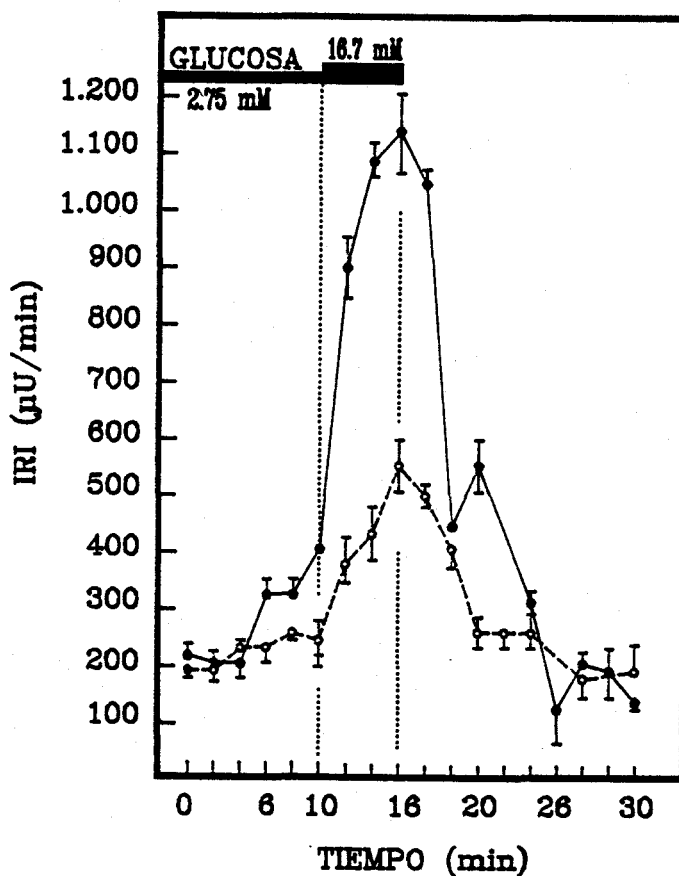


Fig. 14. Efecto de la pancreastatina (10 nM) en el medio de perfusión sobre la secreción de insulina estimulada con glucosa en el páncreas aislado y perfundido de rata. Los puntos blancos representan los niveles de insulina en el perfusado del experimento con pancreastatina (n=6), los puntos negros corresponden al grupo control (n=5).

que se ha demostrado que la pancreastatina es cosecretada con la insulina desde el betagranulo (Östenson et al 1989).

Por otra parte la aparición de este nuevo péptido pancreático nos llevó a preguntarnos si la pancreastatina tendría algún papel hormonal en el metabolismo de la glucosa además del efecto regulador de la secreción de la insulina. Otros grupos de investigación extranjeros se han ocupado, sin demasiado éxito, de descifrar el mecanismo de acción de la pancreastatina en su acción inhibidora de la secreción de insulina (Lorinet et al 1989; Östenson et al 1989). Del mismo modo, han estudiado el papel de la pancreastatina sobre tejidos extrapancreáticos como la glándula paratiroides (Fasciotto et al 1988), el estómago (Lucey et al 1988) y el páncreas exocrino (Funakoshi et al 1989, 1990). Sin embargo, no debemos olvidar que la principal función del islote de Langerhans es el control de la glucemia, contrarregulada por otras hormonas extrapancreáticas, fundamentalmente las catecolaminas, las cuales están también directamente relacionadas con la pancreastatina por localizarse en las mismas células cromafines. Como hemos verificado en nuestros resultados, la pancreastatina es inhibidora de la secreción de insulina, al igual que lo son las catecolaminas. A continuación nos dispusimos a estudiar si la pancreastatina comparte con las catecolaminas su función contrarreguladora de la insulina en el metabolismo de la glucosa.

2. ACCION DE LA PANCREASTATINA SOBRE EL PANCREAS ENDOCRINO Y LA GLUCOGENOLISIS HEPATICA IN VIVO

2.1. EFECTO DE LA PANCREASTATINA SOBRE LA GLUCEMIA, LA INSULINA Y EL GLUCAGON PLASMATICO. COMPARACION CON EL GLUCAGON Y EL VIP

La inyección intramesentérica de pancreastatina 300 pmol/Kg) produjo un incremento en la glucosa sanguínea con un pico a los 5 min ($p < 0.01$). A los 10 min la glucemia era aún significativamente más alta que en el grupo control ($p < 0.05$). Pero a los 20 min, los niveles de glucosa sanguíneos eran iguales a los de los controles (fig. 15).

La inyección de glucagón (300 pmol/Kg) en el lecho esplácnico incrementó los niveles de glucosa sanguínea de una forma constante en el tiempo. A los 5 min no había diferencia entre este grupo y el inyectado con pancreastatina. A los 10 min la glucemia era ya de 6.2 ± 0.2 mM y 6.7 ± 0.3 mM a los 20 min.

En cambio los niveles plasmáticos de insulina y glucagón no se afectaron significativamente por la inyección de pancreastatina, en ninguno de los tiempos en que se tomaron las muestras de sangre .

El glucagón elevó ligeramente los niveles plasmáticos de insulina, que fueron incrementándose con el tiempo. Este efecto se hizo significativo ($p < 0.05$) a los 20 min (34 ± 7 μ U/ml, comparado con las 16 μ U/ml del grupo control) (Fig. 15).

Tras la inyección de glucagón, los niveles plasmáticos de dicha hormona eran de 720 ± 70 pg/ml a los 5 min. Seguidamente, fue disminuyendo progresivamente

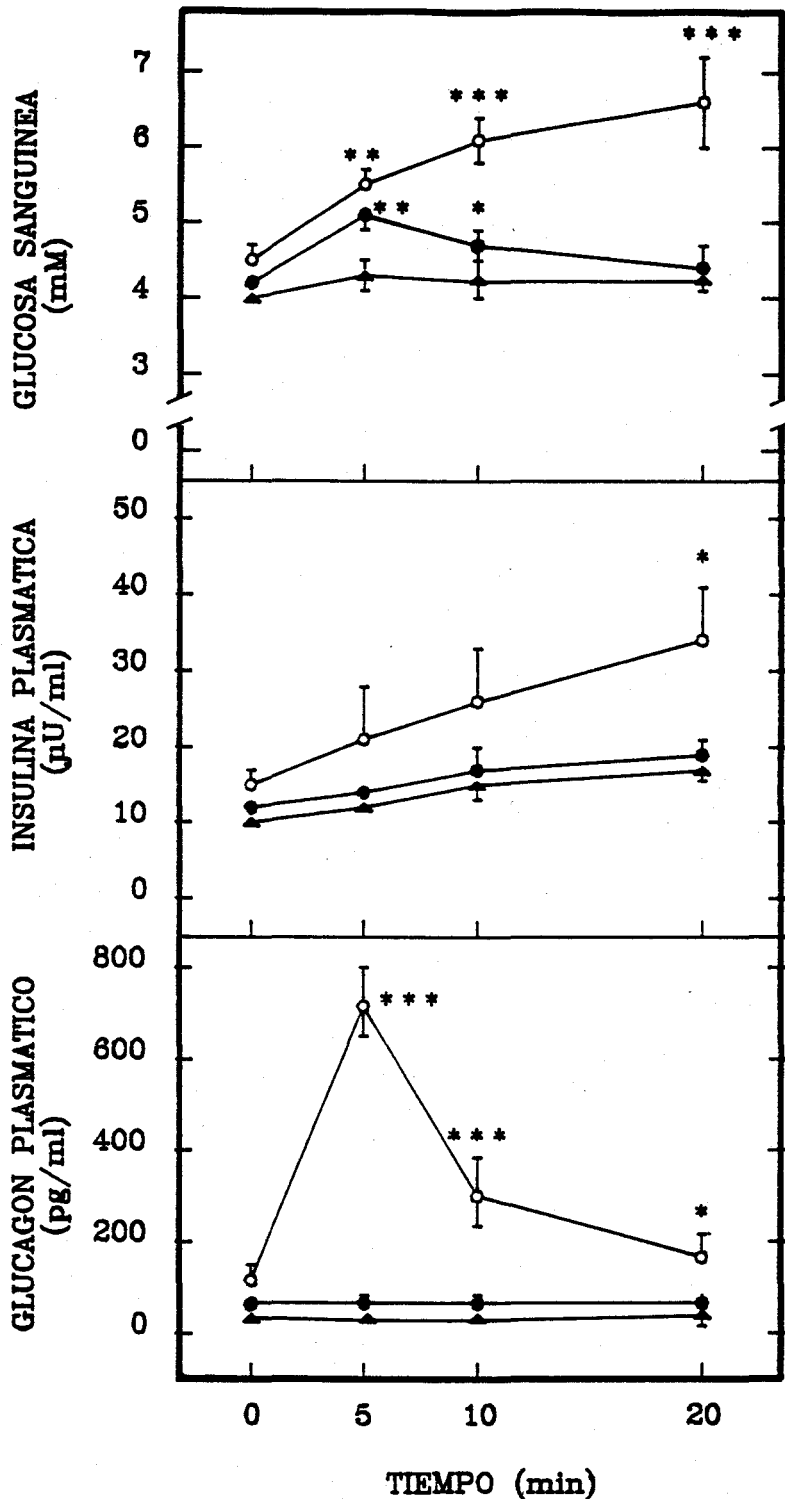


Fig. 15. Niveles sanguíneos de glucosa (arriba), niveles plasmáticos de insulina (en medio), y de glucagón (abajo), antes y varios tiempos después de la inyección de pancreastatina (300 pmol/Kg; círculos negros, n=8), glucagón (300 pmol/Kg; círculos blancos, n=8), o salino-BSA-1% (triángulos negros, n=6) en la vena mesentérica superior. Se muestran las medias \pm ESM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, comparado con el grupo control.

Tabla II. Efecto del VIP (300 pmol/Kg), inyectado en la vena mesentérica superior, sobre la glucemia, la insulina y el glucagón plasmáticos. V (grupo inyectado con VIP), C (grupo inyectado con salino-BSA-1%). Los valores son las medias \pm ESM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ (n=6).

		<u>0 min</u>	<u>5 min</u>	<u>10 min</u>	<u>20 min</u>
Glucemia (mM)	C	4.0 \pm 0.2	4.1 \pm 0.2	4.1 \pm 0.2	4.1 \pm 0.2
	V	4.1 \pm 0.1	4.5 \pm 0.1	4.9 \pm 0.2	5.5 \pm 0.2**
Insulina (μU/ml)	C	13.5 \pm 1.0	13.8 \pm 1.5	13.2 \pm 1.2	14.0 \pm 0.8
	V	14.6 \pm 0.3	19.0 \pm 1.4*	19.1 \pm 1.1*	21.5 \pm 0.7*
Glucagón (pg/ml)	C	82 \pm 10	75 \pm 10	78 \pm 12	80 \pm 10
	V	87 \pm 10	140 \pm 7	94 \pm 20	100 \pm 25

la concentración de glucagón plasmático, que a los 20 min todavía era de 175 ± 38 pg/ml.

La administración de VIP (300 pmol/Kg) en el territorio esplácnico venoso, produjo una ligera hiperglucemia (Tabla II) que fue incrementándose con el tiempo, para ser significativa a los 20 min (5.5 ± 0.2 mM, $p < 0.05$).

Los niveles basales de insulina plasmática en el grupo inyectado con VIP se incrementaron significativamente con respecto al grupo control desde los 5 min ($p < 0.05$), y fue incrementándose con el tiempo hasta los 20 min (21.5 ± 0.7 μ U/ml) en que la diferencia fue más significativa con respecto al grupo control ($p < 0.001$) (tabla II).

El VIP incrementó bastante más los niveles plasmáticos de glucagón que desde 87 ± 10 pg/ml se elevaron a 140 ± 7 pg/ml ($p < 0.001$) en forma de pico a los 5 min. A los 10 y 20 min ya no había diferencias significativas con respecto al grupo control.

2.2. EFECTO DEL FRAGMENTO C-TERMINAL DE LA PANCREASTATINA (33-49) SOBRE LA GLUCEMIA, LA INSULINA Y EL GLUCAGON PLASMATICOS

La inyección intramesentérica del fragmento C-terminal 33-49 de la pancreastatina (300 pmol/Kg) produjo un incremento en la glucemia (fig. 16) continuo en el tiempo, alcanzando a los 20 min el valor de 5.7 ± 0.3 mM ($p < 0.005$) un valor mas alto que el producido por el péptido completo ($p < 0.05$) a los 5 min. Sin embargo, como se muestra en la tabla III los niveles plasmáticos

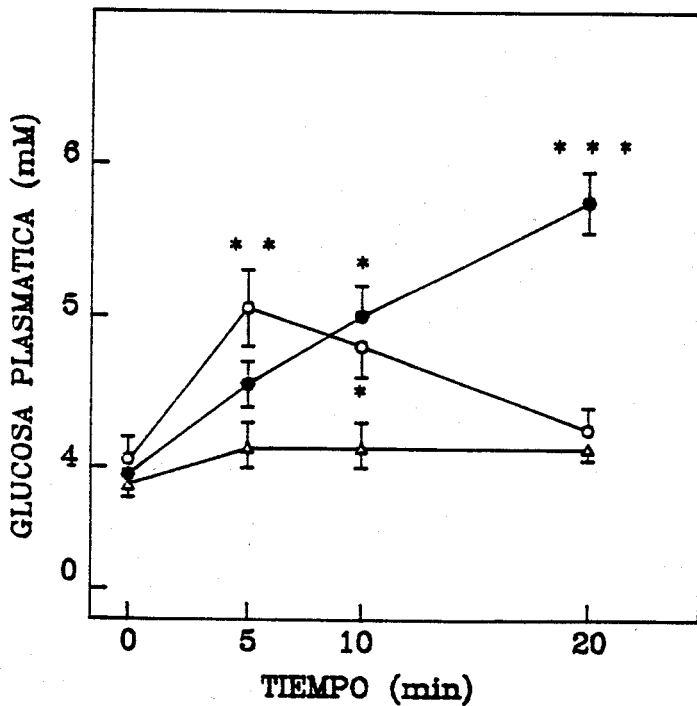


Fig. 16. Niveles sanguíneos de glucosa antes y varios tiempos después de la inyección de pancreastatina (300 pmol/kg; círculos blancos, n=8), su fragmento 33-49 C-terminal (300 pmol/Kg; círculos negros, n=8), o salino-BSA-1% (triángulos blancos, n=6) en la vena mesentérica superior. Se muestran las medias \pm ESM. Los asteriscos son los niveles de significancia estadística de las diferencias con el grupo control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Tabla III. Niveles plasmáticos de insulina y glucagón antes y varios tiempos después de la inyección de pancreastatina (P) (300 pmol/Kg, n=8), su fragmento 33-49 C-terminal (F) (300 pmol/Kg, n=8), o salino-BSA-1% (C) (n=6). No había diferencias significativas comparando con el grupo control (C).

		<u>0 min</u>	<u>5 min</u>	<u>10 min</u>	<u>20 min</u>
Insulina (μ U/ml)	C	13.5 \pm 1.0	13.8 \pm 1.5	13.2 \pm 1.2	14.0 \pm 0.8
	P	13.0 \pm 1.0	13.0 \pm 1.0	16.0 \pm 2.0	18.0 \pm 3.0
	F	14.0 \pm 0.5	17.0 \pm 1.5	16.0 \pm 1.0	17.0 \pm 1.0
Glucagón (pg/ml)	C	82 \pm 10	75 \pm 10	78 \pm 12	80 \pm 10
	P	82 \pm 6	86 \pm 6	84 \pm 9	83 \pm 13
	F	75 \pm 6	79 \pm 10	81 \pm 11	88 \pm 17

basales de insulina y glucagón no se afectaron significativamente, como se observó tras la inyección de pancreastatina (1-49).

2.3. EFECTO COMBINADO DE PANCREASTATINA + GLUCAGON Y FRAGMENTO C-TERMINAL (33-49) + GLUCAGON SOBRE LA GLUCEMIA Y LA INSULINA PLASMÁTICA

La administración conjunta de glucagón y pancreastatina incrementó la glucemia significativamente ($p < 0.05$) con respecto a la hiperglucemia producida por la administración separada de los péptidos (fig. 17). La inyección de glucagón junto al fragmento 33-49 C-terminal de pancreastatina incrementó aún más la hiperglucemia en todos los puntos en que se tomaron muestras.

La estimulación de la secreción de insulina producida por el glucagón fue inhibida por la administración conjunta de pancreastatina ($p < 0.05$). Esta inhibición fue aún mayor al administrar junto al glucagón el fragmento 33-49 C-terminal de pancreastatina.

2.4. EFECTO DE LA PANCREASTATINA SOBRE LA GLUCOGENOLISIS HEPÁTICA. COMPARACION CON EL GLUCAGON Y EL VIP

El contenido basal de glucógeno era de 51 ± 5 mg por g de hígado (peso húmedo). Los resultados de glucogenolisis están expresados como la diferencia de la concentración hepática de glucógeno entre las condiciones basales (tiempo 0) y tras la inyección de dosis equimolares de pancreastatina, glucagón y VIP.

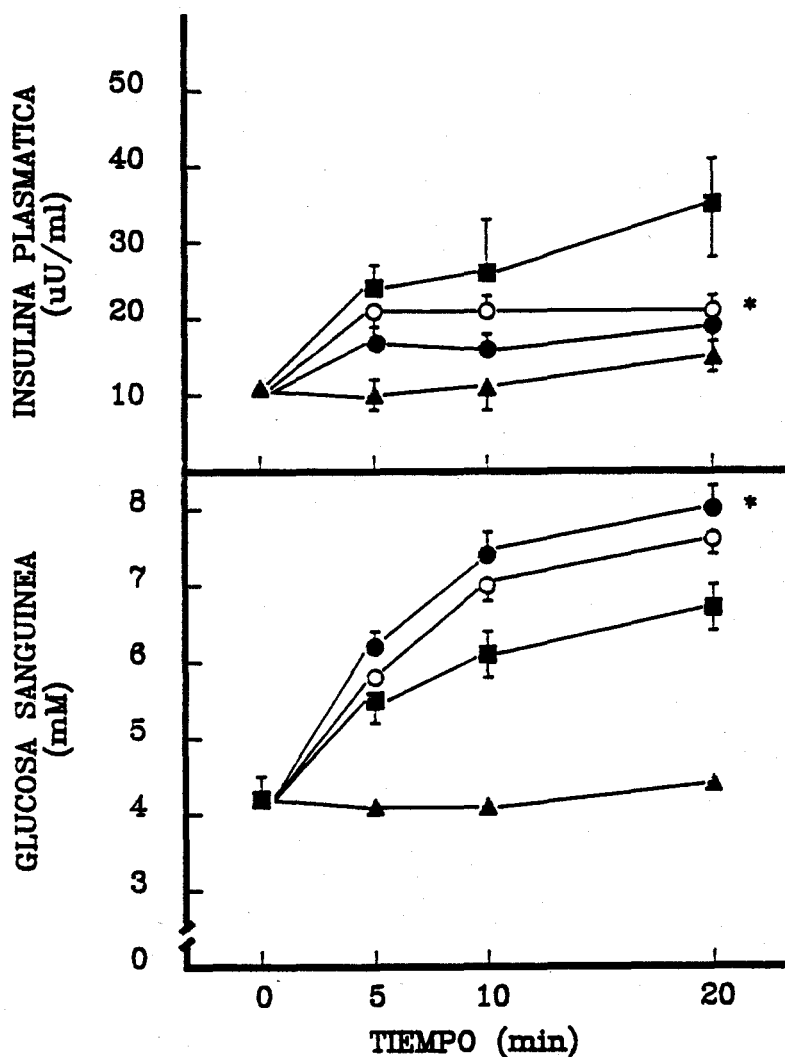


Fig. 17. Efecto combinado del glucagón con la pancreastatina (círculos blancos) o con su fragmento 33-49 C-terminal (círculos negros), comparado con el efecto del glucagón (cuadrados negros), (los triángulos negros son los controles) sobre la glucosa sanguínea (abajo) y los niveles plasmáticos de insulina (arriba), tras la inyección en vena mesentérica superior. Se muestran las medias \pm ESM de siete experimentos. * $p < 0.05$.

La glucogenolisis hepática se incrementó significativamente 10 min después de la administración intramesentérica de 300 pmol/kg de pancreastatina (fig. 18), comparado con el grupo control (desde 2.8 ± 1.4 mg/g hasta 7.8 ± 1.4 mg/g). A los 20 min las diferencias fueron aún mas significativas (de 3.4 ± 1 mg/g a 12.2 ± 1.2 mg/g). Este efecto fue comparable al ocasionado por el glucagón y algo mayor en magnitud que el producido por el VIP (fig. 19)

La administración conjunta de pancreastatina y glucagón no incrementó la glucogenolisis hepática (fig. 20).

2.5. EFECTO DEL FRAGMENTO C-TERMINAL (33-49) SOBRE LA GLUCOGENOLISIS HEPATICA IN VIVO

El fragmento 33-49 de pancreastatina (300 pmol/kg) produjo un incremento en la glucogenolisis hepática de forma más significativa ($p < 0.0005$) que el péptido de 49 aminoácidos ($p < 0.001$) aunque no había diferencias significativas entre estos dos grupos (fig. 21).

La administración conjunta de la pancreastatina o su fragmento (33-49) junto al glucagón no modificó la glucogenolisis causada por el glucagón (fig. 20).

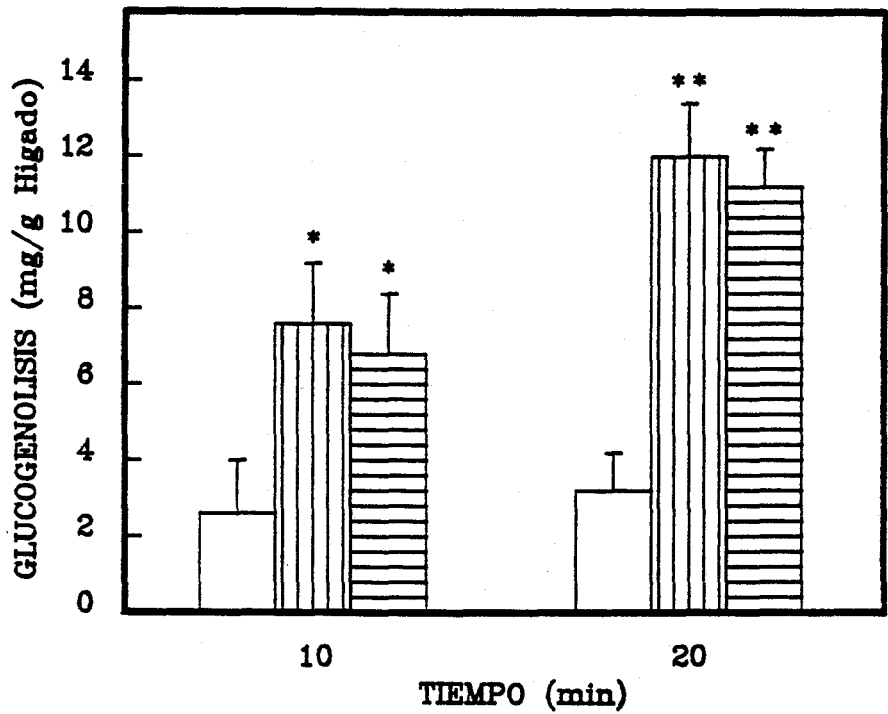


Fig. 18. Glucogenolisis tras la inyección de pancreastatina (300 pmol/kg; barras rayadas verticalmente), glucagón (300 pmol/Kg; barras rayadas horizontalmente), o salino-BSA-1% (barras blancas) en la vena mesentérica superior. Los valores son las medias \pm ESM de siete experimentos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

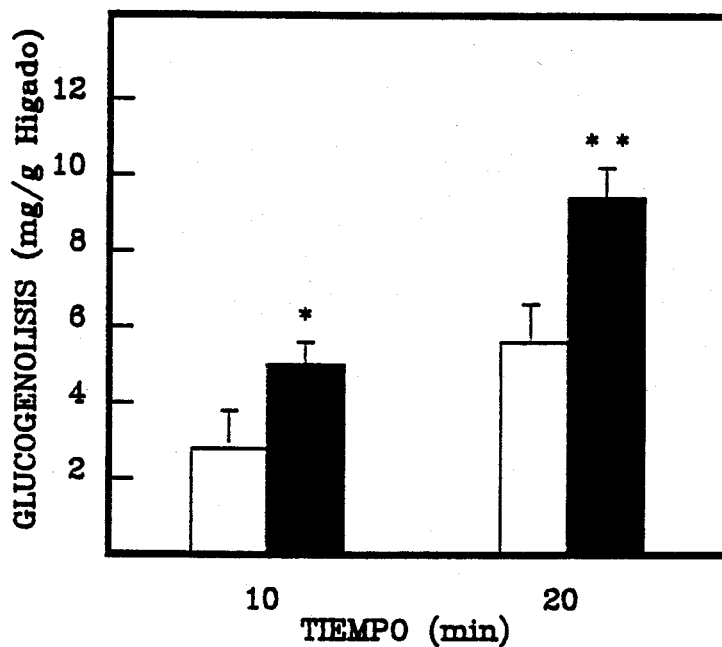


Fig. 19. Glucogenolisis tras la inyección de VIP (300 pmol/kg; barras negras) o salino-BSA-1% (barras blancas) en la vena mesentérica superior. Los valores representan las medias \pm ESM de ocho experimentos.. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$).

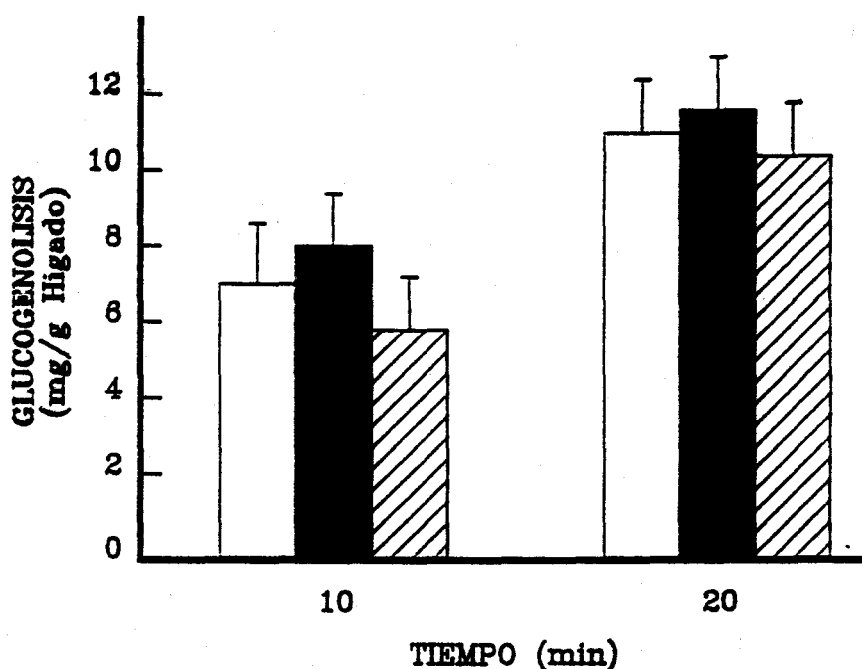


Fig. 20. Glucogenolisis tras la inyección en la vena mesentérica superior de glucagón (300 pmol/Kg, barras blancas), glucagón más pancreastatina (300 pmol/Kg de cada hormona, barras negras), o glucagón más el fragmento 33-49 C-terminal de pancreastatina (300 pmol/Kg, barras rayadas). Se representan las medias \pm ESM de siete experimentos.

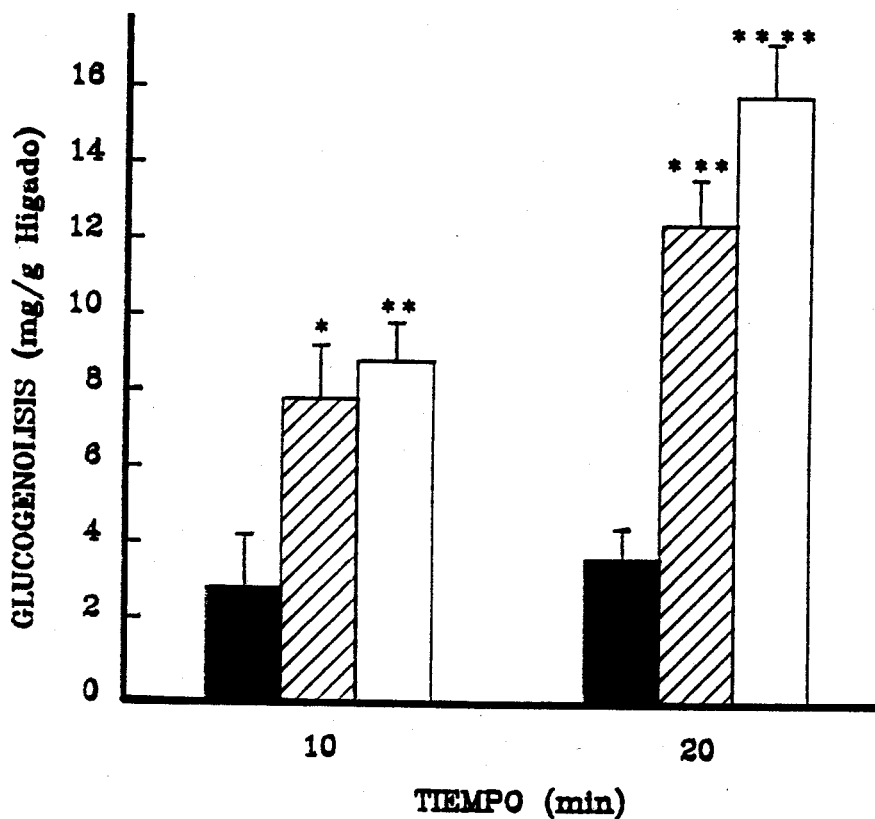


Fig. 21. Glucogenolisis tras la inyección de pancreastatina (300 pmol/kg; barras rayadas), su fragmento 33-49 C-terminal (300 pmol/kg; barras blancas), o salino-BSA-1% (barras negras) en la vena mesentérica superior. Los valores son las medias \pm ESM de siete experimentos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$, comparando con el grupo control.

2.6. DISCUSION

Hasta la fecha son pocos los trabajos en los que hayan estudiado el efecto in vivo de la pancreastatina sobre el páncreas endocrino, y los resultados parecen contradictorios. Ahren et al (1988) hicieron un estudio en ratones a los que administraron 4 nmol/kg de pancreastatina, encontrando un débil efecto inhibitorio de la secreción de insulina y estimulador sobre la secreción basal de glucagón, explicando así el pico de hiperglucemia que también encontraron en el ratón. Nuestros resultados en cambio, demuestran que en la rata in vivo, 300 pmol/kg de pancreastatina inyectados via portal estimula la glucogenolisis hepática, y que este efecto podría ser responsable de la hiperglucemia, ya que no se modificaron los niveles basales de insulina y glucagón. Por otra parte, Lindskog et al (1988) publicaron un efecto estimulador de la pancreastatina sobre el glucagón, sin modificar los niveles plasmáticos de insulina plasmática, también en el ratón.

Estos resultados contradictorios pueden ser explicados por las diferentes especies animales que se han usado, las diferencias en las dosis y por las diferencias en los modelos experimentales. En nuestro caso, las dosis fueron mas bajas buscando un posible papel fisiológico de la pancreastatina.

Funakoshi et al (1989) no encontraron ningún efecto de la pancreastatina sobre la secreción no estimulada de insulina y glucagón en la rata in vivo. Sin embargo, no encontraron efecto alguno sobre los niveles basales de glucemia. La discrepancia con nuestros resultados puede resultar de las diferentes situaciones metabólicas de los animales empleados, ya que ellos llevaron a cabo los experimentos tras un ayuno de 18-24 h, cuando las reservas de glucógeno estan casi totalmente deplecionadas.

Nosotros por el contrario, estudiamos a los animales en el estado postabsortivo, en el que el contenido de glucógeno es máximo.

La administración de VIP a las ratas en estado postabsortivo tuvo unos efectos diferentes. El VIP incrementó los niveles de glucagón plasmáticos de glucagón en mayor grado que los niveles de insulina, como ya se había observado anteriormente (Makhlouf 1980). Este efecto es posiblemente la causa de la hiperglucemia observada, ya que los niveles de glucosa sanguínea no se incrementaron significativamente hasta los 20 min tras la inyección de VIP. Sin embargo, el incremento en la glucogenolisis se observó ya a los 10 min, aunque no sería suficiente para incrementar los niveles de glucosa sanguínea (a los 10 min no había diferencias significativas en la glucemia comparado con los controles). Sin embargo, el incremento en el glucagón, más el VIP que quedara aún en la circulación podría causar la hiperglucemia observada.

Ya se había demostrado que el fragmento C-terminal 33-49 de pancreastatina inhibía mas potentemente la 1ª fase de la secreción de insulina en el pancreas aislado (Tatemoto et al 1986), sugiriendo así una mayor potencia biológica del fragmento de menor tamaño, al igual que ocurre con otros péptidos hormonales como la CCK (Dockray et al 1978). En nuestro estudio hemos demostrado que el fragmento 33-49 de pancreastatina producía una mayor hiperglucemia, y mantenida en el tiempo, así como un efecto algo mayor sobre la glucogenolisis hepática (aunque no llegaba a ser estadísticamente significativo).

Una forma indirecta de buscar el posible mecanismo de acción de una hormona nueva es el estudio del efecto (aditivo o no) de esta al administrarse junto a otra hormona de mecanismo de acción conocido. En nuestro caso empleamos el

glucagón. La administración conjunta de pancreastatina o su fragmento 33-49 en adición al glucagón, no incrementó el efecto glucogenolítico producido por el glucagón, con lo cual se puede deducir que el mecanismo de acción de la pancreastatina, en su efecto glucogenolítico hepático, no es igual el utilizado por el glucagón, que como es bien sabido, actúa estimulando la adenilato ciclasa y produciendo así un incremento de AMPc intracelular. Sin embargo, el efecto hiperglucémico se potenció, ya que la pancreastatina, y más potentemente su fragmento 33-49, inhibió en parte la estimulación de la secreción de insulina por el glucagón. Este efecto inhibitorio de la pancreastatina in vivo, coincide con el encontrado in vitro, en el páncreas aislado y perfundido de rata (Peiró et al 1989).

Sin embargo, nuestro estudio in vivo no se descarta el posible papel de otras hormonas que actúan fisiológicamente desencadenando la glucogenolisis. Es el caso de las catecolaminas. Por ello, el siguiente paso que nos planteamos fue el posible efecto de la pancreastatina sobre los niveles plasmáticos de catecolaminas, utilizando para ello el mismo modelo experimental de ratas en estado postabsortivo, y administración i.v. intramesentérica de pancreastatina.

3. EFECTO DE LA PANCREASTATINA SOBRE LA SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS IN VIVO

La administración de 300 pmol/kg de pancreastatina 33-49 en el territorio esplácnico, produjo un descenso en los niveles plasmáticos de catecolaminas en sangre arterial a los 10 min (tabla IV), aunque sólo la adrenalina disminuyó significativamente respecto al grupo de ratas control. La noradrenalina disminuyó en menor medida, no siendo significativa la diferencia con el grupo control. Los niveles plasmáticos de dopamina no se modificaron tras la inyección del péptido.

3.1. DISCUSION

El hecho de que la pancreastatina tuviera un efecto glucogenolítico in vivo, nos llevó a descartar un posible efecto indirecto, mediado por catecolaminas. La secuencia de pancreastatina está incluida en la de la cromogranina A, la cual parece ser su precursor. Así que, si la cromogranina A está presente en todo el sistema cromafín, podría haber una conexión con este sistema. Nuestros resultados coinciden con los mostrados recientemente por (Simon et al 1988), en los que se muestra in vitro un control negativo de varios péptidos derivados de la cromogranina A sobre la secreción de células cromafines adrenales en cultivo. En este sistema celular la pancreastatina funcionaría como un modulador autocrino, inhibiendo y autorregulando la secreción de la hormona con la que se cosecreta, al igual que ocurre en la célula B.

Como nuestros resultados de glucogenolisis hepática por pancreastatina in vivo no eran pues explicables por un mecanismo indirecto, mediado por catecolaminas,

decidimos dar un nuevo paso y estudiar in vitro la actividad glucogenolítica de la pancreastatina en hepatocitos aislados.

Tabla IV. Efecto de la pancreastatina 33-49 sobre los niveles plasmáticos de catecolaminas (pg/ml) en sangre arterial, 10 min después de inyectarse en la vena mesentérica superior. Se muestran las medias \pm ESM de siete experimentos.

	<u>NORADRENALINA</u>	<u>ADRENALINA</u>
CONTROL	188 \pm 35	215 \pm 32
PANCREASTATINA	150 \pm 35	124 \pm 18 (P<0.05)

4. EFECTO DE LA PANCREASTATINA SOBRE LA PRODUCCION DE GLUCOSA Y LACTATO EN HEPATOCITOS AISLADOS. COMPARACION CON GLUCAGON Y VASOPRESINA

4.1. ESTIMULACION HORMONAL DE LA PRODUCCION DE GLUCOSA RESPECTO AL TIEMPO

Como se demuestra en la figura 22, la pancreastatina a una concentración de 10^{-7} M produjo un incremento en la liberación de glucosa ($p < 0.05$) comparado con el grupo control a los 10 min, y este efecto persistió en el siguiente punto, a los 20 min. La vasopresina (10^{-7} M) produjo una estimulación mayor de la liberación de glucosa ($p < 0.01$) comparado con el grupo control, y el glucagón con la misma concentración fue el más eficiente para incrementar la producción de glucosa ($p < 0.0001$). El incremento en la producción de glucosa causado por el glucagón y la vasopresina también se mantuvo en ambos puntos determinados (10 y 20 min).

En la figura 23 también se muestra el efecto del fragmento 33-49 de la pancreastatina sobre la producción de glucosa por los hepatocitos, que fue ligera pero significativamente mayor que el producido por el péptido entero.

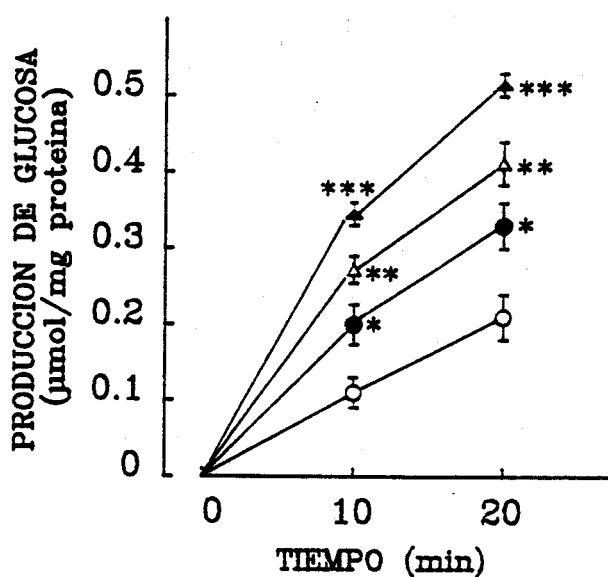


Fig. 22. Estimulación hormonal de la liberación de glucosa por hepatocitos en el tiempo. Tras 2 min de preincubación, el tiempo 0 se añadió medio de incubación (círculos blancos) o una hormona 10^{-7} M: pancreastatina (círculos negros), vasopresina (triángulos blancos) o glucagón (triángulos negros). Los asteriscos representan la significancia estadística de las diferencias entre las medias de los valores control y los experimentos con hormonas para cada tiempo. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

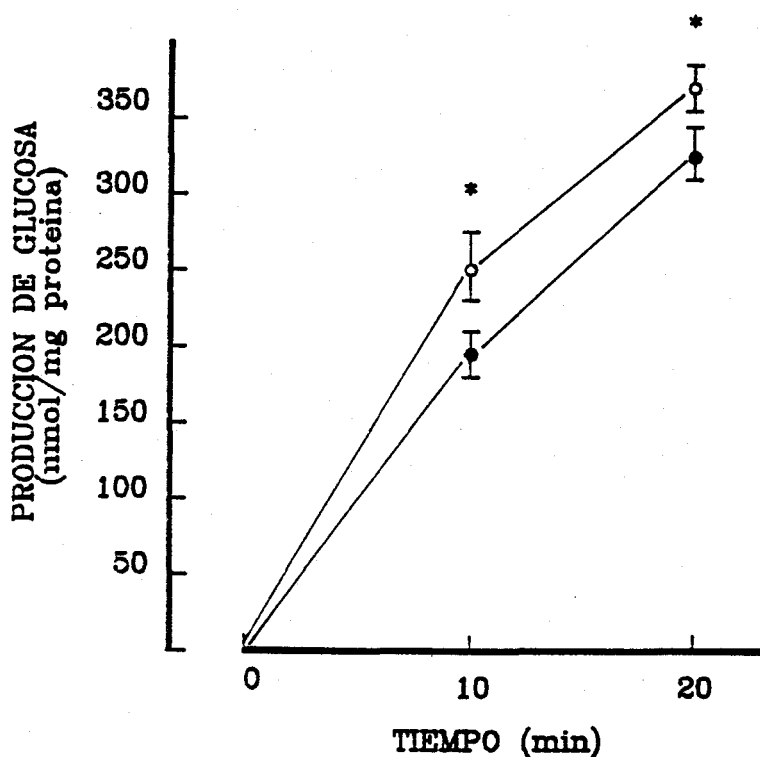


Fig. 23. Comparación de la estimulación de la liberación de glucosa producida por la pancreastatina 10^{-7} M (círculos negros) y su fragmento 33-49 C-terminal (círculos blancos). Los resultados son la media \pm ESM de cuatro experimentos de distintas preparaciones de hepatocitos. * $p < 0.05$.

4.2. DOSIS-RESPUESTA DE LA ESTIMULACION HORMONAL DE LA PRODUCCION DE GLUCOSA

Se midió la liberación de glucosa producida por diferentes concentraciones hormonales como el incremento sobre el valor control de producción de glucosa de cada preparación. Como se muestra en la figura 24, la pancreastatina estimuló la glucogenolisis de forma dosis dependiente. La concentración de pancreastatina que produjo la mitad del efecto máximo fue aproximadamente 1 nM, y la del glucagón y la vasopresina alrededor de 0.3 nM (fig. 24). La liberación de glucosa producida por vasopresina y glucagón fue más significativa ($p < 0.005$ y $p < 0.001$ respectivamente), que la ocasionada por la pancreastatina.

El fragmento 33-49 de pancreastatina incrementó la liberación de glucosa en mayor medida que el péptido entero, siendo las diferencias significativas ($p < 0.05$).

4.3 DOSIS-RESPUESTA DE LA INHIBICION HORMONAL DE LA PRODUCCION DE LACTATO

Como era de esperar, el glucagón disminuyó la producción de lactato de forma dependiente de la dosis (fig. 25). La concentración que produjo la mitad del efecto máximo fue aproximadamente de 0.6 nM. Sin embargo, la vasopresina y la pancreastatina no inhibieron la producción de lactato comparado con los controles.

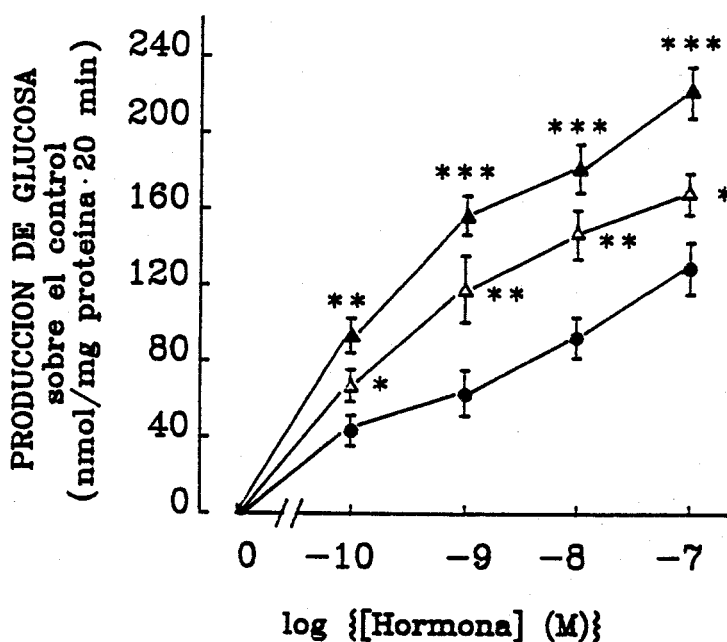


Fig. 24. Dependencia de concentración de la estimulación hormonal de la liberación de glucosa. Los hepatocitos se incubaron con diferentes concentraciones de pancreastatina (círculos negros), vasopresina (triángulos blancos) o glucagón (triángulos negros). La producción de glucosa se expresa como el incremento sobre el valor control para cada preparación. Los asteriscos son la significancia estadística de las diferencias con los valores medios de los experimentos con pancreastatina (n=4). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

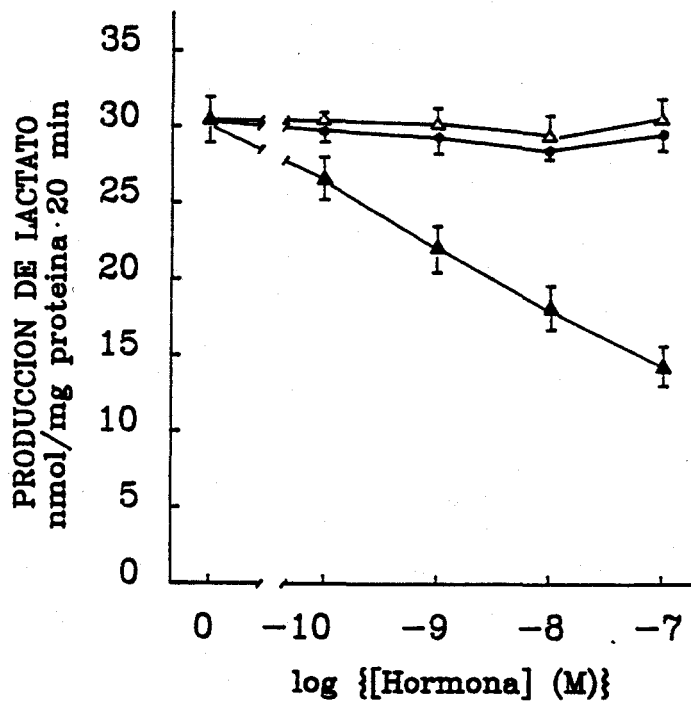


Fig. 25. Dependencia de concentración de la inhibición hormonal de la producción de lactato. Los hepatocitos se incubaron con diferentes concentraciones de pancreastatina (círculos negros), vasopresina (triángulos blancos) o glucagón (triángulos negros). La producción de lactato se expresa como la diferencia entre el contenido inicial y final de lactato en la suspensión de hepatocitos. Los valores son las medias \pm ESM de cuatro experimentos.

4.4. DEPENDENCIA DE Ca^{2+} DEL EFECTO HORMONAL SOBRE LA LIBERACION DE GLUCOSA

El incremento de la producción de glucosa causado por la vasopresina es dependiente del calcio extracelular, mientras que el incremento en la producción de glucosa mediado por el glucagón es independiente del calcio extracelular (Williamson et al 1981; Exton 1988).

Como se muestra en la tabla V, la posible dependencia del Ca^{2+} extracelular en el efecto glucogenolítico de la pancreastatina se investigó en comparación con las otras dos hormonas. Al igual que la vasopresina y al contrario que el glucagón, la pancreastatina no estimuló la producción de glucosa cuando la concentración de calcio extracelular fue drásticamente descendida, omitiendo CaCl_2 del medio de incubación y añadiendo 2 mM de EGTA.

Tabla V. Efecto hormonal sobre la liberación de glucosa por hepatocitos en presencia de calcio o EGTA (nmol de glucosa/mg de proteína x 20 min). La concentración final de hormona fue de 10^{-7} . La liberación de glucosa se expresa como la diferencia entre la concentración inicial y final (tras 20 min de incubación) de glucosa en la suspensión de hepatocitos. Los valores son las medias \pm ESM de cuatro experimentos, cada uno de diferentes preparaciones celulares. ^aP < 0.05 comparado con el grupo control incubado con Ca^{2+} . ^bP < 0.05 comparado con la muestra de igual contenido hormonal.

	<u>Control</u>	<u>Pancreastatina</u>	<u>Glucagón</u>	<u>Vasopresina</u>
Ca^{2+} 2 mM	225 \pm 20	340 \pm 26 ^a	530 \pm 30 ^a	405 \pm 28 ^a
EGTA 2 mM	175 \pm 16	180 \pm 23 ^b	520 \pm 30 ^a	190 \pm 30 ^b

4.5. DISCUSION

Hemos estudiado el efecto hormonal sobre la glucogenolisis en hepatocitos aislados, medida como producción de glucosa y sobre la glucolisis, mediante la determinación de la producción de lactato.

En el estado postabsortivo, el glucagón estimula la producción de glucosa incrementando tanto la glucogenolisis (Cherrington et al 1976), como la gluconeogénesis (Exton 1972), así como inhibiendo la glucolisis (Larner et al 1978). In vivo, se sabe que en el estado postabsortivo, la producción de glucosa es principalmente (70-80%) a partir de la glucogenolisis hepática, con una contribución menor (20-25%) de la gluconeogénesis (Dietze et al 1976). El hecho de que hayamos incubado los hepatocitos con una concentración basal de glucosa (1.5 mM) y sin precursores gluconeogénicos supone un mayor porcentaje de la producción de glucosa en favor de la glucogenolisis. En nuestros experimentos, los hepatocitos se obtuvieron de ratas alimentadas, y mediante la perfusión con glucosa 20 mM, para evitar la depleción de glucógeno. La pancreastatina produjo un incremento en la glucogenolisis sin modificar la producción de lactato.

Nuestros resultados muestran por vez primera, un efecto hormonal de la pancreastatina sobre un tejido lejos del órgano endocrino que la produce. Hemos visto que la concentración de pancreastatina que produce la mitad del efecto máximo glucogenolítico era aproximadamente 1 nM. En el cerdo (Bretherton-Watt et al 1988) se ha demostrado que la pancreastatina plasmática se incrementa tras una comida mixta que contenga carbohidratos, proteínas y grasas, alcanzando una concentración en sangre periférica de 0.15 nM. Así pues, en sangre portal, la pancreastatina podría

alcanzar una concentración suficientemente elevada para ejercer su acción en el hígado. En el hombre, se ha demostrado que los niveles plasmáticos de pancreastatina se incrementan tras la infusión intrayeyunal de una comida líquida que contenga proteínas, carbohidratos y grasas (Funakoshi et al 1990), pero no con una sobrecarga de glucosa; postulando así que serían las proteínas o las grasas, las responsables de la liberación de pancreastatina. En el hombre se ha demostrado la presencia de pancreastatina en las células A y D del islote pancreático (Schmidt et al 1988). Es posible que la pancreastatina tuviera un papel fisiológico parecido y complementario al glucagón, el cual, además de actuar en el estado postabsortivo, prevendría, en el estado postprandrial, de la hipoglucemia que produciría el incremento de insulina plasmática tras una comida rica en proteínas y pobre en carbohidratos.

En este trabajo, hemos comparado el efecto glucogenolítico de la pancreastatina con el producido por el glucagón y la vasopresina. La pancreastatina (10^{-7} mM) estimuló la glucogenolisis aproximadamente un 55% del estímulo producido por el glucagón, y alrededor del 75% del producido por la vasopresina, usando concentraciones equimolares. Como observamos en los trabajos in vivo, el fragmento 33-49 de pancreastatina resulta ser algo más eficaz estimulando la glucogenolisis que el péptido de 49 aminoácidos.

Una forma indirecta de buscar el posible mecanismo de acción de una hormona, es comprobar la dependencia del Ca^{2+} en su efecto sobre la célula diana. La pancreastatina resultó ser inefectiva en ausencia de Ca^{2+} extracelular, y con las

reservas intracelulares de Ca^{2+} intracelular deplecionadas por la preincubación con EGTA, de la misma forma que ocurrió con la vasopresina.

La pancreastatina comparte con la vasopresina la estructura C-terminal -Arg-Gly-NH₂, y el fragmento C-terminal de la pancreastatina tiene una potencia más próxima a la de la vasopresina que el péptido completo. Si la pancreastatina ejerce su acción en el hepatocito a través de un receptor propio o mediante reactividad cruzada con el receptor de la vasopresina es un dilema que permanece sin dilucidar por la dificultad de marcaje de un péptido sin restos de tirosina. Aunque su coste es alto, ya se ha comercializado una pancreastatina tirosinada, por lo que es posible que comiencen a aparecer trabajos de binding (específicos o no) de la pancreastatina, que hasta la fecha se desconocen.

De todas formas decidimos investigar directamente el posible mecanismo de acción utilizado por la pancreastatina, estudiando los dos sistemas principales de transducción de señales glucogenolíticas en el hígado, la actividad de adenilato ciclasa y el recambio de fosfolípidos, mediante la determinación de AMPc y la actividad de proteína quinasa C respectivamente.

5. ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCION DE LA PANCREASTATINA EN HEPATOCITOS

5.1. EFECTO DE LA PANCREASTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD ADENILATO CICLASA

5.1.1. Actividad adenilato ciclasa de membranas hepáticas

La pancreastatina y su fragmento 33-49 C-terminal (10^{-7} M) no incrementaron la producción de AMPc en membranas de hígado de rata comparado con el control. Tampoco modificaron el AMPc producido por la incubación con GTP (Tabla VI).

El glucagón (10^{-7} M) en cambio, aumentó los niveles de producción de AMPc 5 veces comparado con el control. Además potenció la estimulación de la producción de AMPc producida por GTP, alcanzando los 160 pmol/mg de proteína.min, un valor mayor que la suma de la producción de AMPc estimulada por separado por glucagón y GTP.

El FNa, un estimulador de adenilato ciclasa no mediado por receptor, incrementó 7 veces la actividad basal de la adenilato ciclasa.

5.1.2. Actividad adenilato ciclasa de hepatocitos aislados

El glucagón, como se esperaba, incrementó la producción de AMPc en los hepatocitos, y lo hizo de forma dependiente de la dosis. La concentración que indujo la mitad de la concentración máxima de AMPc fue de 2 nM.

Tabla VI. Producción de AMPc por las membranas hepáticas incubadas con diferentes efectores, expresado en pmol de AMPc producidos por mg de proteína y min de incubación. Los resultados son las medias \pm ESM de cuatro experimentos.

CONTROLES -----	21 \pm 5
NaF (10 mM) -----	140 \pm 11
GTP (10⁻⁵) -----	42 \pm 7
Pancreastatina 1-49 (10⁻⁷) -----	27 \pm 6
Pancreastatina 1-49 (10⁻⁷) + GTP (10⁻⁵) -----	49 \pm 8
Pancreastatina 33-49 (10⁻⁷) -----	21 \pm 7
Pancreastatina 33-49 (10⁻⁷) + GTP (10⁻⁵) -----	42 \pm 6
Glucagón (10⁻⁷) -----	100 \pm 10
Glucagón (10⁻⁷) + GTP (10⁻⁵) -----	160 \pm 12

La pancreastatina, no modificó, como se muestra en la figura 26, la producción de AMPc cuando se añade al medio de incubación. Lo mismo ocurrió al añadir vasopresina. El margen de concentración utilizado fue de 10^{-10} M a 10^{-7} M.

La incubación de los hepatocitos con pancreastatina o vasopresina, conjuntamente con el glucagón, no modificó la estimulación de AMPc producida por este último.

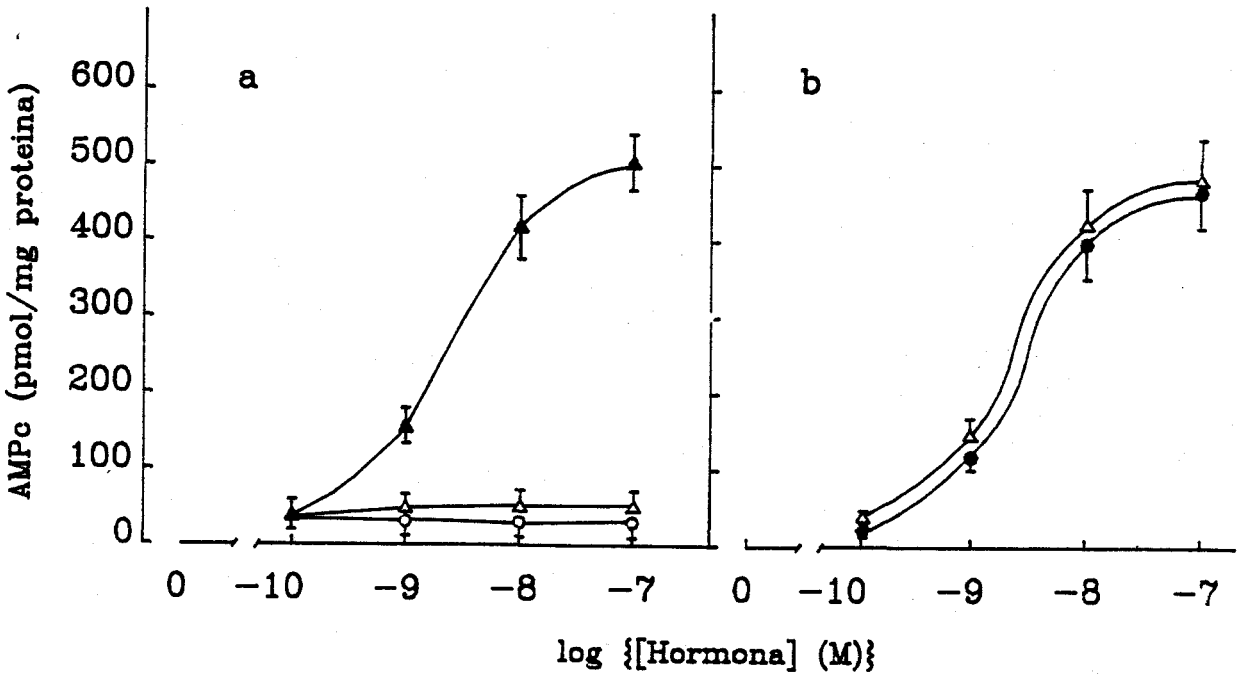


Fig. 26. Efecto hormonal sobre la producción de AMPc en hepatocitos.

a. Dependencia de concentración del efecto hormonal sobre los niveles hepatocitarios de AMPc. Pancreastatina (círculos blancos), vasopresina (triángulos blancos), glucagón (triángulos negros).

b. Efecto de la combinación del glucagón con la pancreastatina (círculos negros) y con la vasopresina (triángulos blancos) sobre los niveles de AMPc de hepatocitos.

Los valores representados son las medias \pm ESM.

5.2. EFECTO DE LA PANCREASTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE PROTEINA QUINASA C

Como se muestra en la figura (27), la actividad PKC de la fracción cruda citosólica de hepatocitos era dependiente del tiempo, alcanzando el valor máximo a los 15 min, y continuaba sin modificarse hasta los 30 min. La actividad PKC también se demostró que era dependiente de la presencia en la mezcla de incubación de dioleina y fosfatidil-serina (fig. 28).

Como se muestra en la figura 29, la pancreastatina (33-49) produjo un incremento en la actividad de proteína quinasa C de unas 15 veces el valor control, pero todavía se quedó en aproximadamente el 50% del incremento producido por la vasopresina, una hormona conocida por su actuación a través de la activación de fosfolipasa C.

La activación de PKC por la pancreastatina (33-49) fue dependiente de la dosis (fig. 30) alcanzando el máximo efecto a la concentración de 10^{-8} M.

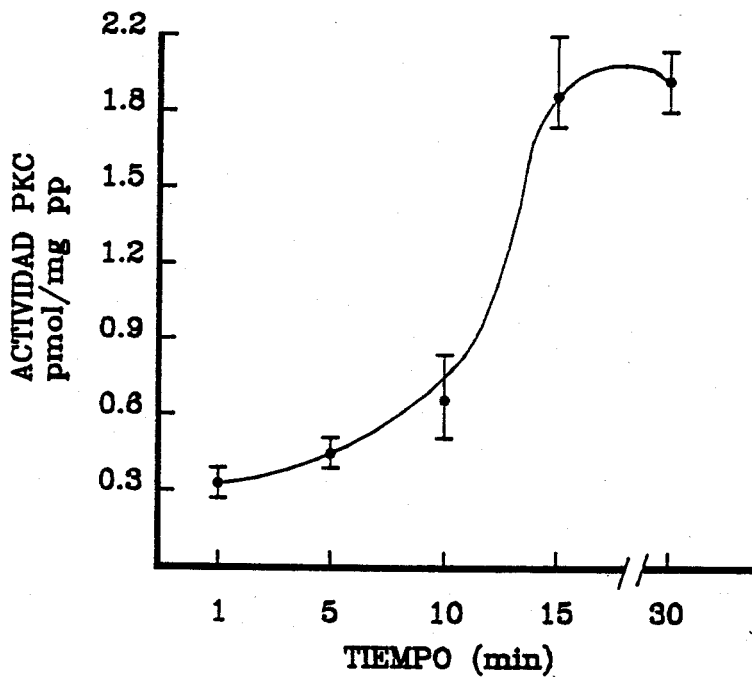


Fig. 27. Dependencia del tiempo de la actividad de proteina quinasa C.

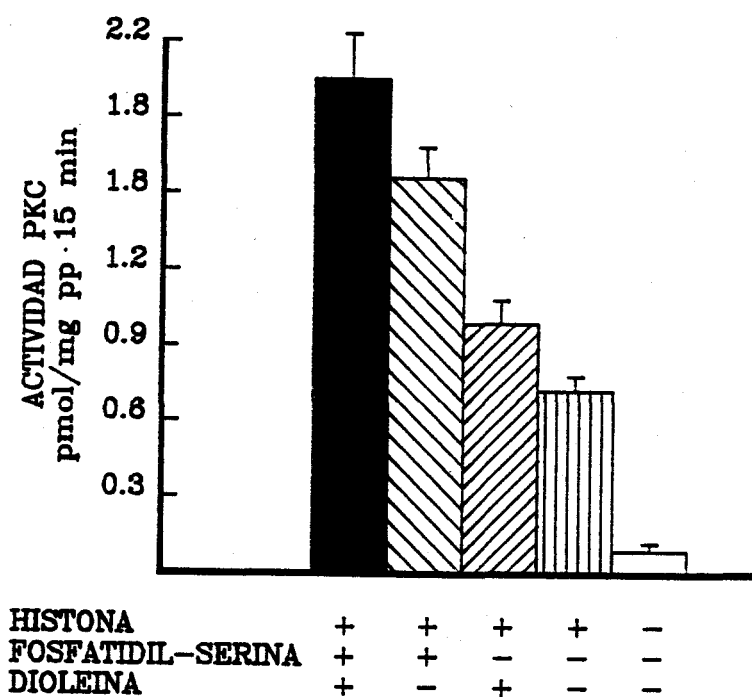


Fig. 28. Dependencia de la histona rica en lisina, fosfatidil-serina y dioleina en la actividad proteina kinasa C de hepatocitos.

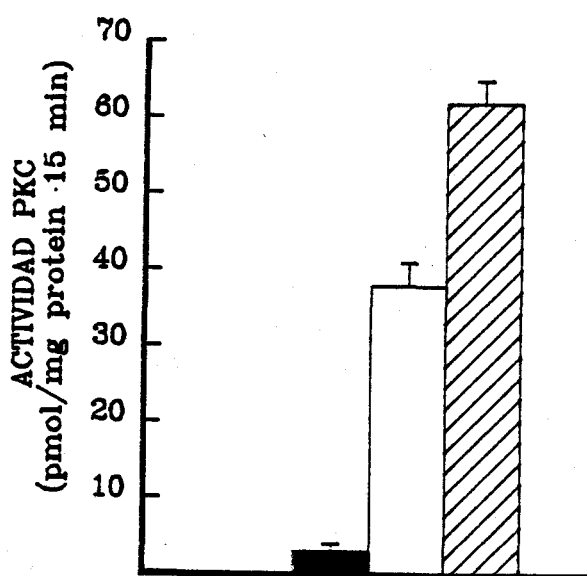


Fig. 29. Efecto de la pancreastatina 33-49 (barra blanca) y la vasopresina (barra rayada) sobre la actividad de proteína quinasa C, comparado con el control (barra negra). Los valores son las medias \pm ESM de cuatro experimentos.

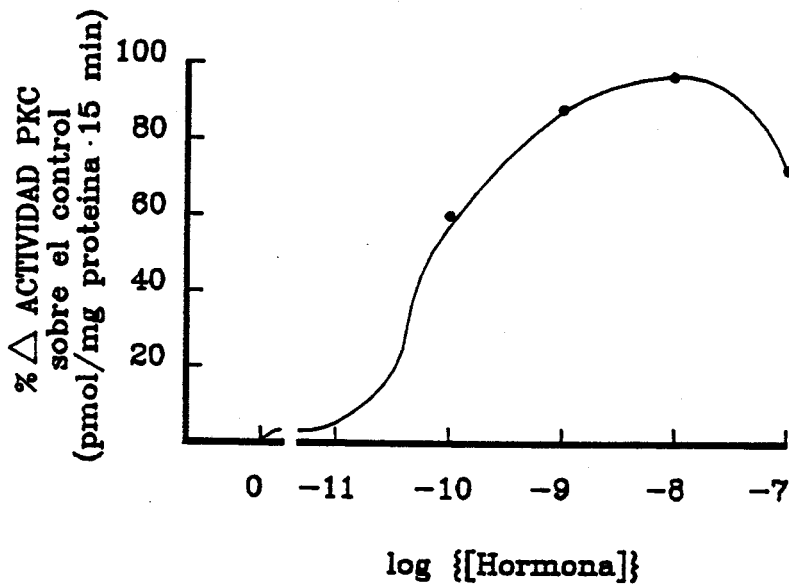


Fig. 30. Dependencia de concentración de pancreastatina 33-49 en la activación de la proteína quinasa C. Se muestra un experimento representativo de un total de tres realizados. Los resultados se expresan como el incremento de la actividad de PKC sobre el valor control.

5.3. DISCUSION

Estos resultados confirman a los anteriores en el sentido de que la pancreastatina actuaría sobre los hepatocitos mediante un mecanismo parecido al de la vasopresina (Stubs et al 1976), que según comprobamos en la incubación con hepatocitos era dependiente de Ca^{2+} . Ahora in vitro, se demuestra la acción efectora sobre la actividad PKC que es complementaria del incremento de Ca^{2+} intracelular, ya que se activa por el diacilglicerol. Como es sabido, el diacilglicerol es uno de los productos de la hidrólisis de fosfolípidos de membrana por fosfolipasa C (PIP_2), el otro producto (IP_3) incrementa el Ca^{2+} citosólico por, contribuyendo así también a la activación de la PKC.

Así mismo, hemos demostrado cómo la pancreastatina, al igual que la vasopresina (Kirk y Hems 1974) no influye en la actividad adenilato ciclasa del hepatocito, no modificando la producción basal de AMPc, ni la estimulada por glucagón.

IV. EPILOGO

En este trabajo hemos descrito por vez primera el efecto glucogenolítico de la pancreastatina. Lo evidenciamos en primer lugar en la rata in vivo. Cuando empezamos a trabajar con la pancreastatina, no se conocía su vida media, ni el lugar de degradación o excreción. Hoy sabemos que tanto el riñón como el hígado juegan un papel en la metabolización del péptido (Tateishi et al 1990), sin embargo aún se desconoce su vida media. Empleamos por ello una dosis lo suficientemente alta como para que alcanzara una concentración inicial sanguínea de 5-10 nM, que fue la dosis utilizada en los trabajos in vitro sobre el páncreas endocrino. Sin embargo, el hecho de desconocer su vida media, hace difícil la comparación de su actividad biológica in vivo con otros péptidos de vida media conocida, aunque hayamos utilizado dosis equimolares. Pero sobre todo, la dificultad de interpretación de los trabajos in vivo estriba en las relaciones interhormonales. Así, el hecho de que el glucagón o el VIP incrementen la secreción de insulina, es un dato a tener en cuenta si se quiere comparar con la pancreastatina, que es un péptido inhibidor de la secreción estimulada de insulina. Por ello, hay que tener cautela a la hora de concluir en el efecto glucogenolítico observado in vivo por la pancreastatina. Aunque hayamos observado un efecto comparable o incluso mayor al del VIP o el glucagón, no debemos olvidar que in vivo, el factor más importante de regulación del glucógeno es el par insulina-glucagón. De hecho, aunque no lo hemos mostrado en los resultados, la acción glucogenolítica de la pancreastatina in vivo, no se observaba en el período postprandial, cuando los niveles circulantes de insulina se encuentran elevados; por lo que el papel fisiológico de la pancreastatina secretada por el gránulo

beta mantendría un papel secundario, como de hecho lo tiene en la modulación autocrina de la secreción de insulina.

Pero la pancreastatina no se encuentra sólo en los gránulos beta. Como hemos visto anteriormente, es un péptido que parece distribuirse por todo el sistema neuroendocrino, aunque sea en forma de su precursor, la cromogranina A. La aportación del sistema cromafín en los niveles circulantes de pancreastatina, podría ser suficiente para producir este efecto glucogenolítico sinérgico al producido por las catecolaminas.

Hemos podido constatar también la mayor actividad biológica del péptido de 17 aminoácidos, correspondientes al extremo C-terminal de la pancreastatina (del 33 al 49), como ya se había descrito para su acción sobre el páncreas endocrino. Nuestros resultados apoyan la idea de una hormona de 17 aminoácidos, con un proceso de síntesis que se iniciaría en la formación decromogranina A como prehormona, y que tendría como paso intermedio, la pancreastatina de 49 aminoácidos.

Los trabajos in vitro confirmaron el papel glucogenolítico de la pancreastatina. El hecho de que la pancreastatina fuera activa a una concentración del orden nanomolar, está a favor de un papel fisiológico de esta nueva hormona sobre el hígado.

También pudimos comprobar in vitro la mayor actividad biológica del fragmento 33-49 C-terminal de pancreastatina.

Los estudios sobre el mecanismo de acción de la pancreastatina sobre el hepatocito han dado como resultado el encuadre de la pancreastatina dentro del grupo de hormonas cuya acción está mediada por el Ca^{2+} y la proteína quinasa C,

por lo que es de esperar que la pancreastatina active la fosfolipasa C de la membrana plasmática, que sería la responsable del incremento de los dos mediadores, el Ca^{2+} por el IP_3 , y la PKC por el diacil-glicerol.

Así pues, la pancreastatina parece actuar sobre el hígado del mismo modo que la vasopresina, con la cual hicimos los estudios comparativos in vitro, alcanzando la pancreastatina un 70-80% de la actividad de la vasopresina. Sin embargo, queda por resolver si la acción de la pancreastatina está vehiculada por su interacción con receptores V_1 de vasopresina, con la que comparte los dos últimos aminoácidos del extremo C-terminal, que si bien no es mucho, es donde radica la actividad biológica de ambas hormonas. Ya hemos comentado el problema del marcaje radiactivo de la pancreastatina, por no tener restos de tirosina. Hasta la fecha, no ha aparecido ningún trabajo describiendo la caracterización de un receptor para pancreastatina. El coste elevado de la pancreastatina tirosilada puede ser una causa, aunque quizá la manipulación de su estructura modifique su configuración y/o su capacidad de unión al receptor putativo de la pancreastatina. Lo que está claro es que si la pancreastatina juega un papel en la homeostasis de la glucosa, es a través de un receptor, tanto en la célula beta como en el hepatocito.

La glucosa constituye la moneda de transacción energética intercelular por excelencia. Por esta razón, existe una extraordinaria estabilidad de la glucemia aún en las condiciones más extremas, tales como el ayuno o el ejercicio. Para mantener constante la concentración de glucosa en sangre, los seres superiores disponen de mecanismos extremadamente sofisticados. Entre éstos destaca el sistema hormonal del islote de Langerhans. La simpleza del par insulina-glucagón a dejado paso a un

complejo sistema multiendocrino cuya complejidad se justifica por la importancia del mantenimiento de los niveles de glucemia.

El caso más claro de desajuste de este sistema es la diabetes mellitus no insulín dependiente, que además es el de mayor prevalencia. Se conocen bien, aunque no del todo, las consecuencias nefastas de una hiperglucemia mantenida, no sólo en el sistema cardiovascular, sino en la misma célula beta (Unger y Grundy 1985).

Hace relativamente poco tiempo apareció en la escena de la DMNID un nuevo péptido que como la pancreastatina es sintetizado en el gránulo beta (Lukinius et al 1989), se trata de la amilina (Westermarck 1989). Hoy en día es el marcador anatomo-químico más consistente de la DMNID. En el año 1988 se describió por vez primera el efecto insulín-resistente in vitro de dos péptidos de la misma familia, la amilina y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (Leighton y Cooper). Poco después se describía este efecto in vivo (Sowa et al 1990).

Nuestro trabajo ha contribuido en la inclusión de la pancreastatina en la escena de la DMNID y los problemas de insulín resistencia, al encontrar en este péptido un posible papel contrarregulador de la insulina, tanto en su secreción como en su acción a nivel hepático.

El papel fisiológico de la pancreastatina, discutido en nuestros resultados, permanece aún por esclarecerse, pero ya ha aparecido un trabajo en el que se describen niveles elevados de pancreastatina en la DMNID tras una sobrecarga intravenosa de glucosa (Funakoshi et al 1990). En este trabajo, los pacientes que tenían elevada la pancreastatina plasmática estaban tomando sulfonil-ureas, con lo que las conclusiones son más difíciles de obtener. Sin embargo, la pancreastatina

tendrá sin duda mucho que decir en el amplio síndrome llamado diabetes mellitus no insulín-dependiente.

Hay otro síndrome, llamado X o de Reaven, que incluye la presencia de hiperinsulinemia e hipertensión esencial, que hace también posible la inclusión de la pancreastatina como un elemento a estudiar en este tipo de alteraciones en la secreción de insulina.

Como hemos visto, la pancreastatina es un modulador tanto de la secreción de insulina como de catecolaminas, que son las hormonas patológicamente elevadas en este grupo de pacientes hipertensos. Teniendo en cuenta que la pancreastatina podría tener un papel en la resistencia a la insulina, se abren dos nuevos campos de investigación de este nuevo péptido. Por un lado, el estudio in vitro de la posible resistencia a la insulina ocasionada por la pancreastatina. Y por otro el estudio del sistema insulina-catecolaminas-pancreastatina en los pacientes con este nuevo síndrome tan frecuente hoy día. Sin duda alguna, la pancreastatina será una hormona que haya que estudiar para comprender mejor estos dos grandes síndromes que tienen como denominador común las alteraciones en la secreción de insulina, como son la diabetes mellitus no insulín dependiente y el síndrome X o de hiperinsulinismo-hipertensión.

V. CONCLUSIONES

PRIMERA

La pancreastatina tiene un efecto hiperglucémico observado en el estado postabsortivo, es decir cuando los niveles de glucógeno hepático son máximos y los niveles de insulina circulantes están descendidos.

SEGUNDA

En el estudio del posible origen hormonal del efecto hiperglucémico hemos mostrado:

a) La pancreastatina no modifica "in vivo" los niveles basales de insulina y glucagón, aunque sí inhibió la secreción de insulina estimulada por glucagón.

b) "In vitro", la pancreastatina es un débil inhibidor de la secreción de insulina estimulada por glucosa.

c) La pancreastatina disminuye los niveles circulantes de catecolaminas.

TERCERA

La pancreastatina produce en la rata "in vivo" un descenso en el contenido hepático de glucógeno.

CUARTA

La pancreastatina provoca, *in vitro*, un incremento en la producción de glucosa en hepatocitos aislados de ratas alimentadas. La concentración que produce la mitad del efecto máximo es de 1 nM. El efecto máximo fue aproximadamente el 50 % del producido por el glucagón y el 70 % del producido por la vasopresina. Sin embargo, la pancreastatina no produjo ninguna alteración en la producción de lactato por los hepatocitos.

QUINTA

En cuanto al mecanismo de acción de la pancreastatina sobre el hepatocito, no parece actuar activando la adenilato ciclasa, ni elevando los niveles de AMPc por cualquier otro medio. Tampoco modifica la activación de adenilato ciclasa producida por el glucagón.

SEXTA

La acción de la pancreastatina parece estar mediada por la activación de la fosfolipasa C de membrana, ya que el Ca^{2+} es imprescindible para su acción sobre el hepatocito, y la pancreastatina activa a la proteína quinasa C. Esta activación es aproximadamente de un 50 % de la producida por la vasopresina.

SEPTIMA

El fragmento de 17 aminoácidos (del 33 al 49) del extremo C-terminal de la pancreastatina presenta una mayor actividad biológica que el péptido de 49 aminoácidos, tanto "in vivo", como "in vitro".

OCTAVA

A partir de los resultados presentados, es posible incluir a la pancreastatina como una nueva hormona glucogenolítica, cuyo mecanismo molecular parece estar mediado por el recambio de inosítoles de membrana, incrementando el calcio citosólico y activando a la proteína quinasa C.

VI. BIBLIOGRAFIA

AHN T.G., COHN D.V., GORR S.U., ORNSTEIN O.L., KASHDAN M.A. y LEVINE M.A. (1987)

Primary structure of bovine pituitary secretory protein I (chromogranin A) deduced from the cDNA sequence.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5043-5047

AHREN B., LINDSKOG S., TATEMOTO K. y EFENDIC S. (1988)

Pancreastatin inhibits insulin secretion and stimulates glucagon secretion in mice.

Diabetes 37:281-285

AHREN B., RORSMAN P. y BERGGREN P-O (1988)

Galanin and endocrine pancreas

FEBS Lett. 229:233-237

ALTSZULER N. et al. (1968)

Influence of growth hormone on glucose metabolism and plasma insulin levels in the dog.

En Pecile A., Muller E. (ed.): Growth Hormone, Proceedings of the First International Symposium. Amsterdam, Excerpt. Medica, pp. 309-318.

AMENTA F., CAVALLOTTI C., De ROSSI M., et al (1983)

The cholinergic innervation of the human pancreatic islets.

Acta Histochem. 73:273-278

ARILLA E., PRIETO J.C., LOPEZ J.M. y GOBERNA R. (1981)

Somatostatin action on insulin secretion induced by chicken and porcine vasoactive intestinal peptide in the perfused rat pancreas.

Horm. Metab. Res.

ARPS H., DIETEL M., LAURITZEN B., ELTING J.J., NIENDORF A. y COHN D.V. (1987)

Co-localization of parathyroid hormone and secretory protein-I in bovine parathyroid glands: a double immunocytochemical study at the electron microscopical level.

Bone mineral 2:175-183

BALASSE E. y HAVEL R. (1971)

Evidence for an effect of insulin on the ketone bodies in dogs.

J. Clin. Invest. 50:801-813

BAUER F.E., ADRIAN M.D., CHRISTOFIDES T.E., FERRI G.L., YANAIHARA N. y POLAK J.M. (1986)

Distribution and molecular heterogeneity of galanin in human, pig, guinea pig and rat gastrointestinal tracts.

Gastroenterology 91:877

BENEDUM U.M., BAUERLE P.A., KONECKI D.S., FRANK R., POWELL J., MALLET J. y HUTTNER W.B. (1986)

The primary structure of bovine chromogranin A: a representative of a class of acidic secretory proteins common to a variety of peptidergic cells.

EMBO J. 5:1495-1502

BERNIER M., LAIRD D.M. y LANE M.D. (1987)

Insulin-activated tyrosine phosphorylation of a 15-kilodalton protein in intact 3T3-L1 adipocytes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:1844-1848

BEREITER D.A., ROHNER-JEANRENAUD F., BERTHOUD H.R. y JEANRENAUD B. (1981)

CNS modulation of pancreatic endocrine function.

Diabetologia 20:417-425

BERRY M.N. y FRIEND D.S. (1969)

High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells.

J. Cell. Biol. 43:506-520.

BIRD L.J., WRIGHT E.E. y FELDMAN M. (1980)

Pancreatic islets. A tissue rich in serotonin.

Diabetes 29:304-308

BISHOP A.E., POLAK J.M., GREEN I.C., et al (1980)

The location of VIP in the pancreas of man and rat.

Diabetologia 18:73-78

BLACKMORE P.F. y EXTON J.H. (1985)

Mechanisms involved in the actions of calcium-dependent hormones.

En Litwak G (ed.): Biochemical Actions of hormones. Vol.12. New York, Academic Press, pp 215-235

BLACKSHEAR P.J., NEMENOFF R.A. y AVRUCH J. (1983)

Insulin binds to and promotes the phosphorylation of a M_r 210.000 component of its receptor in detergent extracts of rat liver microsomes.

FEBS Lett. 158:243-246

BOCCKINO S.B., BLACKMORE P.F. y EXTON J.H. (1985)

BRETHERTON-WATT D., GHATEI M.A., BISHOP A.E., FACER P., FAHEY M., HEDGES M., WILLIAMS G., VALENTINO K.L., TATEMOTO K., ROTH K., POLAK J.M. y BLOOM S.R. (1988)

Pancreastatin distribution and plasma levels in the pig.

Peptides 9:1005-1014

BOLLAG G.E., ROTH R.A., BEAUDOIN J., MOCHLY-ROSEN D., KOSHLAND D.E.Jr. (1986)

Protein kinase C directly phosphorylates the insulin receptor in vitro and reduces its protein-tyrosine kinase activity.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5822-5824

BRADFORD 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

CAHILL G.E. Jr y OWEN O.E. (1968)

Some observations on carbohydrate metabolism in man.

In Dickens F., Randle P.J., Whelan W.J. (ed): Carbohydrate Metabolism and its Disorders. Vol. 1. London, Academic Press, p. 497

CAMPFIELD L.A. y SMITH F.J. (1983)

Neural control of insulin secretion. Interaction of norepinephrine and acetyl-choline.

Regul. Integrative Comp. Physiol. 13:629-634

CARLSTEN A., et al (1965)

Amino acids and free fatty acids in plasma in diabetics. I. The effect of insulin on the arterial levels.

Acta Med. Scand. 179:361-370

CARO J.F., ITTOOP O., PORIES W.J., MEELHEIM D., FLICKINGER E.G., et al (1986)

Studies on the mechanism of insulin resistance in the liver from humans with non-insulin-dependent diabetes.

J. Clin. Invest. 78:249-258

CLARK A. y GRANT A.M. (1983)

Quantitative morphology of endocrine cells in human fetal pancreas.

Diabetologia 25:31

COHN D.V., ZANGERLE R., FISHER-COLBRIE R. y CHU L.L.H. (1982)

Similarity of secretory protein-I from parathyroid gland to chromogranin A from the adrenal medulla.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6056-6059

COHN D.V., ELTING J.J., FRICK M. y ELDE R. (1974)

Selective localization of the parathyroid secretory protein-I/adrenal medulla chromogranin A protein family in a wide variety of endocrine cells of the rat.

Endocrinology 114:1963-1974

COMI R.J., GRUNBERGER G. y GORDEN P. (1987)

Relationship of insulin binding and insulin-stimulated tyrosine kinase activity is altered in type II diabetes.

J. Clin. Invest. 79:453-462

CRAPO P.A., REAVEN G. y OLEFSKY J. (1977)

Postprandial plasma glucose and insulin responses to different complex carbohydrates.

Diabetes 26:1178-1183

CRAPO P.A., REAVEN G. y OLEFSKY J. (1976)

Plasma glucose and insulin responses to orally administered simple and complex carbohydrates.

Diabetes 25:741-747

CREUTZFELDT W. (1979)

The incretin concept today.

Diabetologia 16:75-85

CZECH M.P. y MASSAGUE J. (1982)

Subunit structure and dynamics of the insulin receptor.

Fed. Proc. 41:2719-2723

CZECH M.P., KLARLUND J.K., YAGALOFF K.A., BRADFORD A.P. y LEWIS R.E. (1988)

Insulin receptor signalling: Activation of multiple serine kinases.

J. Biol. Chem. 263:11017-11020

CHERRINGTON A., et al (1976)

The role of insulin and glucagon in the regulation of basal glucose production in the postabsorptive dose.

J. Clin. Invest. 58:1407-1418

CHIASSON J.L. et al (1976)

Differential sensitivity of glycogenolysis and gluconeogenesis in insulin infusions in dogs.

Diabetes 25:283-291

CHIASSON J.L., ATKINSON R.L., CHERRINGTON A.D. et al. (1978)

Effects of fasting on gluconeogenesis from alanine in nondiabetic man.

Diabetes 28:56-60

CHON T., STEINER K. y EXTON H.J. (1979)

Effect of adrenalectomy on hormone action on hepatic glucose metabolism.

J. Biol. Chem. 254:11374-11378

CHOU C.K., DULL T.J. RUSSELL D.S., GHERZI R., LEBWOHL D., et al (1987)
Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack protein tyrosine kinase activity and fail to mediate post-receptor effects of insulin.
J. Biol. Chem. 262:1842-1847

DEFTOS L.J., BJORNSSON B. Th, BURTON D.W., O'CONNOR D.T. y COPP D.H. (1987)
Chromogranin A is present in and released by fish endocrine tissue.
Life Sci. 40:2133-2136

DIETZE G., et al (1976)
On gluconeogenesis of human liver: Accelerated hepatic glucose formation by increased precursor supply.
Diabetologia 12:555-561

DOCKRAY G.J., GREGORY R.A., HUTCHINSON J.B. et al (1978)
Isolation, structure and biological activity of two cholecystinin octapeptides from sheep brain.
Nature 274:711

EBINA Y., ARAKI E., TAIRA M., SHIMADA F., MORI M., et al (1987)
Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of the insulin receptor abolishes insulin- and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:704-708

EFENDIC S., TATEMOTO K., MUTT V., QUAN C., CHANG, y ÖSTENSON C-G (1987)
Pancreastatin and islet hormone release
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7257-7260

EIDEN L.E. (1987)
Is chromogranin a prohormone?
Nature 325:301

ELLIS L., CLAUSER E., MORGAN D.O., EDERY M., ROTH R.A., et al (1986)
Replacement of insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163 compromises insulin-stimulated kinase activity and uptake of 2-deoxyglucose.
Cell 45:721-732

EXTON J.H. y PARK C.R. (1967)
Control of gluconeogenesis in the perfused livers of rats.
J. Biol. Chem. 242:2622-2636

EXTON J.H. (1972)
Gluconeogenesis
Metabolism 21:945-989

EXTON J.H. (1986)
Mechanisms involved in calcium mobilizing agonist responses.
Adv. Cyclic Nucleotide Res. 20:211-262

EXTON J.H. (1988)
Role of phosphoinositides in the regulation of liver function.
Hepatology 8:152-166

FALKMER S., EL-SALHY M. y TITLBACH M. (1984)
Evolution of the neuroendocrine system in vertebrates. A review with particular reference to the phylogeny and postnatal maturation of the islet parenchyma.
En Falkmer S., Hakanson R., Sundler F. (ed): Evolution and Tumour Pathology of the Neuroendocrine System. Fernstrom Foundation Series. Amsterdam, Elsevier, pp 59-88

FASCIOTTO B., GORR S-U, DeFRANCO J., LEVINE M.A. y COHN D.V. (1989)
Pancreastatin, a presumed product of chromogranin-A (secretory protein-I) processing, inhibits secretion from porcine parathyroid cells in culture.
Endocrinology 125:1617-1622

FELIG P. (1973)
The glucose-alanine cycle.
Metabolism 22:179-207

FIELD R. (1966)

Glycogen deposition diseases.

En Stanbury J.B., Wyngaarden J.B., Fredrickson, D.S. (ed): The Metabolic Basis of inherited Disease. New York, McGraw-Hill

FLOOD J.F. y MORLEY J.E. (1988)

Effects of systemic pancreastatin on memory retention.

Peptides 9:1077-1080

FOA P.P., BAJAJ J.S. y FOA N.L. (1977)

Glucagon: Its role in physiology and medicine.

Springer-Verlag, Nueva York

FREIDENBERG G.R., HENRI R.R., KLEIN H.H., REICHART D.R. y OLEFSKY J.M. (1987)

Decreased kinase activity of insulin receptors from adipocytes on non-insulin dependent diabetic subjects.

J. Clin. Invest. 79:240-250

FUGITA T. y KOBAYASHI S. (1981)

The endocrine cell.

En Bloom S.R., Polak J.M. (ed): Gut hormones (ed 2). Edinburgh, Churchill Livingstone, pp 90-95

FUNAKOSHI A. MIYASAKA K., KITANI K. y TATEMOTO K. (1989)

Effect of pancreastatin on pancreatic endocrine function in the conscious rat.

Reg. Pept. 24:225-231

FUNAKOSHI A., MIYASAKA K., NAKAMURA R., KENICHI K., FUNAKOSHI S., TAMAMURA H., FUJII N. y YAJIMA H. (1988)

Bioactivity of synthetic human pancreastatin on exocrine pancreas

Biochem. Biophys. Res. Commun. 156:1237-1242

FUNAKOSHI A., MIYASAKA K., NAKAMURA R., KITANI K. y TATEMOTO K. (1989)

Inhibitory effect of pancreastatin on pancreatic exocrine secretion in the conscious rat.

Reg. Pept. 25:157-166

FUNAKOSHI S., TAMAMURA H., OHTA M., YOSHIZAWA K., FUNAKOSHI A., MIYASAKA K., TATEISHI K., TATEMOTO K., NAKANO I., YAJIMA H. y FUJII N. (1989)

Isolation and characterization of a tumor-derived human pancreastatin-related protein.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 164:141-148

FUNAKOSHI A., TATEISHI K., SHINOZAKI H., MATSUMOTO M. y WAKASUGI H. (1990)

Elevated plasma levels of pancreastatin (PST) in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM).

Reg. Pept. 30:159-164

GERBER J.C. y HARE T.A. (1979)

Gamma-aminobutyric acid on peripheral tissue with emphasis on the endocrine pancreas.

Diabetes 28:1073-1076

GERICH J.R., et al (1981)

The role of counter-regulatory hormones in diabetes mellitus.

En Martin J., Ehrlich R., Holland F. (ed): Etiology and Pathogenesis of Insulin-Dependent Diabetes. New York. Rancer Press.

GOBERNA R. (1968)

Dinámica de la secreción de insulina.

Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia

GOBERNA R., FUSSGANGER R.D., RAPTIS S., TELIB O. y PFEIFFER E.F. (1971)

The role of exocrine pancreas in the stimulation of insulin secretion by intestinal hormones.

Diabetologia 7:68

GOBERNA R. (1978)

¿Cómo se segrega la insulina?

Investigación y Ciencia 3:21-28

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

The determination of glycogen

J. Biol. Chem. 100:485-491

GRODSKY G.M., BATTS 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

GUNION M.W., ROSENTHAL M.J., TATEMOTO K. y MORLEY J.E. (1989)

Intracranial microinfusion of pancreastatin elevates blood glucose, free fatty acids, and corticosterone in rats.

Brain Res. 485:251-257

HAKANSON R. y SUNDLER F. (1983)

The design of the neuroendocrine system: An unifying concept and its consequences.

Trends Pharm. Sci. 4:41-44

HANKS S.K., QUINN A.M. y HUNTER T. (1988)

The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains.

Science 241:42-52

HÄRING H., KIRSCH D., OBERMAIER B., ERMEL B. y MACHICAO F. (1986)

Decreased tyrosine kinase activity of insulin receptor isolated from rat adipocytes rendered insulin-resistant by catecholamine treatment in vitro.

Biochem. J. 234:59-66

HARTSCHUH W. y WEIHE E. (1989)

Pancreastatin-like immunoreactivity in epidermal Merkel cells of pig and man.

Neurosci. Lett. 98:258-263

HAVEL R. y GOLDFEIN A. (1959)

Adrenal and free fatty acid mobilization.

J. Lipid Res. 1:102-110

HAVEL R. (1972)

Caloric homeostasis and disorders of fetal transport.

N. Engl. J. Med. 287:1186-1192

HAYMOND M.W. y MILES J.M. (1981)

Branched chain amino acids as a major source of alanine nitrogen in man.

Diabetes 31:86-89

HAYMOND M.W., BEN-GALIM E. y STROBEL K.E. (1978)

Glucose and alanine metabolism in children with maple syrup urine disease.

J. Clin. Invest. 62:398-405

HEDO J.A., KAHN C.R., HAYASHI M., YAMADA K.M. y KASUGA M. (1983)

Biosynthesis and glycosylation of the insulin receptor.

J. Biol. Chem. 258:10020-10026

HEDO J.A. y SIMPSON I.A. (1984)

Internalization of insulin receptors in the isolated rat adipose cell.

J. Biol. Chem. 259:11083-89.

HELMAN L.J., AHN T.G., LEVINE M.A., ALLISON A., COHEN P.S., COOPER M.J., COHN D.V., ISRAEL M.A. (1988)

Molecular cloning and primary structure of human chromogranin A (secretory protein I) cDNA.

J. Biol. Chem. 263:11559

HEMS D.A. y WHITTON P.D. (1980)

Control of hepatic glycogenolysis.

Physiol. Rev. 60:1-50

HERS H.G. (1976)

The control of glycogen metabolism in the liver.

Annu. Rev. Biochem. 45:167-189

HERS H.G. (1980)

Carbohydrate metabolism and its regulation.

En: Inherited disorders of carbohydrate metabolism. Burman D., Holton J.B. y Pennock C.A. (ed) M.T.P. Press Ltd., Lancaster, U.K., pp. 3-18

HERRERA R. y ROSEN O.M. (1986)

Autophosphorylation of the insulin receptor in vitro.

J. Biol. Chem. 261:11980-11985

HERZBERG V.L., GRIORESCU G., EDGE A.S.B., SPIRO R.G. y KAHN C.R. (1985)

Characterization of insulin receptor carbohydrate by comparison of chemical and enzymatic deglycosylation.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 129:789-796

HOWARD R.B., CHRISTENSEN A.K., GIBBS F.A. y PESCH L.A. (1967)

The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver.

J. Cell. Biol. 35:675-684

HUANG S. et al. (1980)

Non invasive determination of local cerebral metabolic rate of glucose in man.

Am. J. Physiol. 238:69-82

HUE L. (1979)

Short term control of liver carbohydrate metabolism.

Biochem. Soc. Trans. 7:850-854

HUNTER T. y COOPER J.A. (1985)

Protein-tyrosine kinases.

Annu. Rev. Biochem. 54:897-930

HUTTNER W. y BENEDUM U. (1987)

Nature 325:305

HUTTON J.C., HANSEN F. y PESHAVARIA M. (1985)
 β -Granins: 21 KDa co-secreted peptides of the insulin granule closely related to adrenal medullary chromogranin.
FEBS Lett. 188:336-340

HUTTON J.C., DAVIDSON H.W., GRIMALDI K.A. y PESHAVARIA M. (1987)
Biosynthesis of betagranin in pancreatic β -cells
Biochem. J. 244:449-456

HUTTON J.C., DAVIDSON H.W. y PESHAVARIA M. (1987)
Proteolytic processing of chromogranin A in purified insulin granules.
Biochem. J. 244:457-464

HUTTON J.C., NIELSEN E. y KASTERN W. (1988)
The molecular cloning of the chromogranin A-like precursor of β -granin and pancreastatin from the endocrine pancreas.
FEBS Lett. 236:269-274

IANCANGELO A., AFFOLTER H-U, EIDEN L.E., HERBERT E. y GRIMES M. (1986)
Bovine chromogranin A sequence and distribution of its messenger RNA in endocrine tissues.
Nature 323:82-86

IANCANGELO A.L., FISHER-COLBRIE, KOLLER K.J., BROWNSTEIN M.J, y EIDEN L.E. (1988)
The sequence of porcine chromogranin A messenger RNA demonstrate chromogranin A can serve as the precursor for the biologically active hormone, pancreastatin.
Endocrinology 122:2339-2341)

IANCANGELO A., OKAYAMA H., EIDEN L.E. (1988)
Primary structure of rat chromogranin A and distribution of its mRNA.
FEBS Lett. 227:115-121

INGERBRETSEM W.R. Jr y WAGLE S.R. (1972)

A rapid method for the isolation of large quantities of rat liver parenchymal cells with high anabolic rates.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 47:403-410

JACKSON R.A., HAMLING J.B., BLIX P.M. y NABARRO J.D.N. (1984)

Relationship among peripheral glucose uptake, oxygen consumption, and glucose turnover in postabsorptive man.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 59:857-860

JACOBS S., HAZUM E., SCHECHTER Y. y CUATRECASAS P. (1979)

Insulin receptor: Covalent labeling and identification of subunits.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4918-4921

JACOBS S. y CUATRECASAS P. (1981)

Characterization of insulin receptor carbohydrate by comparison of chemical and enzymatic deglycosylation.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 129:789-796

JACOBS S., KULL F.C. y Jr CUATRECASAS P. (1983)

Monensin blocks the maturation of receptors for insulin and somatomedin C: Identification of receptor precursors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1228-1231

KASUGA M., KARLSSON F.A. y KAHN C.R. (1982)

Insulin stimulates the phosphorylation of the 95.000-dalton subunit of its own receptor.

Science 215:185-186

KASUGA M., ZICK Y., BLITHE D.L., CRETZAZ M. y KAHN C.R. (1982)

Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system.

Nature 298:667-669

KESTON A.S. (1956)

Specific colorimetric enzymatic analytical reagents.

Am. Chem. Soc. Dallas, Texas, p 31 (resumen)

KIRK C.J. y HEMS D.A. (1974)

Hepatic action of vasopressin: Lack of a role for adenosine-3',5'-cyclic monophosphate.
FEBS Lett. 47:128-131

KOEVARY S.B., AZMITIA E.C. y Mc EVOY R.C. (1983)

Rat pancreatic serotonergic nerves: Morphologic, pharmacologic and physiologic studies.

Brain Res. 265:328-372

KOEVARY S.B., Mc EVOY R.C. y AZMITIA E.C. (1983)

Evidence for the presence of serotonergic perikarya in the fetal rat pancreas as demonstrated by the high affinity uptake of (³H)-5-HT.

Brain Res. 280:368-372

KONECKI D.S., BENEDUM U.M., GERDES H-H y HUTTNER W.B. (1987)

The primary structure of human chromogranin A and Pancreastatin.

J. Biol. Chem. 262:17026-17030

KREISBERG R. (1972)

Glucose-lactate interrelationships in man.

N. Engl. J. Med. 287:132-137

KUMARASAMY R. y COHN D.V. (1986)

Sulfatation of porcine parathyroid secretory protein I: Detection of tyrosine sulfate.

J. Biol. Chem. 262:16473-16477

KUO J.F., ANDERSSON R.G.C., WISE B.C., MACKERLOVA L., SALMONSSON I., BRACKETT N.L., KATOH N., SHOJI M. y WRENN R.W. (1980)

Calcium-dependent protein kinase. Widespread occurrence in various tissues and phyla of the animal kingdom and comparison of effects of phospholipid, calmodulin, and trifluorperazine.

Proc. Natl. Acad. Sci. 77:7039-7043

LAMBERTS R., SCHMIDT W.E. y CREUTZFELDT W. (1990)

Light and electron microscopical immunocytochemical localization of pancreastatin-like immunoreactivity in porcine tissues.

Histochemistry 93:369-380

LARNER J. et al (1978)

Insulin control of glycogen synthesis.

Adv. Cyclic Nucleotide Res. 9:425-439

LARSSON L.I. (1980)

New aspects on the neural, paracrine and endocrine regulation of islet function.

Front Horm. Res. 7:14-29

LEGHTON B. y COOPER G.J.S. (1988)

Pancreatic amylin and calcitonin gene-related peptide cause resistance to insulin in skeletal muscle in vitro.

Nature 335:632-635

LIKE A. y ORCI L. (1972)

Embryogenesis of the human pancreatic islets: A light and electron microscopic study.

Diabetes 21(supl.2):511-534

LINDSTROM P. (1982)

Modification of mouse islet function by 5-hydroxy-tryptamine, dopamine and their precursors.

Acta Biol. Med. Germ. 41:1185-1190

LONG C., SMITH O. y FRY E. (1950)

Actions of cortisol and related compounds on carbohydrate and protein metabolism. En Wolstenholm O., Connor M. (eds): Metabolic Effects of Adrenal Hormone. London, Churchill, pp. 4-24.

LOPEZ J.M. (1986)

Estudio de la secreción de insulina en las regiones ventral y dorsal del páncreas.

Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla

LORINET A-M, TATEMOTO K., LABURTHE M. y AMIRANOFF B. (1989)

Pancreastatin inhibits insulin release from Rin m 5F cells: reversion by pertussis toxin.

Eur. J. Pharmacol. 160:405-407

- LUCEY M.R., FRAS A.M., DeIVALLE J. y YAMADA T. (1988)
Effect of exogenous pancreastatin on exocrine and endocrine function in rat stomach.
Biomed. Res. 1 [Suppl.]:19
- LUKINIUS A., WILANDER E., WESTMARK G.T., EGSTROM U. y WESTERMARK P. (1989)
Co-localization of islet amyloid polypeptide and insulin in the B cell secretory granules of the human pancreatic islets.
Diabetologia 32:240-244
- LYNCH C.J., PRPIC V., BLACKMORE P.F. y EXTON J.F. (1986)
Effect of islet-activating pertussis toxin on the binding characteristics of Ca^{2+} -mobilizing hormones and on agonist activation of phosphorylase in hepatocytes.
Mol. Pharmacol. 29:196-203
- MADISON L. (1969)
Role of insulin in the hepatic handling of glucose.
Arch. Inter. Med. 123:284-292
- MAKHLOUF G.M. (1980)
The role of VIP in the function of the gut.
En: Said S.I. (ed.): Vasoactive Intestinal Peptide. New York, Raven Press, pp 425-446
- MANCHESTER K.L. (1970)
The control by insulin of amino acid accumulation in muscle.
Biochem. J. 117:457-465
- MARGOLIS R.N., TAYLOR S.I., SEMINARA D. y HUBBARD A.L. (1988)
Identification of pp120, an endogenous substrate for the hepatocyte insulin receptor tyrosine kinase, as an integral membrane glycoprotein of the bile canalicular domain.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7256-7259
- McCLAIN D.A., MAEGAWA H., LEE J., DULL T.J., ULLRICH A., et al (1987)
A mutant insulin receptor with defective tyrosine kinase displays no biologic activity and does not undergo endocytosis.
J. Biol. Chem. 262:14663-14671

McDONALD T.J., DUPRE J., TATEMOTO K., GREEBERG G.R., RADZIUK J. y MUTT V. (1985)

Galanin inhibits insulin secretion and induces hyperglycemia in dogs.
Diabetes 34:192

MERIMEE T.J. y FINEBERG S.F. (1973)

Homeostasis during fasting. II. Substrate differences between men and women.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 37:698-702

MILNER R.D.G. y De GASPARO M. (1981)

The autonomic nervous system and perinatal metabolism.

En Development of the autonomous system. Ciba Foundation Symposium 83, Pitman Medical, pp 291-309

MJEMDAHL P., BELFRAGE E. y DALESKOG M. (1979)

Vascular and metabolic effects of circulating epinephrine and norepinephrine: Concentration effect study in dogs.

J. Clin. Invest. 64:1221-1228

MORGAN D.O. y ROTH, R.A. (1987)

Acute insulin action requires insulin receptor kinase activity: Introduction of an inhibitory monoclonal antibody into mammalian cells blocks the rapid effects of insulin.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:41-45

MUNCK A. (1962)

Studies on the mode of action of glucocorticoids in rats. II. The effects in vivo and in vitro on net glucose uptake by isolated adipose tissue.

Biochim. Biophys. Acta 57:318-326

NEVILLE D.M. Jr (1968)

Isolation of an organ specific protein antigen from cell surface membrane of rat liver.

Biochim. Biophys. Acta 154:540-552.

NILSSON L. (1973)

Liver glycogen content in man in the postabsorptive state.

Scand. J. Clin. Lab. Invest. 32:317-323

NILSSON L. y HULTMAN E. (1973)

Liver glycogen in man -the effect of total starvation on a carbohydrate-poor diet followed by carbohydrate refeeding.

Scand. J. Clin. Lab. Invest. 32:325-330

O'CONNOR D.T. (1983)

Chromogranin: widespread immunoreactivity in polypeptide hormone producing tissues and in serum.

Reg. Pept. 6:263-268

O'CONNOR D.T., BURTON D.W., PARMER R.J. y DEFTOS L.J. (1984)

Human chromogranin A: detection by immunohistochemistry in C cells and diverse polypeptide hormone producing tumors.

En: Endocrine control of bone and calcium metabolism. Cohn D.V., Fujita T y Talmage R.V. (ed). Elsevier, Amsterdam, p 187-190

ORCI L. (1985)

Macro and micro-domains in the endocrine pancreas

Diabetes 31:538

ÖSTENSON C-G, EFENDIC S. y HOLST J.J. (1989)

Pancreastatin-like immunoreactivity and insulin are released in parallel from the perfused porcine pancreas.

Endocrinology 124:2986-2990

ÖSTENSON C-G., SANDLER S. y EFENDIC S. (1989)

Effects of porcine pancreastatin on secretion and biosynthesis of insulin and glucose oxidation of isolated rat pancreatic islets.

Pancreas 4:441-446

OWEN O. et al. (1967)

Brain metabolism during fasting.

J. Clin. Invest. 46:1589-1595

OWEN O. y REICHARD G. (1971)

Human forearm metabolism during progressive starvation.

J. Clin. Invest. 50:1536-1545

PEARSE A. y TAKOR-TAKOR T. (1979)

Embriology of the diffuse neuro-endocrine system and its relationship to the peptides.
Fed. Proc. 38:2288-2294

PEHLING G., TESSARI P., GERICH J.E., et al (1984)

Abnormal meal carbohydrate disposition in insulin-dependent diabetes. Relative contributions of endogenous glucose production and initial splachnic uptake and effect of intensive insulin therapy.
J. Clin. Invest. 74:985-991

PEIRO E., MIRALLES P., SILVESTRE R.A., VILLANUEVA M.L. y MARCO J. (1989)

Pancreastatin inhibits insulin secretion as induced by glucagon, vasoactive intestinal peptide, gastrin inhibitory peptide and 8-cholecystokinin in the perfused rat pancreas.
Metabolism 38: 679-682

PERLEY M.J. y KIPNIS D.M. (1967)

Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose. Studies in normal and diabetic subjects.
J. Clin. Invest. 46:1954-1962

PETERSON J.B., NELSON D.L., LING E. y ANGELETTI R.H. (1987)

Chromogranin A-like proteins in the secretory granules of a protozoan, *Paramecium tetraurelia*.
J. Biol. Chem. 262:17264-17267

PFEIFFER E.F., FRANK M., FUSSGANGER R.D., GOBERNA R., HINZ M. y RAPTIS S. (1970)

Gastrointestinal hormones and islet function.
XVI Nobel Symp. Frontier in gastrointestinal hormone research. July 20,21. Ed. por Alinquist y Wirsell. 245-247. Stockolm 1973

PILCH P.F. y CZECH M.P. (1979)

Interaction of cross-linking agents with the insulin effector system of isolated fat cells.
J. Biol. Chem. 254:3375-3380



POZFSKY T., et al (1976)

Metabolism of forearm tissues in man: Studies with glucagon.

Diabetes 25:128-135

RADZIUK J., McDONALD T.J., RUBENSTEIN D. y DUPRE J. (1978)

Initial splanchnic extraction of ingested glucose in normal man.

Metab. Clin. Exp. 27:657

RADZIUK J. (1978)

Hepatic glycogen formation by direct uptake of glucose following oral glucose loading in man.

Can. J. Physiol. Pharmacol. 57:1196-1199

RADZIUK J. (1982)

Source of carbon in hepatic glycogen synthesis during absorption of an oral glucose loading in human.

Fed. Proc. 41:110-116

RAVAZZOLA M., ORCI L., HABENER J.F. y POTTS Jr J.T. (1978)

Parathyroid secretory protein: immunocytochemical localization within cells that contain parathyroid hormone.

Lancet 2:371-372

RAVAZZOLA M., EFENDIC S., ÖSTENSON C.G., TATEMOTO K., HUTTON J.C. y ORCI L. (1988)

Localization of pancreastatin immunoreactivity in porcine endocrine cells.

Endocrinology 123:227-229

REAVEN G.M. (1988)

Role of insulin resistance in human disease.

Diabetes 37:1595-1605

REES-JONES, HEDO J.A., ZICK Y. y ROTH J. (1983)

Insulin-stimulated phosphorylation of the insulin receptor precursor.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 116:417-422

REHFELD J.H., LARSSON L.I., GOLTERMAN N.R., et al (1980)
Neural regulation of pancreatic hormone secretion by the C-terminal tetrapeptide of CCK.
Nature 284:33-38

REIFFEN F.U. y GRATZL M. (1986)
Chromogranins, widespread in endocrine and nervous tissue, bind Ca^{2+} .
FEBS Lett. 195:327-330

REINECKE M. y FORSSMANN W.G. (1984)
Why do we study the phylogeny of neuropeptides hormones?
En Falkmer S., Hakanson R., Sundler F. (ed): Evolution and Tumour Pathology of the Neuroendocrine System. Fernstrom Foundation Series. Amsterdam, Elsevier, pp 1-6

REUSENS-BILLEN B., PIRLOT C., REMACLE C. et al (1984)
Localization of GABA high-affinity binding sites in the pancreas of neonatal rats.
Cell Tissue Res. 235:503-508

RIBES G., VECINA F., HILLAIRE-BUYS D. y AHREN B. (1990)
Effects of pancreastatin on pancreatic hormone secretion in the dog.
Horm. Res. 33:194-198

RIDDICK F., REISLER D. y KIPNIS D. (1962)
The sugar transport system in striated muscle: Effect of growth hormone, hydrocortisone and alloxan diabetes.
Diabetes 11:171-178

RIZZA R.A. et al. (1981)
Growth hormone-induced insulin resistance in man: Postreceptor impairment in hepatic and peripheral tissue sensitivity to insulin.
Diabetes 30:38

RIZZA R.A., MANDARINO L. y GERICH J.E. (1981)
Cortisol-induced insulin resistance in man: Impaired suppression of glucose production and stimulation of glucose utilization due to a postreceptor defect of insulin action.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 54:131-138.

RIZZA R.A., HAYMOND M.W., VERDONK C.A., et al. (1981)
Pathogenesis of hypoglycemia in insulinoma patients. Suppression of hepatic glucose production by insulin.
Diabetes 30:377-381

ROSA P., HILLE A., LEE R.W.H., ZANINI A., CAMILLI P.D. y HUTTNER W.B. (1985)
Secretogranins I and II: Two tyrosine-sulfated secretory proteins common to a variety of cells secreting peptides by the regulated pathway.
J. Cell. Biol. 101:1999-2011

ROSEN O.M., HERRERA R., OLOWE Y., PETRUZZELLI L.M. y COBB M.H. (1983)
Phosphorilation activates the insulin receptor tyrosine protein kinase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3237-3240

ROTH R.A. MESIROW M.L. y CASSELL D.J. (1983)
Preferential degradation of the β subunit of purified insulin receptor.
J. Biol. Chem. 258:14456-14460

ROTH R.A. y CASSEL D.J. (1983)
Insulin receptor: Evidence that it is a protein kinase.
Science 219:299-301

ROTH R.A. y BEAUDOIN J. (1987)
Phosphorylation of purified insulin receptor by cAMP kinase.
Diabetes 36:123-126

RUOSLAHTI E. y PIERSCHBACHER M.D. (1986)
Arg-gly-asp: a versatile cell recognition signal.
Cell 44:517-518

SANCHEZ V., CALVO J.R. y GOBERNA R. (1990)
Glycogenolytic effect of pancreastatin in the rat.
Biosc. Reports 10:87-91

SANCHEZ V., GOBERNA R. y CALVO J.R. (1991)
Glycogenolytic effect of VIP in the rat in vivo.
Experientia (En prensa)

SCHADE D., EATON P. y STANDEFER J. (1978)
Modulations of basal ketone body concentration by cortisol in diabetic man.
J. Clin. Endocrinol. Metab 47:519-528

SCHMIDT W.E., SIEGEL E.G., LAMBERTS R., GALLWITZ B. y CREUTZFELDT W. (1988)
Pancreastatin: Molecular and immunocytochemical characterization of a novel peptide in porcine and human tissues.
Endocrinology 123:1395-1404

SERVICE F.J., RIZZA R.A., HALL L.D., Et al (1983)
Prandial insulin requirements in insulin-dependent diabetics: Effects of size, time of day, and sequence of meals.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 57:931-936

SEKIYA K., GHATEI M.A., MINAMINO N., BRETHERTON-WATT D., MATSUO H. y BLOOM S.R. (1988)
Isolation of human pancreastatin fragment containing the active sequence from a glucagonoma.
FEBS Lett 228:153-156

SHIA M.A. y PILCH P.F. (1983)
The β subunit of the insulin receptor is an insulin-activated protein kinase.
Biochemistry 22:717-721

SILVESTRE R.A., PEIRO E., MIRALLES P., VILLANUEVA M.L. y MARCO J.
Effects of pancreastatin on insulin, glucagon and somatostatin secretion by the perfused rat pancreas.
Life Sci. 42:1361-1367

SILVERBERG A., et al. (1978)
Norepinephrine: Hormone and neurotransmitter in man.
Am. J. Physiol. 234:252-256

SIMON J-P, BADER M-F y AUNIS D. (1988)

Secretion from chromaffin cells is controlled by chromogranin A-derived peptides.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:1712-1716

SMITH O. y LONG C. (1967)

Effect of cortisol on the plasma amino nitrogen of eviscerated adrenalectomized diabetic rats.

Endocrinology 80:561-566

SMITH D.M., KING M.J. y SALE G.J. (1988)

Two systems in vitro that show insulin-stimulated serine kinase activity towards the insulin receptor.

Biochem. J. 250:509-519

SMITH P.M. y MADSON K.L. (1981)

Interactions between autonomic nerves and endocrine cells of the gastroenteropancreatic system.

Diabetologia 20:314-324

SOWA R., SANKE T., HIRAYAMA J., TABATA H., NISHIMURA S. y NANJO K. (1990)

Islet amyloid polypeptide amide causes peripheral insulin resistance in vivo in dogs.

Diabetologia 33:118-120

STADTMAUER L. y ROSEN O.M. (1986)

Increasing the cAMP content of IM-9 cells alters the phosphorylation state and protein kinase activity of insulin receptor.

J. Biol. Chem. 261:3402-3407

STALMANS W. (1976)

The role of the liver in the homeostasis of blood glucose.

Curr. Top. Cellul. Reg. 11:51-97

STEFAN Y., GRASSO S., PERRELET A. y ORCI L. (1982)

The pancreatic polypeptide rich lobe of the human pancreas: Definite identification from the ventral pancreatic primordium.

Diabetologia 23:141-142

STUBS M., KIRK C.J. y HEMS D.A. (1976)

Role of extracellular calcium in the action of vasopressin on hepatic glycogenolysis.

FEBS Lett. 69:199-202

SUNDLER F., MOGHIMZADEH E., HAKANSON R., et al (1983)

Nerve fibers in the gut and pancreas of the rat displaying neuropeptide Y immunoreactivity. Intrinsic and extrinsic origin.

Cell Tissue Res. 230:487-493

SUNDLER F. y HAKANSON R. (1984)

Gastro-enteropancreatic endocrine cells in higher mammals, with special reference to their ontogeny in the pig.

En Falkmer S., Hakanson R., Sundler F. (ed): Evolution of Tumour Pathology of the Neuroendocrine System. Fernstrom Foundation Series. Amsterdam, Elsevier, pp 111-136

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

SUTHERLAND E. y RALL T. (1960)

The relation of adenosine 3',5'-phosphate and phosphorylase to the actions of catecholamine and other hormones.

Pharmacol. Rev. 12:265-299

TAKAYAMA S., WHITE M.F., LAURIS V. y KAHN C.R. (1984)

Phorbol esters modulate insulin receptor phosphorylation and insulin action in cultured hepatoma cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7797-7801

TAKAYAMA S., WHITE M.F. y KAHN C. (1988)

Phorbol ester-induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity.

J. Biol. Chem. 263:3440-3447

TAKAYAMA S., KAHN C.R., KUBO K. y FOLEY J.E. (1988)

Alterations in insulin receptor autophosphorylation in insulin resistance: Correlation with altered sensitivity to glucose transport and anti-lipolysis to insulin.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 66:992-999

TATEISHI K., FUNAKOSHI A., JIMI A., FUNAKOSHI S., TAMAMURA H., YAJIMA H. y MATSUOKA Y. (1989)

High plasma pancreastatinlike immunoreactivity in a patient with malignant insulinoma.

Gastroenterology 97:1313-1318

TATEISHI K., FUNAKOSHI A., WAKASUGI H., IGUCHI H., SHINOZAKI H., ABE M., FUNAKOSHI S., TAMAMURA H., YAJIMA H. y MATSUOKA Y. (1989)

Plasma pancreastatin-like immunoreactivity in various diseases.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 69:1305-1308

TATEMOTO K., EFENDIC S., MUTT V., MAKK G., FEISTNER G.J. y BARCHAS J.D. (1986)

Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion.

Nature 324:476-478

TISSERAND-JOCHEM E-M, LOPEZ E., MILET C., VIDAL B., MAGNAC C., EYQUEM A. y COHN D.V. (1987)

Co-localization and secretion of parathyrin of Stannius corpuscles (immunoreactive parathyroid hormone) and of secretory glycoproteins including secretory protein-I in the European eel (*Anguilla anguilla* L.).

Bone Mineral 2:163-174

TORNQVIST H.E., GUNSALUS J.R., NEMENOFF R.A., FRACKELTON A.R., PIERCE M.W., et al (1988)

Identification of the insulin receptor tyrosine residues undergoing insulin-stimulated phosphorylation in intact rat hepatoma cells.

J. Biol. Chem. 263:350-359

TZE W.T. (1975)

Gastric inhibitory polypeptide (GIP): A potent stimulator of insulin release.

Gastroenterology 68:621

- UHING R.J., PRIPIC V. JIANG H. y EXTON J.H. (1986)
Hormone stimulated polyphosphoinositide breakdown in rat liver plasma membranes.
J. Biol. Chem. 261:2140-2146
- UNGER R.H. y GRUNDY S. (1985)
The glucotoxicity theory.
Diabetologia 28:119-121
- VAN NOORDEN S. (1984)
The neurocrine system in protostomian and deuterostomian invertebrates and lower vertebrates.
En Falkmer S., Hakanson R., Sundler F. (ed):Evolution and Tumour Pathology of the Neuroendocrine System. Fernstrom Foundation Series. Amsterdam, Elsevier, pp 7-38.
- VAN OBERGHEN E.B., ROSSI A., KOWALSKI A. y GAZZANO H. (1983)
Receptor-mediated phosphorylation of the hepatic insulin receptor; evidence that the M_r 95.000 receptor subunit is its own kinase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:945-949
- WALL J.S. et al (1957)
Effect of insulin on utilization and production of circulating glucose.
Am. J. Physiol. 189:43-50
- WAHREN J., et al (1971)
Glucose metabolism during leg exercise in man.
J. Clin. Invest. 50:2715-2725
- WAHREN J., et al. (1977)
Influence of somatostatin on splanchnic glucose metabolism in postabsorptive and 60 hour-fasted humans.
J. Clin. Invest. 59:299-307
- WESTERMARK P. (1989)
Islet amyloid and type 2 diabetes.
En Diabetes Mellitus: Pathophysiology and therapy. Bayer AG Centenary Symposium 63-70. Springer Verlag. Berlin. Heidelberg. Nueva York.

WHITE M.F., MARON R. y KAHN C.R. (1985)
Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a M_r -185.000 protein in intact cells.

Nature 318:183-186

WHITE M.F., SHOELSON S.E., KEUTMANN H. y KAHN C.R. (1988)
A cascade of tyrosine autophosphorylation in the β -subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor.

J. Biol. Chem. 263:2969-2980

WILLIAMSON J.R., COOPER R.H. y HOEK J.B. (1981)
Role of calcium in the hormonal regulation of liver metabolism.

Biochim. Biophys. Acta 639:243-295

WILSON B.S. y LLOYD R.V. (1984)
Detection of chromogranin in neuroendocrine cells with a monoclonal antibody.

Am. J. Path. 115:458-468

WINKLER H. y CARMICHAEL S.W. (1982)
The chromaffin granule.

En: The secretory granule. Poisner A.M. y Trifaro J.M. (ed). Elsevier, Amsterdam, p 3-79

YARDEN Y. y ULLRICH A. (1988)
Growth factor receptor tyrosine kinases.

Annu. Rev. Biochem. 57:443-478

YIP C.C., MOULE M.L. y YEUNG C.W.T. (1980)

Characterization of insulin receptor subunits in brain and othr tissues by photoaffinity labeling.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 96:1671-1678

ZIERLER K.L. y RABINOWITZ D. (1963)

Roles of insulin and growth hormone, based on studies of forearm metabolism in man.

Medicine 42:385-402

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

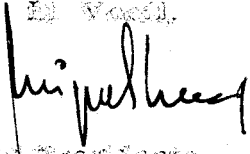
Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

Victor Sanchez Margalef
sobre Papel de la Pancestative en la
historia de la lengua

acordó otorgarle la calificación de APTO con LAUDE

Sevilla, 5 de Julio 1991

El Vocal.



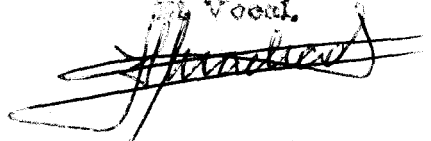
El Secretario

El Vocal.



El Secretario.

El Vocal.



El Doctorado.

