

R. 3959



T.O.
A/24

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

"CINETICA DE LA SECRECION DE INSULINA DURANTE EL AYUNO"

Eduardo Arilla Ferreiro

Tesis para aspirar al grado de
Doctor en Medicina y Cirugia.
Sevilla Diciembre de 1978.



CATEDRA DE BIOQUIMICA
FACULTAD DE MEDICINA
SEVILLA-B

PROF. RAIMUNDO GOBERNA



AVDA. SANCHEZ PIJUAN, 4
TELEFOS. 87 70 60 - 87 78 70

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

CERTIFICA: Que el trabajo titulado "Cinetica de la secreción de insulina durante el ayuno", realizado por el licenciado Eduardo Arilla Ferreiro para aspirar al grado de Doctor, ha sido llevado a cabo bajo mi dirección.



R. Goberna

Sevilla 21 de Diciembre de 1978

(Prof. Dr. R. Goberna)

A mi padre y a Pilar (en memoria).

A mi madre.

A Mari Carmen.

AGRADECIMIENTOS

Mi mas profunda gratitud al Prof.Goberna, director de la Tesis, que con su inestimable ayuda y amistad, ha hecho posible la realizacion de este trabajo.

Igualmente a mis compañeros de la Cátedra de Bioquimica:

J.C.Prieto.

F.Sobrino.

M.Lucas.

S.Ortiz.

T.Herrera.

E.Pintado.

C.Osuna.

G.Ruiz.

por su aliento y critica en todo momento.

A los alumnos internos de la Cátedra, que me han ayudado eficazmente.

A Pili, Elena y Javier, por su ayuda en la primera mecanografia del presente trabajo.

A la Sta Gomez, secretaria, por la magnifica asistencia tecnica prestada.

Al Sr.Periañez, por su excelente labor fotografica.

INDICE.

INDICE

1°) <u>Introducción y objetivo</u>	1
1.1) Glucorreceptor, glucosensor o transportador...	5
1.2) Metabolismo de la célula beta.....	10
1.3) Sistema adenilciclase en la célula beta.....	14
1.4) Quimiosensibilidad de la célula beta.....	24
1.5) Sistema de acoplamiento entre los mecanismos sensitivos y los de descarga.....	37
1.6) Emiocitosis.....	44
1.7) Objetivos.	54
2°) <u>Material y Métodos</u>	56
2.1) Animales de experimentación.....	57
2.2) Descripción de la técnica operatoria.....	57
2.3) Descripción del sistema de perfusión.....	66
2.4) Determinación de la insulina.....	75
2.4.1) Producción de anticuerpos.....	75
2.4.2) Titulación de anticuerpos.....	76
2.4.3) Marcaje de insulina con I ¹²⁵	78
2.4.4) Purificación de insulina.	82
2.4.5) Preparación de la insulina fría... 84	
2.4.6) Preparación de la fracciones libre y ligada al anticuerpo.....	84
2.4.7) Preparación de la curva standard e interpolación de problemas.....	87
2.5) Diseño experimental.....	90

3°) <u>Resultados</u>	93
3.1) Controles.....	94
3.2) Ayuno y estimulación con glucosa.....	104
3.3) Ayuno y estimulación con arginina.....	132
3.4) Ayuno y estimulación con beta-OH-butirato.....	166
3.5) Ayuno y realimentación.....	184
3.6) Ayuno y estimulación con niveles elevados de Ca ²⁺ teofilina y db-cAMP, en el medio de perfusión.....	207
3.7) Calculos estadísticos entre los diferentes grupos..	241
4°) <u>Integración de Resultados y Discusión</u>	255
5°) <u>Conclusiones</u>	275
6°) <u>Bibliografía</u>	278

1º INTRODUCCION Y OBJETIVOS.

El páncreas es una glándula que tiene una doble función: exocrina y endocrina. La secreción exocrina o externa se denomina jugo pancreático. La endocrina, a cargo de los islotes de Langerhans, segrega hormonas, que pasan directamente a la sangre.

Al microscopio óptico, los islotes de Langerhans aparecen como acúmulos celulares con varios tipos de células: las células beta que segregan insulina, las células alfa que segregan el glucagón y otros tipos celulares que son los responsables de la secreción de gastrina, somatoestatina y otras hormonas. Las células alfa suelen aparecer en la periferia del islote y las células beta hacia el centro.

Al microscopio electrónico, en la célula beta se destacan unos gránulos densos dentro de unas vesículas. Estos gránulos se denominan beta y contienen insulina y proinsulina.

El aislamiento de la hipotética hormona pancreática fue laborioso y tardío. Su descubrimiento se debió a dos cirujanos canadienses, Banting y Best, en 1921, y se aplicó inmediatamente en clínica con resultados espectaculares. Es interesante conocer la causa por la que se tardó más de 20 años en la extracción de la insulina. La dificultad consistía en la purificación a partir de tejido pancreático. El páncreas es, en un 98 por ciento, exocrino: tiene por función segregar jugo pancreático compuesto de agua, bicarbonato y enzimas necesarios para la digestión de lípidos, proteínas y carbohidratos. Ahora bien, en la extracción, se provoca involuntariamente la activación de

tripsina y quimotripsina , que son enzimas proteolíticos, es decir, degradantes de la insulina al tratarse de una hormona proteica. La rotura de las cadenas peptídicas de la insulina acaba con la funcionalidad o actividad biológica de la misma.

La solución de este problema la encontraron varios grupos a la vez en lugares distintos (Rumania, Grecia, Canadá, etc.), pero la más conocida es la experiencia de Banting y Best. Ambos investigadores operaron a un perro y le ligaron los conductos excretorios pancreáticos, provocando de esta suerte la atrofia del páncreas exocrino en unas pocas semanas. El páncreas procedente de este animal era pobre en enzimas proteolíticos; efectivamente, un homogenizado del mismo podía bajar la glucemia en el perro diabético.

En los años siguientes, se logró purificar la insulina, conocer sus características fisicoquímicas, sus propiedades y, por último, el mecanismo de su síntesis. En 1955, Sanger dilucidó la estructura de la insulina bovina y, en 1963, investigadores norteamericanos, chinos y alemanes, simultánea e independientemente, lograron la síntesis de dicha hormona.

La insulina es una proteína pequeña, de peso molecular 5.900. Se compone de dos cadenas, A y B, unidas por dos puentes disulfuro. Existe también un puente disulfuro intracatenario en la cadena A.

En su configuración forma hexámeros con cationes de cinc (Zn^{++}), agrupándose varias moléculas.

En 1970, Steiner y colaboradores, de la Universidad de Chicago, aislaron un precursor de la insulina, al que denominaron proinsulina. El peso molecular de la proinsulina es de 9.000, aproximadamente, y tiene muy poca actividad biológica. En presencia de enzimas proteolíticos como la tripsina se rompe la cadena de proinsulina, liberando el péptido de conexión (C), transformándose en la insulina.(Goberna 1978)

1.1) GLUCOSENSOR

Se acepta de un modo general que la D-glucosa es el estímulo fisiológico de la secreción de insulina. Esto fué puesto de manifiesto por Foglia en 1935 y posteriormente por Anderson y otros autores. Además de la D-glucosa existe un gran número de factores fisiológicos capaces de modular la secreción de insulina como otras hexosas y derivados, ácidos grasos, cuerpos cetónicos, aminoácidos y productos del metabolismo intermediario, hormonas y neurotransmisores.

En 1970 Cerasi y Luft sugirieron que la glucosa por sí misma podría activar un receptor (glucosensor) que inmediatamente transmitiría el estímulo necesario para la liberación de insulina. La célula B reconoce y cuantifica al estímulo secretor. Junto a este hecho inicial, es posible identificar otros dos componentes de la insulino-secreción: El sistema de acoplamiento que proporciona una unión, causa efecto, entre los mecanismos sensitivos y los de descarga; y el "aparato" para la descarga de insulina.

Estos últimos componentes deben tener equivalentes en otras células en las que los granulos de secreción sean descargados por emiocitosis.

En pancreas de rata aislado y perfundido concentraciones de glucosa de 300 mg % dan lugar a una primera fase de aumento rápido de los niveles insulínicos seguida de un

descenso y un nuevo aumento más lento que llega nuevamente a los niveles obtenidos en la fase anterior.

Observaciones recientes realizadas utilizando las dos formas anómericas de la D-glucosa también apoyan la hipótesis del glucorreceptor. Así la secreción de insulina es estimulada preferentemente por el anómero alfa de la glucosa. En cambio los islotes de Langerhans, como otros tejidos, parece metabolizar con preferencia el anómero B que, por otra parte, posee un menor poder insulinógeno.

Si bien esta distinción funcional entre los anómeros alfa y beta de la glucosa no es absoluta, nos hace pensar que la célula B, ha desarrollado la propiedad particular de reconocer el anómero alfa como desencadenante del mensaje insulinógeno.

Se puede plantear la cuestión de saber si las respuestas inicial y tardía de la insulina a la glucosa obedecerían a mecanismos diferentes, estando por ejemplo controlada la respuesta inicial por un glucosensor y la tardía se hallaría bajo la influencia de la utilización de la hexosa por las células beta.

La hipótesis de que la secreción tardía de insulina tenga lugar por metabolitos o factores resultantes de la metabolización de la glucosa por la célula B se basa en el hecho de que la mannoheptulosa, aldosa de siete carbonos, además de inhibir competitivamente la acción

de las hexoquinasas y de este modo la fosforilización de la glucosa a glucosa-6-P y por lo tanto su metabolización, es también capaz de inhibir simultáneamente la secreción de insulina mediada por glucosa (Coore et al 1963).

También indujo a correlacionar la capacidad insulino secretora de las diversas hexosas con su capacidad para servir como sustratos oxidables a la célula B el hecho de que la galactosa, que se metaboliza deficientemente en muchos tejidos, carezca de poder insulino secretor.

Se ha propuesto como metabolitos intermedios responsables de la secreción de insulina la G-6-P, Ac. 6 -fosfogluconico y Ac. difosfoglicerico, aunque se han planteado serias dudas sobre su autenticidad, especialmente a partir de los trabajos de Matschinsky et al 1971 demostrando que la glucosa por si sola es capaz de provocar la secreción de insulina antes de que sufra alteraciones metabólicas.

Este hecho apoya la idea de que la secreción de insulina tiene lugar al combinarse la glucosa con un receptor específicos (glucorreceptor).

El glucosensor posee una elevada especificidad hacia determinadas concentraciones de glucosa o azúcares muy similares. Así en los primeros trabajos realizados con la técnica de perfusión de pancreas de rata in vitro

Grodsky et al (1963) observaron que la glucosa y manosa son los estimuladores más potentes de la secreción de insulina, mientras que la fructosa y el xilitol no provocan ningún cambio. Una pequeña modificación estructural es capaz de ser detectada por el glucorreceptor así, la glucosa-1-P y la G-6-P no provocan secreción de insulina "in vitro". Ambos metabolitos inhiben la liberación de insulina mediada por la glucosa.

Si consideramos la característica dosis respuesta a la glucosa de las reacciones insulínicas inicial y tardía, podemos ver que las Km para estas dos funciones son análogas en el hombre y en toda una serie de modelos experimentales, mientras que la capacidad (Vmax) de la respuesta tardía es en la mayoría de los casos, sensiblemente mayor. Así cualesquiera que sean los mecanismos celulares implicados en estas dos fases de la secreción de insulina, su afinidad por la glucosa sobre la puesta en juego de la liberación de insulina es uniforme en el tiempo, estando implicada una sola unidad de reconocimiento. Ello no elimina la posibilidad de que el metabolismo de la glucosa en la célula beta puede ser determinante para la modulación de la respuesta insulínica, en particular en su fase más tardía, como ha sugerido Cesari y Luft (1970).

El glucorreceptor parece ser una glicoproteína, habiéndose demostrado además que la glucosa manosa y fructosa cambian el espectro de absorción ultravioleta

de fracciones parcialmente purificadas de membranas de islotes, mientras que azúcares no estimuladores de la secreción de insulina no provocan ningún efecto.

Esta hipótesis del glucorreceptor supone una disociación entre la función metabólica y secretora de la glucosa o de cualquier otro azúcar capaz de estimular la secreción de insulina. Todavía no se ha conseguido una evidencia definitiva de esta disociación de funciones, puesto que todos los azúcares que estimulan la secreción de insulina son al mismo tiempo metabolizables por la célula beta.

Sin embargo el hecho de que algunos azúcares como la fructosa (Ascroft 1972) que son metabolizables por la célula beta, no produzcan secreción de insulina, apoyaría la hipótesis de un receptor específico. Como ya ha sugerido Randle apoyaría la hipótesis de una glucosensor el encontrar un azúcar que aunque no fuera metabolizable estimulase la secreción de insulina, o que fuera capaz de inhibir específicamente la secreción de insulina producida por la glucosa sin inhibir el metabolismo de la misma en el célula beta.

Puede decirse por lo tanto que el mecanismo más probable es que sea la glucosa la que actúe por sí misma sobre un receptor específico de la célula beta, si bien la teoría de que algunos de sus metabolitos intracelulares actúe también, no puede descartarse.

1.2) METABOLISMO DE LA CELULA BETA

Se ha estudiado el metabolismo de la célula beta con glucosa marcada en C-1 y en C-6 (Field et al 1960, Keen et al., 1961; Ahscroft y Randle 1970, etc).

= Al elevarse los niveles extracelulares de glucosa aumenta paralelamente la concentración intracelular de la misma en la célula beta del islote de Langerhans (Matschinsky et al 1968). Estos autores sugieren la existencia de un mecanismo de transporte específico para la glucosa a través de la membrana de la célula beta.

Estos mismos autores han descrito también que la concentración de glucosa-6-P guarda una relación sigmoide con la glucosa extracelular, alcanzando valores máximos para una concentración de 50 - 60mM de glucosa.

En el ratón obeso hiperglucémico se ha demostrado la posibilidad de un sistema específico de transporte para la glucosa en la célula beta (Hellman et al 1971), selectivo para D-glucosa frente a L-glucosa.

En islotes de mamíferos, la presencia de glucógeno indica que los enzimas para su síntesis y liberación están presentes; la síntesis se produce en pequeña proporción, puesto que los islotes no tienen una reserva significativa de glucógeno. Se supone que no tiene lugar la neoglucogénesis porque la fructosa difosfatasa está prácticamente ausente de los islotes.

La célula beta posee los enzimas necesarios para la realización de los principales caminos metabólicos de la glucosa: metabolismo del glucógeno, glicolisis, vía pentosa fosfato y ciclo de Krebs, (Matschinsky 1973, Brolin y Berne 1970, Gepts et al 1970).

El monoiodoacetato es otra sustancia inhibidora del metabolismo que actúa a nivel de la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa y que a mayores concentraciones interfiere con otros procesos metabólicos.

Se ha descrito una acción inhibidora de iodoacetato sobre la secreción de insulina (Georg et al 1971, Hellman e Idahal, 1969). Sus efectos han sido estudiados por Hellman et al (1973): a concentraciones 0'1mM de iodoacetamida se estimula significativamente la secreción de insulina, mientras que a concentraciones 0'3 a 1 mM hay una estimulación inicial seguida de inhibición. La acción inhibidora cursa con un aumento del contenido celular en fructosa 1-6 difosfato. Se trata posiblemente de dos efectos diferentes de la iodoacetemida, uno superficial debido a acetilación de grupos SH y otra acción interna celular, de inhibición de la glicolisis.

Otras sustancias bloquean la vía del fosfogluconato (vía pentosa fosfato) como la 6 aminonicotinamida que inhibe la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y disminuye la secreción de insulina. Algún producto de esta vía pentosa fosfato es probable que intervenga en la secreción

de insulina inducida por la glucosa especialmente el NADP reducido y esto podría explicar la acción de pentosas y pentitoles. Precisamente los agentes que disminuyen el contenido celular de los islotes en NAD pueden también inhibir la secreción de insulina (Deery, Coleman y Taylor, 1971).

Parece ser que la degradación metabólica de la glucosa es una condición necesaria, aunque no suficiente para explicar la acción secretagoga de insulina.

En relación con éste problema se han estudiado los metabolitos que se encuentran en la células de los islotes aislados a partir del momento en que empieza su incubación con concentraciones eficaces de glucosa y se ha encontrado un aumento en hexosa fosfatos (Matschinsky y Ellerman 1968; Montague y Taylor 1969) y que hay una correlación directa entre la insulina liberada y el contenido celular en hexosafosfatos (Ashcroft et al 1970).

Matschinsky et al (1972) perfundiendo pancreas aislado de rata con glucosa 20 mM encuentran que a los 30 segundos se produce una disminución de G - 6 - P y un aumento de fructosa 1 - 6, difosfato (F.D.P.) y ácido fosfoenolpirúvico por lo que piensan que el primer efecto de la glucosa en la célula beta consiste en un estímulo de la fosfofructoquinasa. Estos resultados no se han confirmado por Ashcroft et al (1973) que trabajando con islotes aislados de rata y de raton

encuentra una elevación de G-6-P muy precoz y que el contenido de F D P y fosfotriosas solamente aumenta después de los 5 minutos.

Para Malaisse (1977) es el metabolismo de la glucosa y en particular a nivel de las triosas fosfato la responsables de la secreción de insulina.

1.3) SISTEMA ADENIL CICLASA EN LA CELULA BETA.

Las primeras evidencias indirectas en favor de la existencia del sistema adenil ciclasa en la célula beta se debe a Grodsky y Bennet 1966, Samols et al 1966, Malaisse et al 1967 y Sussman y Vaughan 1967.

Davis y Lazarus (1972) estudiaron a la adenil ciclasa de islotes pancreaticos del raton. El enzima era inhibido fuertemente por el ion calcio. Desde hace años sabemos que los agentes que teoricamente aumentan el contenido de A M P c insular refuerzan la secreción de insulina (Lambert 1971, Malaisse 1967, Turtle 1967).

Se ha admitido que el sistema adenilato ciclasa-AMPC de la célula beta podría desempeñar un papel en la liberación de insulina.

El problema al que nos enfrentamos actualmente es la función exacta del nucleotido en la transmisión del estímulo de la glucosa a la célula beta.

Turtle u Kipnis (1967) fueron los primeros en medir la concentración de AMPC en islotes de Langerhans aislados, utilizando una técnica propia. Encontraron que la teofilina, (metilxantina), que es un potente inhibidor competitivo de la fosfodiesterasa

aumenta la concentración de AMPc, estimulando la secreción de insulina en presencia de glucosa. En cambio la adrenalina inhibía casi completamente el efecto de la teofilina sobre el contenido en AMPc.

En 1971 Montague y Cook confirmaron el aumento de la concentración de AMPc por los inhibidores de la fosfodiesterasa (derivados de la metilxantina) y demostraron que la adrenalina y el diazóxido, inhibidores de la secreción de insulina, producen una disminución.

Es poco conocido el mecanismo exacto por el cual los nucleótidos pueden influenciar el proceso secretor.

Se sabe por estudios anteriores, que en la célula beta y en otros tipos de células de mamíferos los efectos del AMPc se pueden ejercer por la activación de una proteína quinasa-AMPc dependiente.

Los sustratos de la proteína quinasa en el islote se desconocen pero en otros tejidos se pueden incluir proteínas de los microtúbulos y proteínas específicas de granulos y membranas plasmáticas.

Por otra parte se sabe que la fosforilización de los componentes de las membranas del granulo y membrana plasmática en la exocitosis puede determinar una tasa de liberación hormonal. Ha sido descrita la fosforilización de las proteínas de membrana del granulo secretorio en varios tejidos secretores incluido el pancreas exocrino (Lambert et al 1974), medula adrenal (Trifaro 1972) y en pituitaria anterior (Labrie et al 1971).

En la pituitaria anterior, la fosforilización parece ser el resultado de la actividad de una proteinaquinasa presente en la fracción del granulo secretor.

Se ha demostrado que el AMPc estimula la fosforilización de proteínas presentes en fracciones de membranas plasmáticas aisladas de células adiposas (Chang et al 1974), pituitaria anterior (Lernay et al 1974) y eritrocitos (Guthrow et al 1972).

Lazarus y Davis (1975) han sugerido la posibilidad de un efecto del AMPc en la fosforilización de las proteínas de la membrana plasmática de islotes de Langerhans.

Estos mismos autores demostraron que fracciones de membranas procedentes de islotes de Langerhans contienen actividad proteinaquinasa dependiente del AMPc, lo cual favorece la fosforilización de proteínas específicas.

Estas observaciones nos sugieren que estas proteínas del granulo y membrana plástica de la célula beta sería el sustrato para la proteinaquinasa, lo cual estaría implicado en el proceso secretor.

Ahora empieza a ser considerada la posibilidad de que la proteína del microtúbulo de la célula beta pudiera ser el sustrato de la proteinaquinasa.

El papel de los microtúbulos en el mecanismo de liberación de insulina se ha propuesto en base a evidencias ultraestructurales y a los resultados experimentales con agentes tales como colchicina,

vinblastina H_2O (los cuales afectan la función de los microtúbulos en varios tejidos) que inhiben la secreción de insulina (Lacy et al 1968; Malaisse-Lagae et al 1971).

Los microtúbulos están formados por la polimerización de subunidades proteicas, tubulina, y en varios tipos de células la polimerización de los microtúbulos está en equilibrio dinámico con el pool de subunidades.

Montague y Howell (1976) sugieren que tanto el AMPc como el calcio pueden regular directa o indirectamente el equilibrio entre microtúbulos y sus subunidades en los islotes de Langerhans. El AMPc y el Ca^{2+} afectan a la polimerización del microtúbulo en otros tejidos (Gillespie 1974).

La posibilidad de que el efecto del AMPc en la función microtubular esté mediada a través de la fosforilización de la proteína microtubular ha sido considerada por Goodman et al (1971), aunque no se sabe si la fosforilización de las proteínas microtubulares influye en su tasa de polimerización o en su capacidad funcional.

Hay evidencias que sugieren que el AMPc estimula la salida de calcio desde organelos celulares a los que está unido el calcio fundamentalmente la mitocondria y de esto puede resultar un cambio rápido en la distribución intracelular de calcio en la célula beta. Esto podría jugar un importante papel en la regulación de la secreción de insulina.

Todo esto sugiere que el AMPc puede directamente afectar

las concentraciones de calcio en la célula beta, así como favorecer la fosforilización y actividad de otros componentes, los cuales pueden ser necesarios para el mantenimiento de una adecuada respuesta secretoria.

Se ha investigado la capacidad de la glucosa para aumentar los niveles de AMPc intracelular en islotes de Langerhans aislados. Los resultados obtenidos por los diferentes autores son contradictorios.

Hellman (1974) trabajando en islotes aislados de raton e incubados con concentraciones de glucosa, que estimulan la liberación de insulina, no se les modificaba sensiblemente el contenido celular en AMPc.

Kuo et al (1973), Howell y Montague (1973) Davis y Lazarus 1972, tampoco encontraron ningún efecto de la glucosa sobre la adenil ciclase aislada, ni Ashcroft et al (1972) Lazarus y Montague (1972) sobre la fosfodiesterasa de los islotes de Lagerhans.

Sin embargo Grill y Cerassi (1974) en islotes aislados de rata, incubados en las mismas condiciones de Hellman, presentaron un aumento precoz del contenido en AMPc.

Selawry et al (1973) demostraron que en el ayuno prolongado (48-72 horas), condición en la que el pancreas pierde su capacidad de ser estimulado por la glucosa, (Malaisse et al 1967; Grey et al 1970), disminuyen los niveles de AMPc en los islotes de Lagerhans.

Hedeskov y Capito (1974) han observado que los niveles

basales de AMPc cíclico son iguales en los islotes pancreáticos de animales ayunados y alimentados. Sin embargo, los primeros han perdido la capacidad de aumentar sus niveles de AMPc en respuesta a la glucosa al contrario de lo que sucede en los animales alimentados.

El problema al que nos enfrentamos actualmente no es el de saber si la glucosa estimula el AMPc insular, sino más bien, averiguar como lo hace y cual es la función exacta del nucleótido en la transmisión del estímulo de la glucosa a la célula beta.

¿Como actúa la glucosa sobre el nivel del AMPc de los islotes de Lagerhans?. Los datos de que disponemos actualmente no nos permiten elegir uno sino la asociación de varios, de los siguientes mecanismos posibles a) estimulación directa de la adenilciclase, b) aumento de un pool específico de ATP que serviría de sustrato para la ciclase, c) inhibición de las fosfodiesterasa.

Se ha intentado medir algunas de estas etapas pero ninguna puede ser eliminada actualmente (Holtel y Montague 1973).

De la misma manera no sabemos si la glucosa necesita ser metabolizada por los islotes a fin de estimular el sistema del AMPc ó bien si esta acción se transmite por el glucorreceptor.

Existe un gran paralelismo entre la capacidad de un azúcar para ser metabolizado por los islotes y el poder

que posee para estimular la síntesis del AMPc. Pero también es posible que estos azúcares actúen directamente sobre los receptores de la célula. La galactosa, por ejemplo, que no es metabolizada por los islotes de Langerhans potencia el efecto de la glucosa sobre el AMPc insular (Jarret y Keen 1968). Además que la acción inhibidora de la manohexulosa sobre el AMPc insular es casi inmediata, su efecto inhibitor sobre el metabolismo de la glucosa no se presenta más que tras un cierto plazo (Sehlin 1973) Cerasi y Grill en 1978 han demostrado que los niveles de AMPc insular se estimulan preferentemente por el alfaanómero de la D-glucosa (Grill y Cerasi 1975).

Este hecho va paralelo con la especificidad anomérica de la respuesta insulínica y contrasta con la falta de una preferencia anomérica en lo que concierne a la utilización de la glucosa.

Cerasi y Grill se inclinan aunque faltan argumentos directos, a pensar que la glucosa podría actuar por intermedio de un glucorreceptor sobre el sistema del AMPc insular.

Uno de los problemas esenciales para comprender el papel exacto que juega el AMPc en la secreción de insulina es el que se plantea tras las experiencias en las que el AMPc insular está elevado en presencia de glucosa, con inhibidores de la fosfodiesterasa ó con estimulantes de la adenil ciclasa, tales como la tóxima colérica (Cerasi

1975, Grodsky 1975 y Hellman 1974).

En tales condiciones, aunque la concentración del AMPc insular puede estar tan elevada como en el curso de las incubaciones con 27'7 mM de glucosa, la secreción de insulina persiste baja o resulta poco estimulada. Todo parece ocurrir como si la presencia de glucosa fuese necesaria para proporcionar las condiciones óptimas para la liberación de insulina. Pero si se aumenta la concentración de la glucosa, por ejemplo, en presencia de toxina colérica se observa que el AMPc se eleva aún más (Cerasi 1975).

Esta respuesta "suplementaria" del AMPc a la glucosa, en presencia de la toxina colérica o de concentraciones altas de IBMX (isobutilmetilxantina) muestra de nuevo la buena correlación con la liberación de insulina. Podría ocurrir que el AMPc de los islotes se halle distribuido en compartimientos (funcionales o anatómicos) y únicamente el comportamiento estimulado por la glucosa accede esencialmente a los mecanismos de liberación de la insulina. Cerasi (1975).

Otros hechos que sugieren una distribución de este tipo son los siguientes:

a) El ayuno impide la respuesta del AMPc insular a la glucosa; pero en cambio, la inhibición de la fosfodiesterasa aumenta los niveles de nucleótido de forma tan eficaz como en los islotes de los animales no sometidos al ayuno.

b) Los islotes del hamster chino diabetico muestra una respuesta deficitaria del AMPc a la glucosa, en cambio puede aumentarse notablemente el contenido del AMPc de estos islotes con el IBMX (isobutilmetilxantina).

c) Mientras que las catecolaminas son capaces de suprimir totalmente la respuesta del AMPc insular a la glucosa no pueden modular las respuestas del nucleotido al IBMX (isobutilmetilxantina) o a la toxina colérica (Rabinovitch, observaciones todavia inéditas).

Se han estudiado otros azúcares desde el punto de vista de su poder estimulante sobre la acumulación de AMPc insular. Solo la D-manosa se demostró capaz de estimular los islotes de Langerhans en ausencia de otro sustrato (Grill y Cerasi). Pero la sensibilidad del sistema del AMPc insular a la manosa es menor que frente a la glucosa precisando una concentración umbral más elevada.

Las respuestas tanto del AMPc como de la insulina, de los islotes incubados durante 60 minutos en presencia de 3'3 mM de glucosa de 6'6, 10'0 mM de manosa no difieren de la obtenida en ausencia de sustrato. Al asociar 6'6 mM de manosa y 3'3 mM de glucosa se observa un estímulo de la secreción tanto del AMPc como de la insulina.

Para Cerasi y Grill estos hallazgos indican que los azúcares pueden actuar de forma sinérgica sobre la acumulación del AMPc en los islotes de Langerhans. Este sinérgismo ha sido, también puesto de manifiesto para

la D-fructosa y la D-galactosa que, por sí mismas, carecen de poder estimulante pero actúan sinérgicamente con la D-glucosa.

Sin embargo estos últimos azúcares exigen concentraciones elevadas de ellos mismos o bien de D-glucosa para desencadenar respuestas por parte del AMPc y de la insulina.

La glucosamina y la manohéptulosa, inhibidores de la liberación de insulina bajo la influencia de la glucosa, inhiben igualmente el efecto de la glucosa sobre la acumulación del AMPc insular, cualquiera que sea la duración del proceso incubador durante su estudio. En el caso de la manohéptulosa se ha podido demostrar que esta inhibición es de tipo competitivo.

1.4) QUIMIOSENSIBILIDAD DE LA CELULA BETA

La célula beta no es solo sensible a la glucosa, sino que otros carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, cuerpos cetónicos, hormonas, etc. pueden actuar incluso a niveles considerados como fisiológicos.

Otros glicidos diferentes de la glucosa inducen también la secreción de insulina. La manosa es activa tanto sobre pancreas in vivo (Coore y Randle 1964) como sobre pancreas perfundido (Grotsky et al 1963).

El efecto de la manosa cuantitativamente es similar al de la glucosa.

La fructosa no provoca ningún cambio en la secreción de insulina en pancreas de rata (Matschinsky et al 1972) en concentraciones comprendidas entre 10 y 30 mM.

La galactosa 20 mM asociada con teofilina o con cafeina tiene una clara acción estimulante (Matschinsky et al 1972; Lambert et al 1969).

El xilitol no tiene efecto sobre la secreción de insulina del pancreas de rata (Matschinsky et al 1972).

La glucosamina tiene una débil acción estimulante de la secreción que se hace más intensa en presencia de teofilina (Matschinsky et al 1972).

En pancreas perfundido de rata, el piruvato no estimula la liberación de insulina ni modifica tampoco la

respuesta a la glucosa.

AMINOACIDOS

Hay determinados aminoácidos que estimulan la liberación de insulina y glucagon.

La capacidad insulino liberadora de cada aminoácido varia según la especie; en el hombre el más potente es la arginina seguido por la lisina y la leucina.

Es muy posible la existencia de glucorreceptores y aminoácido receptores comunes tanto a la célula beta como a la alfa (Pagliara et al 1974).

Una de las cuestiones a considerar es si la glucosa y la arginina ejercen sus efectos a través de un mecanismo comun. Varios trabajos (Basabe et al 1971; Malaisse 1973) así como nuestros resultados, indican que no.

La adición de arginina al medio de perfusión con glucosa 2'75mM provoca una liberación de insulina que excede al obtenido con glucosa sola.

La secreción del glucagon también sugiere que la glucosa y la arginina actuan por mecanismos diferentes en la célula alfa. Es evidente que la glucosa inhibe la secreción de glucagon mientras que la arginina lo estimula.

Estos resultados estan de acuerdo con la hipótesis sostenida por (Gerich et al 1974) aunque la glucosa y la arginina actuarían por un mecanismo diferente en cada tipo celular alfa ó beta. Así para estos autores

el Km de la arginina para la liberación del glucagon es de 2-4 mM que difiere frente al de liberación de insulina que es de 12-14 mM.

En el caso de la célula beta, la ocupación de un lugar aminoácido receptor no daría por resultado la liberación de insulina a menos que algun glucorreceptor estuviera también ocupado.

La ocupación de una alta proporción de glucorreceptores puede causar la liberación de insulina en ausencia de aminoácidos, pero no al revés. En contraste, en el caso de la célula alfa, ocupación de aminoácidosreceptores solo puede causar la liberación de glucagon, mientras que la ocupación de los glucorreceptores da por resultados un cambio conformacional en el aminoácido receptor que bloquea la liberación del glucagon.

Segun éste modelo la cantidad de cada hormona liberada depende de las concentraciones relativas tanto de glucosa como de aminoácidos.

En la pag. 27 se muestran los "lugares" o aminoácidos receptores por una hendidura presente en la superficie celular.

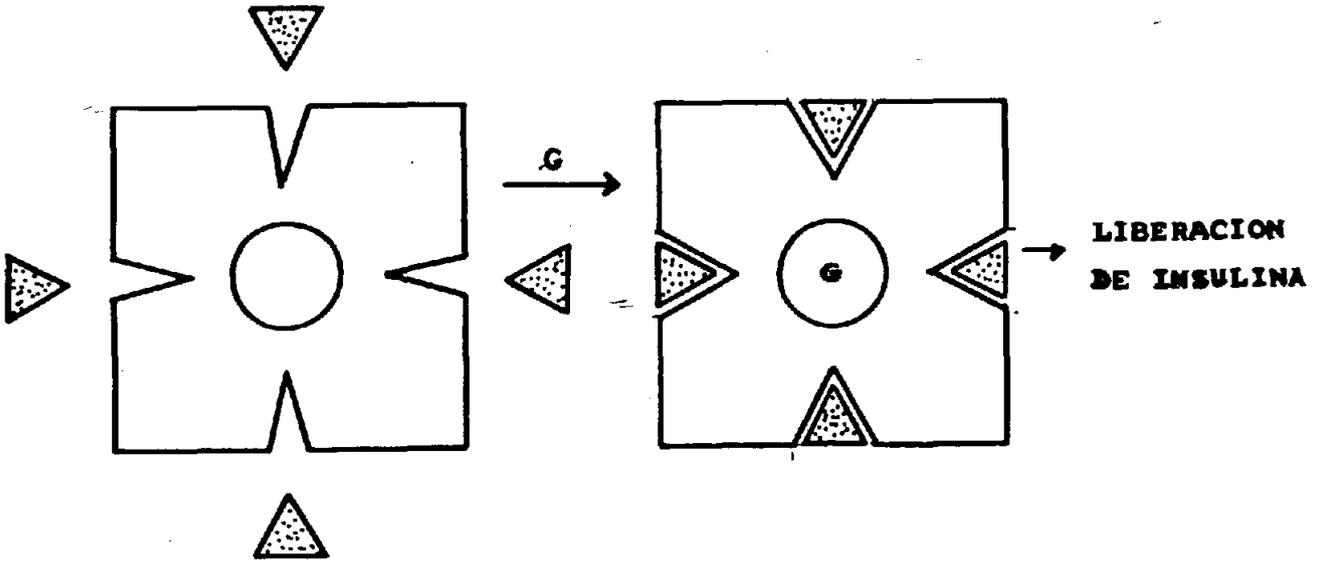
El glucorreceptor está representado por el círculo central. La molecula de glucosa la representamos por la abreviación G. Los aminoácidos aparecen como triangulos negros.

La glucosa al ponerse en contacto con la célula beta y

CELULA BETA

INACTIVA

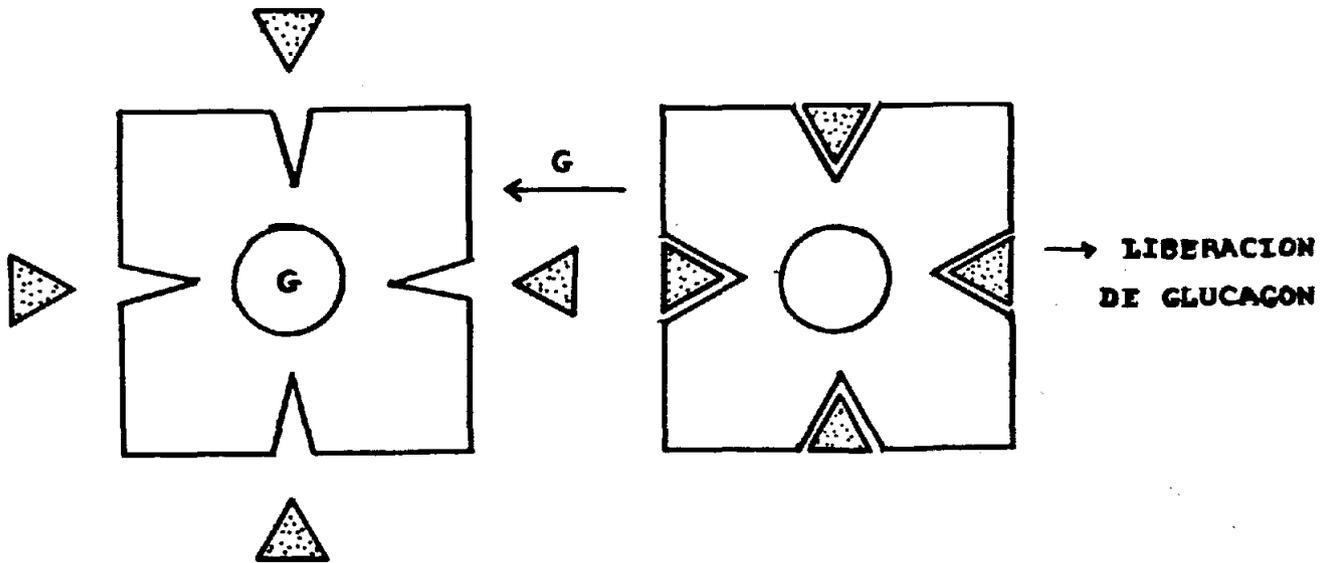
ACTIVADA



CELULA ALFA

INACTIVA

ACTIVADA



Activación e inhibición de aminoácido-receptores por glucosa en célula beta y alfa. (Pagliara et al 1974).

ocupar el glucorreceptor induciría un cambio conformacional en el aminoácido receptor, aumentando así su afinidad por el aminoácido correspondiente, que se uniría a su receptor y de éste modo se incrementaría la liberación de insulina.

Sin embargo en la célula alfa la ocupación del glucorreceptor, disminuye drásticamente la afinidad de los aminoácidos receptores.

La arginina es capaz de producir secreción de insulina en presencia de pequeñas cantidades de glucosa, tanto in vivo como in vitro (Fajans y Floyd, Levin et al 1972, Gerich et al 1974; Pagliara et al 1974. Laube et al 1970).

La arginina se comporta como potenciador de la acción insulino secretora de la glucosa; tiene un efecto potenciador mayor que la glucosa sola y no modifica la Km de la relación dosis-efecto entre glucosa e insulina (Gerich et al 1974; Hellerstrom et al 1970; Hellman et al 1971).

Es transportador a través de la membrana de la célula beta por un mecanismo saturable (transporte mediado por un carrier) que es capaz de conseguir un cociente de distribución (concentración interior/externa) mucho mayor que la unidad, no siendo afectado este proceso por la presencia de glucosa (Hellman et al 1971).

ACIDOS GRASOS Y CUERPOS CETONICOS.

También los lípidos pueden modificar la secreción de

insulina por la célula beta "in vitro" los ácidos grasos libres de cadena corta (propionato y oleato) así como los cuerpos cetónicos (acetoacetato y B hidroxibutirato) estimulan la secreción de insulina en presencia de concentraciones basales de glucosa.

Utilizando islotes aislados, Montague y Taylor (1968) demostraron el efecto estimulador del octanoato y Malaisse en 1968 con palmitato.

Goberna et al (1972-73) ha comunicado que la perfusión prolongada en el pancreas aislado con palmitato y acetoacetato con glucosa (5.5 mM) produce un incremento significativo de la secreción de insulina.

El hecho de que el palmitato BOH-butirato y acetoacetato no produzcan un aumento de la secreción de la insulina en ausencia de glucosa parece indicar que el mecanismo estimulador es dependiente de la glucosa (Goberna).

El B hidroxibutirato (7 mM) estimula también la célula beta aunque su acción es menor que la del palmitato de albúmina.

La función que pudieran llevar a cabo estos metabolitos en la regulación fisiológica de la liberación de insulina requiere nuevas investigaciones. Es posible que su función sea asegurar durante el ayuno prolongado una liberación mínima de insulina capaz de evitar la gravedad de la cetoacidosis.

HORMONAS.

También hay hormonas que intervienen en la regulación de la secreción de insulina, bien por un mecanismo directo o indirecto. Gran parte de los trabajos publicados al respecto están realizados con dosis farmacológicas siendo cuestionable por tanto la validez de los resultados obtenidos desde un punto de vista fisiológico.

Entre las hormonas inhibidoras de la secreción de insulina cabe destacar la somatoestatina (tetradecapeptido) cuya inhibición es tanto "in vivo" como "in vitro" (Alberti et al 1973, Koerker et al 1974, Johson et al 1975, Tamarit et al 1974).

Se ha propuesto que los efectos de la somatostatina sobre la inhibición de la liberación de la insulina están relacionados con una alteración en la manipulación de o la respuesta de calcio. Esta hipótesis es compatible con la amplia acción inhibidora de la somatostatina sobre la liberación hormonal y con el papel del calcio mensajero celular en varias células secretoras.

El hecho de que las células D de los islotes de Lagerhans contienen somatoestatina (Luft et al 1974, Patel et al 1975) y la secreten (Orci et al 1975) así como para muchas hormonas sus niveles fisiológicos circulantes son de 2ng/ml, no es extraño suponer que la somatostatina tenga un papel regulador a nivel de los islotes de Langerhans.

Kuo et al (1973) demostró que la hormona adrenocorticotropa (ACTH) estimula la adenil ciclasa de islotes de Langerhans.

Ha quedado bien demostrado que el sistema adenilciclasa puede mediar variando los niveles intracelulares de AMPc la acción moduladora de algunas hormonas sobre la secreción de insulina.

Las hormonas tiroideas T3 y T4 carecen de efecto sobre los islotes.

La calcitonina cuya función es disminuir los niveles de calcio en sangre es capaz de inhibir la segunda fase de la secreción de insulina mediada por la glucosa siendo bastante verosímil que este efecto inhibitor se deba a la acción de esta hormona sobre el calcio (Tamarit et al 1976)

En ausencia de calcio extracelular se anula la secreción de insulina mediada por glucosa y otros agentes insulínotropos "in vitro". Altas concentraciones extracelulares de calcio favorecen la acumulación de este cation en el citosol, disparando finalmente la respuesta secretoria.

También las hormonas gastrointestinales intervienen en la secreción de insulina (Goberna et al 1971, Goberna 1972).

La pancreozimina es la acción más potente y estimula la secreción de insulina y glucagon (Fussganger et al 1969).

El octapeptido terminal sintético de la pancreozimina tiene la misma acción que la molécula intacta (Pfeiffer et al 1973).

La administración de glucosa o aminoácidos por vía oral, producen una liberación de insulina mucho mayor que cuando se administra por vía intravenosa. Se debe a que estas sustancias al ponerse en contacto con la mucosa intestinal provocan la liberación, por parte de esta de una o varias hormonas gastrointestinales y que por vía hemática llegarían a la célula beta incrementando su secreción de insulina (McIntyre et al 1964, McIntyre et al 1965).

Las hormonas esteroideas no tienen una acción directa sobre la función del islote.

Después de un tratamiento prolongado con esteroides en animales los islotes de Langerhans presentan una hipertrofia. Si a estos animales se les provoca la secreción con una sobrecarga de glucosa responden con un hiperinsulinismo (Goberna et al 1971, Marco et al 1968).

La serotonina presente en los granulos de los islotes de Langerhans, es un inhibidor de la secreción de insulina tanto "in vitro" como "in vivo" (Tamarit et al 1974). La 5 HT es una sustancia que estimula la contracción de los musculos de fibra lisa y si tuviera el mismo efecto en la célula beta la contracción de las mallas filamentosa podría constituir un obstáculo para la secreción.

Las prostaglandinas también intervienen en la secreción de insulina. Se desconoce si su mecanismo de actuación es directo, a través de la liberación de AMPc o indirecto por la liberación de cateolaminas.

El sistema nervioso simpático y parasimpático también interviene en la regulación de la célula beta. Hay terminaciones adrenérgicas y colinérgicas alrededor del islote de Langerhans. Las catecolaminas adrenalina y noradrenalina son inhibidoras de la secreción de insulina (Cerasi et al 1972, Loubatieres et al 1970, Lernmark et al 1970).

La adrenalina que aumenta los niveles de AMPc en los adipocitos (Sobrino 1977), los disminuye a nivel insular.

Brisson y Malaisse (1973) estudiando el efecto de la adrenalina sobre el metabolismo del calcio concluyen que la adrenalina facilita el transporte de Ca^{45} hacia el exterior, efecto contrario al de la glucosa y produce un desplazamiento del calcio intracelular desde el citoplasma hasta un sitio de depósito.

Estos hechos explican la acción inhibidora de la adrenalina sobre la secreción de insulina.

Sin embargo Hellman et al (1974) han demostrado que tanto la adrenalina como la omisión del calcio del medio extracelular inhiben la oxidación de la glucosa de la célula beta y producen un acúmulo de fructosa 1-6 difosfato, además de inhibir la secreción de insulina.

La acetil colina incrementa la secreción de insulina, anulándose este efecto por la atropina Kuo et al (1973) demuestran que la adenilciclase aislada de islotes de Langerhans de rata es estimulada por la acetilcolina. En nuestro modelo de perfusión de páncreas aislado y por

lo tanto denervado la célula beta sigue respondiendo normalmente a los distintos estímulos tanto excitadores como inhibidores, lo cual no esclarece la acción fisiológica que "in vivo" puede representar el sistema nervioso simpático y parasimpático.

FARMACOS.

La alloxana y la estreptozotocina provocan una lesión irreversible de la célula beta, pudiéndose conseguir así una diabetes experimental (Goberna et al 1975).

El diazóxido inhibe la secreción y no la síntesis (Levin 1972)

Se ha establecido firmemente que las sulfonilureas aumentan la secreción de insulina por el páncreas (Loubatieres 1968, Yalow et al 1960). Estudios realizados "in vivo" permitieron demostrar que sulfonil ureas como la tobultamina actúan sinérgicamente con la glucosa siendo este sinérgismo más marcado con concentraciones medianamente estimulantes del azúcar (Malaisse et al 1970, Goberna et al 1969, Lucas 1975).

A nivel molecular el mecanismo de acción de la sulfonilureas no se conoce.

Hay datos de que pueden actuar sin atravesar la membrana de la célula beta (Hellman et al 1971).

Varios estudios sugieren que las sulfonilureas podrían aumentar el nivel insular de AMPc.

Este efecto se amplifica por un inhibidor de la fosfodiesterasa, lo que hace pensar que la sulfamida no actúa por inhibición de éste enzima en los islotes de

Langerhans intactos.

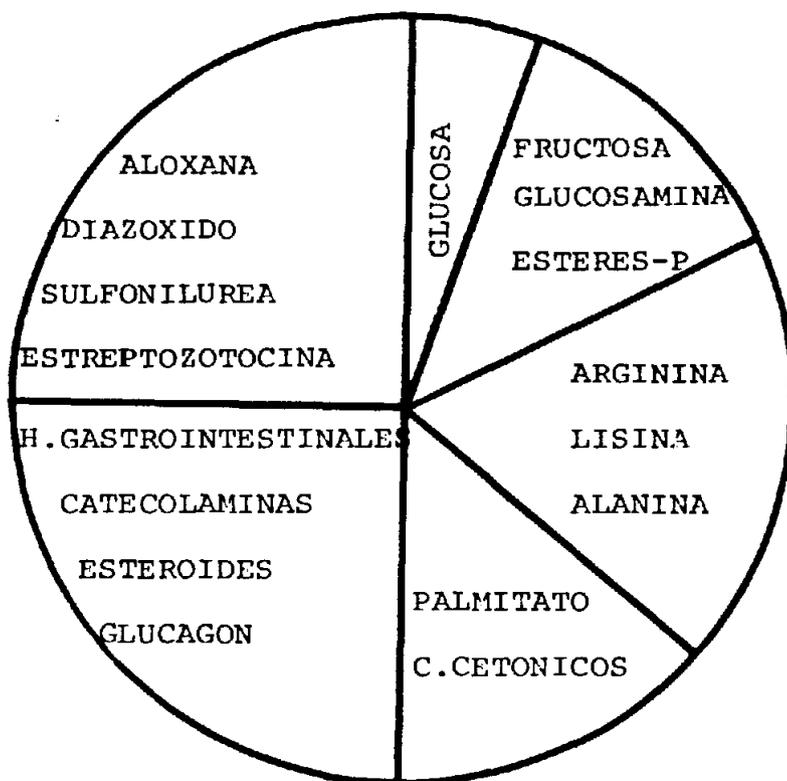
Como la glucosa a altas concentraciones suprime el efecto de la sulfonilureas sobre el AMPc insular, se podría suponer que el fármaco entra en competición a nivel del lugar donde la hexosa desarrolla su acción.

Para las sulfonilureas también parece existir un gran paralelismo entre los cambios del nivel de AMPc insular y la secreción de insulina.

MODIFICADORES NATURALES

SUBSTANCIAS CALORIGENICAS

Y ARTIFICIALES



CELULA BETA

La celula beta no solo es sensible a la glucosa; otras sustancias calorigenicas (lipidos y aminoacidos) asi como hormonas y determinados farmacos, pueden modificar su propia secrecion (Goberna 1978)

1.5) SISTEMA DE ACOPLAMIENTO ENTRE LOS MECANISMO SENSITIVOS Y LOS DE DESCARGA.

Está establecido que la ausencia de Ca^{2+} extracelular anula la secreción de insulina mediada por glucosa y otros agentes insulínotropos "in vitro".

La glucosa y la teofilina se sabe que afectan a la entrada neta o a la distribución intracelular del calcio en la célula beta, agudizan la secreción de insulina inducida por el Ca^{2+} . Cantidades del orden de 2'7 mM de glucosa son suficientes para aumentar la liberación de insulina inducida por el Ca^{++} . La exposición del páncreas a somatostatina retarda significativamente la respuesta secretoria al calcio (Curry et al 1974).

El citochalasin B potencia la liberación de insulina provocada por el Ca^{2+} (12 mM) y hace descender el umbral de concentración de calcio requerido para estimular la secreción (Van Obberghen et al 1973).

Estos datos sugieren que altas concentraciones de Ca^{2+} extracelular pueden incrementar suficientemente la cantidad de Ca^{2+} acumulando en el citosol de la célula beta hasta disparar eventualmente la liberación de insulina (Devis, et al 1977).

En las células hay varios compartimentos para el calcio y con niveles distintos. Así en la membrana interna de la mitocondria por un proceso alternativo de la fosforilización oxidativa, se pone en marcha un sistema

de transporte activo capaz de almacenar Ca^{++} intramitocondrial.

Es probable que en el proceso de liberación de insulina inducida por el calcio, la velocidad de entrada del Ca^{2+} en la célula beta juegue un papel crítico.

Apoya esta última hipótesis el hecho de que la liberación de insulina inducida por el calcio queda inhibida por altas concentraciones extracelulares de Mg^{+2} .

Malaisse et al 1976 demostraron que el magnesio es un inhibidor potente de la entrada de Ca^{++} en la célula beta, probablemente por competencia con el calcio por un sistema transportador de cationes común localizado en la membrana plasmática de la célula beta.

El antagonista orgánico del calcio verapamil también inhibe la liberación de insulina inducida por el Ca^{++} .

Así es posible que el calcio entre en la célula beta mediante la intervención de un sistema ionofórico nativo que, como el ionóforo exógeno A23187, puede actuar en virtud de lugares de binding del calcio sensibles al verapamil (Sommers et al 1976). En efecto, el verapamil inhibe la capacidad del ionóforo A23187 de provocar la translocación del calcio de los sistemas ionofóricos nativos localizados en la membrana plasmática de la célula beta y, al hacer esto, inhibir la entrada de calcio en la célula beta.

Varios autores han propuesto que los efectos de la somatostatina sobre la liberación de la hormona están

relacionados con una alteración en la manipulación de ó la respuesta al calcio. (Curry et al 1974, Bhatena et al 1976). Esta hipótesis es compatible con la amplia acción inhibidora de la somatostatina sobre la liberación hormonal (Brazeau et al 1973), Curry et al 1974) y con él el papel del calcio como mensajero celular en varias células secretoras (Rasmussen et al 1970). La exposición del páncreas a la somatoestatina retarda significativamente la respuesta secretora al calcio. Recientemente se ha demostrado que la somatostatina (2,ug/ml) reduce significativamente la entrada de Ca^{45+2} por islotes aislados inducida por la glucosa (Bhatena et al 1976).

La potenciación que ejerce la glucosa sobre la liberación de insulina inducida por el calcio es compatible con el hecho de que esta hexosa aumenta la entrada neta de calcio por la célula beta. Devis et al (1977) han demostrado que a una concentración de 2'7 mmol/l de glucosa era suficiente para aumentar la liberación de insulina inducida por el calcio y parece sugerir que este azúcar es capaz de afectar la manipulación del calcio aun cuando esté usado a concentraciones muy por debajo de las normalmente requeridas para estimular la liberación de insulina. Esto no es extraño ya que la velocidad de glucolisis, que ejerce un fuerte control sobre la entrada neta del calcio por la célula beta, (Sener et al 1976) es en efecto mayor en presencia de glucosa 2'7mmol/l que en ausencia de ésta.

1) Para Milner y Hales (1970) la secreción de insulina puede ser desencadenada el último término por un aumento de la incorporación de calcio por la célula beta, mediado por un sistema de transporte dependiente de la concentración intracelular de sodio.

2) Malaisse-Lagae y Malaisse (1971) estudiaron el efecto de la concentración de glucosa sobre la captación de Ca^{45} por islotes aislados. Demostraron que la captación del calcio aumentaba según una curva sigmoide al aumentar la concentración de glucosa, siendo inhibida por muchos de los inhibidores de la secreción de insulina (adrenalina, 2 deoxiglucosa, manoheptulosa, etc.).

3) Malaisse (1973) basándose en la analogía entre el acoplamiento excitación contracción en el músculo, y estímulo secreción en la célula beta, supone que la contractilidad de un sistema microtubular-microfilamentoso depende de la acumulación del calcio en el citoplasma de la célula beta.

Malaisse ha confirmado experimentalmente que la glucosa provoca una acumulación de iones de calcio. Este proceso depende de la integridad del metabolismo de la célula beta puesto que se trata de un proceso activo, que requiere energía y se interpreta por activación de una bomba de sodio calcio dependiente situada en la membrana.

El AMPc según el autor mencionado, estimula la salida de calcio vacuolar (mitocondrias o vesículas del retículo

endoplasmático) al protoplasma por lo cual refuerza el aumento de calcio en el citoplasma de fosfodiesterasa aumentan el contenido de AMPc de la célula beta Hellman et al(1975), por ello, pueden causar una redistribución de los iones de calcio dentro de la célula beta. Ya que el AMPc se sabe que inhibe la toma neta de Ca^{2+} por fracciones particuladas de la célula beta, Howell et al 1975, Devis et al 1977, sugieren que la habilidad de las mitocondrias y otros organelos para almacenar cationes divalentes juegan un importante papel contraregulador en la modulación de la magnitud de la respuesta secretora al Ca^{+2} .

El calcio podría ser el eslabon de unión entre la estimulación y la secreción en una gran variedad de tejidos y las concentraciones de calcio citosólico pueden en parte determinar una determinada tasa de secreción (Rubin 1970).

En la célula beta ha sido propuesto que la glucosa incrementa los niveles de calcio citosólico y de ésta forma la tasa de liberación por inhibición de la salida de calcio desde la célula. Sin embargo el efecto de la glucosa sobre los niveles de calcio intracelular no parece ser por si mismo suficiente para estimular la liberación ya que la respuesta secretoria a la glucosa también depende de la presencia de una adecuada concentración de AMPc(Montague and Howell 1975).

La glucosa puede disminuir el flujo de calcio al exterior

de la célula (Malaisse 1973) por inhibición de la hipotética bomba de calcio de la membrana plasmática y por aumentar la unión del calcio libre citosólico a proteínas.

Tomada en su totalidad, los datos presentes son compatibles con la idea de que una elevación en la concentración extracelular de calcio, por incremento de la entrada de Ca^{+2} y/o inhibición de la salida del mismo, provoca una acumulación de Ca^{+2} en la célula beta suficiente para estimular la liberación de insulina. Se ha propuesto que la acumulación de Ca^{+2} en el citosol dispara la secreción de insulina por activación de un sistema efector microtubular-microfilamentoso responsable de la exocitosis de gránulos secretorios. Los hallazgos con citocalasina B refuerzan este concepto, ya que la liberación de insulina inducida por el calcio es aumentada por este metabolito. Como se ha indicado en el caso de la secreción de insulina inducida por glucosa o por leucina, Obberghen et al 1973, la citocalasina B no solo potencia la respuesta secretora de estos secretagogos sino que también disminuye el umbral de concentración en el cual estos agentes insulínotropicos pueden provocar la respuesta de insulina. El metabolito fungico puede así sensibilizar la respuesta del sistema efector a concentraciones sub-umbrales de calcio citosólico.

En general se considera al calcio como un disparador de

la maquinaria que controla la exocitosis de los granulos secretorios, cualquiera que sea el agente usado, para estimular la liberación de insulina.



1.6) EMIOCITOSIS

Teorías de la secreción de insulina.

El principal mecanismo de la secreción de insulina parece ser la emiocitosis (también llamada exocitosis) de granulos almacenados preformados (Lacy 1975, Orci et al 1973).

La insulina sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso, es acumulada en su interior y transportada luego al aparato de Golgi en microvesículas extraídas del retículo endoplásmico rugoso (Penold 1970, Howell 1969).

En el aparato de Golgi la proinsulina es escindida en insulina y almacenada entonces dentro de los granulos que maduran y adquieren zinc, así como una densidad electrónica. En respuesta a un estímulo como la glucosa, los granos sufren la emiocitosis.

Los granos se mueven hacia la periferia de la célula y funden las membranas con la membrana plasmática liberando su contenido hormonal que pronto se desintegra en el espacio extracelular.

La emiocitosis se ha establecido como un mecanismo de secreción de insulina por el estudio de tejidos fijados (Lacy 1970) tanto como la observación directa de la liberación de los gránulos en la célula viva bajo el microscopio de contraste de fases (Lacy et al 1975). La secreción de insulina es proporcional al número de

microvillis emiocitócicos vistos por el microscopio electrónico de barrido (Scanning) (Lacy 1970).

Aunque no han sido probados son posibles otros mecanismos de liberación de insulina. A pesar de todo, la emiocitosis parece ser el más importante mecanismo de liberación de la insulina.

SEMEJANZA ENTRE LA SECRECIÓN DE INSULINA Y LA CONTRACCIÓN MUSCULAR.

Se sugiere un parecido entre la emiocitosis y la contracción muscular por tres hallazgos: a) es necesaria energía (ATP) (Renold 1970, Malaisse et al 1967, Babad et al 1967).

b) Ocurre una despolarización concomitante de la membrana celular (Dean y Matthews 1969) c) hay un requerimiento de calcio extracelular (Grodsky 1972).

Esto llevó al concepto de "conexión estímulo secreción" de la liberación de hormona, análogo a la "conexión excitación contracción" en el músculo (Douglas 1968). La despolarización de la membrana celular (excitación) causa la liberación de calcio dentro del músculo, resultando la hidrólisis del ATP y la contracción de la actomiosina.

La observación directa de los gránulos en células B cultivadas (Lacy et al 1975, Kanazawa et al 1976, Malaisse et al 1975) apoyan el concepto de que la liberación de los gránulos es un proceso activo. El movimiento de los gránulos está caracterizado por

pequeños saltos en una sola dirección (movimiento saltatorio) con velocidad media de $1.5 \mu\text{m}/\text{seg}$. El estímulo secretor aumenta y el inhibidor disminuye el movimiento de los gránulos, el cual requiere calcio. Estos hechos lo hacen muy distinto del movimiento browniano (movimiento térmico al azar) aunque éste no puede ser completamente excluido puesto que los descensos locales en la viscosidad del citoplasma pueden aumentar el movimiento browniano (Rebhun 1972).

Se han identificado en los islotes de Langerhans y en otros tejidos (no necesariamente secretores) proteínas contráctiles que se requieren con la secreción.

El término contractil no implica que las proteínas se acorten por sí solas, se piensa que los elementos contráctiles se deslizan unos sobre otros para producir el movimiento (Huxley 1969, Satir 1974).

En la célula beta se encuentran dos grandes sistemas morfológicos con potencial para generar movimiento: los microtúbulos y los microfilamentos.

SISTEMA MICROTUBULAR MICROFILAMENTOSO

Por dentro de la membrana de la célula beta se encuentra una malla microfilamentosa unida de alguna manera a la membrana plasmática que forma una zona de exclusión de la que están ausentes estructuras citoplásmicas distintas de los gránulos ribosomas y vesículas de pinocitosis.

Por dentro encontramos los microtúbulos a los que Lacy et al (1978) atribuyeron la función de translocación

de los gránulos secretorios y su extrusión durante la emiocitosis, sin embargo los microtúbulos nunca se ven en contacto con la membrana y terminan en la malla filamentosa (Orci et al 1974). No se conoce la función de la malla microfilamentosa pero su aspecto tiene la apariencia de una estructura contractil que pudiera ser barrera o un efector de la emiocitosis.

MICROTUBULOS.

Los microtúbulos son estructuras de 24 nm de diámetro que están localizados en los tejidos animales tanto durante la interfase como en la mitosis (Olmsted and Borisy 1973).

Aunque el interior del microtúbulo está hueco, no hay evidencia de transporte en su interior de sustancias o gránulos. Más bien, los microtúbulos son considerados como elementos estructurales. Muchas evidencias indirectas implican a los microtúbulos en la liberación de insulina. La colchicina que rompe los microtúbulos en varias subunidades inhibe in vitro, la liberación de insulina a concentraciones de 10^{-3} a 10^{-6} M (Lacy et al 1968, Lacy et al 1972).

Otros inhibidores de los microtúbulos como la vimblastina (10^{-4} M) (Lacy 1972) y la vincristina (10^{-5} M) (Malaisse 1971) también inhiben la secreción.

Estabilizadores de los microtúbulos tales como deuterio al 100 %, hexilen glicol al 1 % y etanol al 1 % que se piensa inhiben la función de los microtúbulos, también

reducen la secreción de insulina (Malaisse 1971).

El efecto inhibitor de los estabilizadores de los microtúbulos está presente minutos después de su adición, pero el efecto de la colchicina y de la vincristina requiere un periodo de preincubación. Esto precisa una unión de la colchicina a las proteínas de los microtúbulos endógenos en las células de carcinoma (Taylor 1965) y sugiere que la inhibición de la secreción por la colchicina está mediada por un efecto sobre los microtúbulos.

En los islotes de Langerhans la unión de la colchicina a la tubulina va paralela a la inhibición de la última fase de la liberación de insulina y la desaparición cualitativa de microtúbulos va unida a la disminución de la secreción de insulina producida por la vincristina (Malaisse-Lagae et al 1971).

El ratón spiny que muestra una adecuada liberación de insulina después de un estímulo con glucosa, tiene poca proteína en los microtúbulos de las células de los islotes de Langerhans cuando se comparan con varias ratas y ratones controles (Malaisse-Lagae et al 1973).

Sin embargo hay varias evidencias que arrojan al menos alguna duda sobre la hipótesis de la secreción por los microtúbulos. La colchicina a 5×10^{-8} M es suficiente para un bloqueo completo de la mitosis en células en cultivo KB (Taylor 1965) mientras que al ser usada a

10^{-6} M inhibe parcialmente la secreción de insulina en islotes de rata (Lacy 1968).

Además se ha encontrado que concentraciones de 10^{-3} a 10^{-4} M no inhibían la fase primera de la liberación de insulina, mientras que la vimblastina (10^{-4} M) bloquea ambas fases.

Pequeñas exposiciones a colchicina 2×10^{-5} M pueden estimular significativamente ambas fases de la liberación de insulina (Somers et al 1974). La colchicina también tiene sobre las células efectos no tubulina dependientes. A una concentración de 6×10^{-5} M (la mitad del efecto máximo) se inhibe el transporte de nucleosidos en una variedad de células de mamíferos (Mizel 1972). Esto no puede atribuirse a un efecto sobre los microtúbulos debido a que la lumicolchina, un metabolito que no se une a la tubulina, también inhibe el transporte de nucleótidos y además porque el efecto no depende de la temperatura, como ocurre con el "binding" de la colchicina a la tubulina.

A una concentración de colchicina de 10^{-3} M, la captación de glucosa y la oxidación son inhibidas en un 34 % en "ghosts" de adipocitos (Cheng et al 1975).

La vincristina (10^{-5} M) reduce la síntesis de proteínas en los islotes de rata en un 30 % sobre el minuto 180 de incubación (Malaisse, et al 1971). La colchicina (10^{-4} M) provoca una reducción de aproximadamente el 50 % en la actividad aldosa reductasa y hexonato deshidrogenasa de

los islotes de rata (Gabbay et al 1972).

Indicios de la función de los microtúbulos en la célula beta se encontraron en otros tejidos.

El orden de los microtúbulos en los cilios produce un movimiento ondulante por deslizamiento de unos sobre otros. Sin embargo los microtúbulos en la célula beta no están a menudo en grupos y parece probable que mientras que los microtúbulos son necesarios para la secreción de insulina, no parece que ellos generen ese movimiento por un mecanismo de deslizamiento de los filamentos.

Los microtúbulos están compuestos por subunidades diméricas de 120.000 de Pm conocidas como tubulina (Olmsted and Borisy 1973). Las subunidades, pero no los microtúbulos ligan la colchicina.

Los microtúbulos y las subunidades existen en los tejidos en equilibrio.

En los islotes de rata, aproximadamente el 30 % de la tubulina está polimerizada, en el estado basal (Pipeleers et al 1976). La glucosa y la teofilina son capaces de aumentar el grado de polimerización de la tubulina de la célula beta, cuando se incuban los islotes in vitro. La inanición disminuye y la alimentación con glucosa aumenta la cantidad y extensión de la polimerización de la tubulina en islotes aislados de rata (Pipeleers et al 1976). Estos resultados no son inesperados ya que el tratamiento de las células con dibutiril AMPc aumenta la polimerización de las

subunidades de los microtúbulos bajo algunas condiciones (Rubin and Weiss 1975).

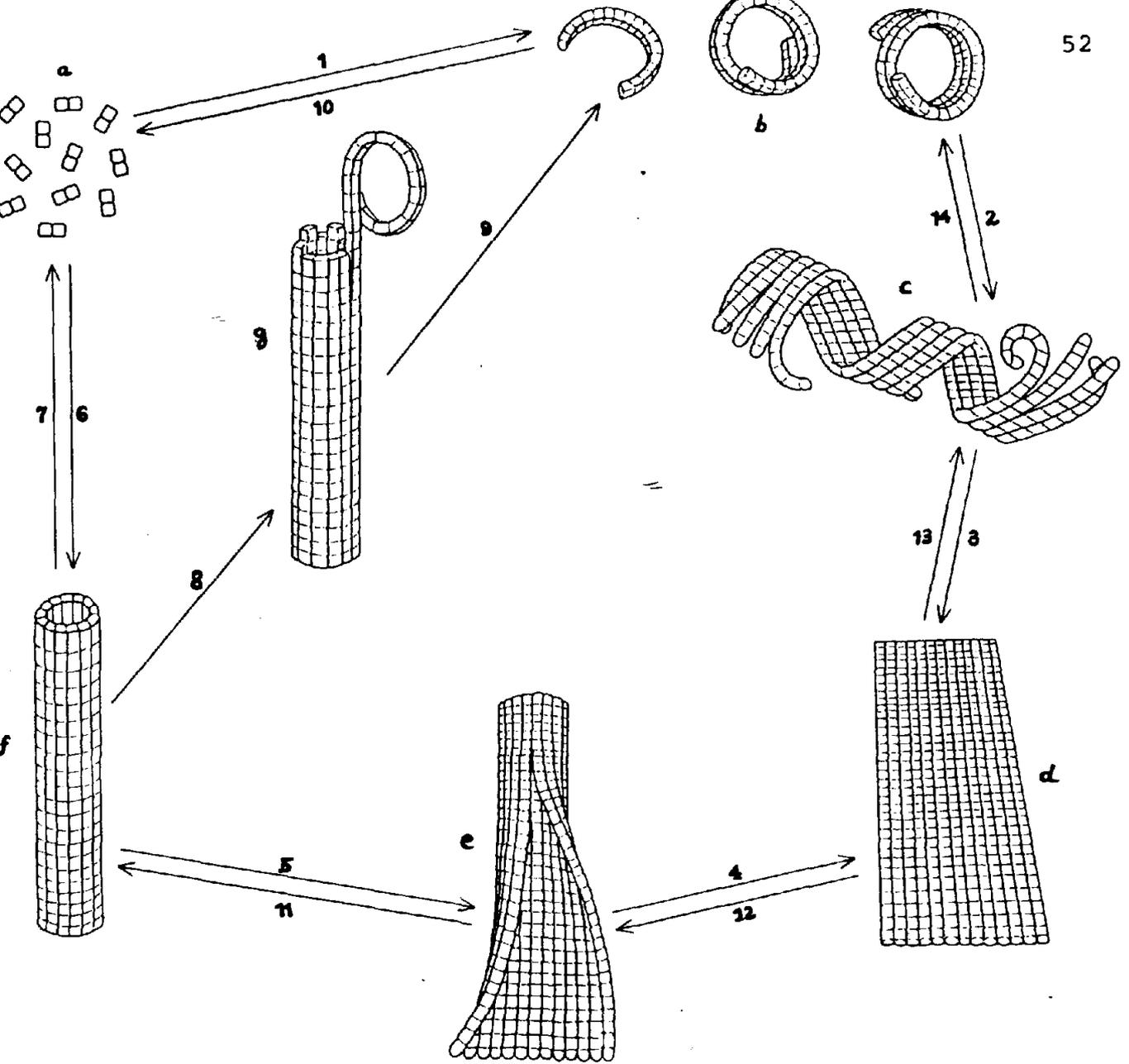
La relación del calcio con los microtúbulos in vivo no está clara.

El Ca^{++} previene la unión de los microtúbulos en vitro (Rosenfeld et al 1976) pero la entrada de calcio durante la secreción de insulina no está asociada con la despolarización de los microtúbulos (Pipeleers 1976) y el calcio extracelular parece promover la polimerización de los microtúbulos en otros cortes de tejidos (Gillespie 1971).

Los microtúbulos contienen otros componentes además de la tubulina. Estas proteínas asociadas a los microtúbulos 8 MAPs pueden llegar a ser el 20 % de las proteínas de los microtúbulos. (Sloboda 1975). Son componentes de alto Pm parecidos a la dyneina una proteína ATP-ásica generadora de fuerza encontrada en el flagelo (Gaskim et al 1974), (Summers and Gibbons 1971).

Las MAPs son centros de nucleación para la formación de los microtúbulos se sugiere que las MAPs serian el eslabon crítico de la asociación entre los gránulos de secreción y los microtúbulos.

Estudios morfológicos de la célula beta del ratón no han demostrado una asociación entre los microtúbulos y los gránulos de secreción por encima de lo esperado por el simple azar, (Sommers et al 1974).



CICLO DE FORMACION Y DESINTEGRACION DEL MICROTUBULO.

La obtención fácil y abundante de tubulina con capacidad de polimerizar, y la posibilidad de destruir los microtúbulos formados, ha ayudado a entender el mecanismo de ensamblaje de la tubulina en microtúbulos. Las fases de éste aparecen esquematizados (a) tubulina; (b) filamentos enroscados, formando anillo; (c) lámina helicoidal; (d) lámina plana; (e) lámina plagada; (f) microtúbulo; (g) microtúbulo en proceso de desintegración. La formación del microtúbulo a partir de la tubulina es el resultado de la polimerización de esta proteína en filamentos (1) y del subsiguiente ordenamiento lateral de estos (2 a 5). El microtúbulo puede desintegrarse a filamentos (8 y 9) en unidades de tubulina (6). Esquema hecho a partir de los modelos de Kirschner y Erickson.

MICROFILAMENTOS.

Los microfilamentos tienen de 4 a 8 nm y son estructuras presentes en la célula beta, tanto en formación paralela en mallas (Wessels et al 1971). Se piensa que los microfilamentos están hechos de actina por la similitud morfológica con el filamento delgado del músculo. La actina ha sido identificada inmunológicamente en islotes cultivados (Gabbiani et al 1974).

La cytochalasina B, metabolito fungico rompe algunos tipos de microfilamentos cuando se añade el medio de incubación de células in vitro y esto sugiere un mecanismo de acción para inhibir la motilidad y la división celular. La cytochalasina B aumenta la secreción de insulina en islotes de rata a concentraciones de 10^{-5} M aunque dosis mayores pueden inhibirla (Lacy et al 1973, Van Obberghen et al 1973).

1.7) OBJETIVO.

En el momento actual desconocemos si es la glucosa misma o algunos de sus metabolitos el disparador que pone en marcha el mecanismo de secreción de la insulina.

La célula beta es capaz de responder, a concentraciones crecientes de glucosa aumentando la secreción.

La dificultad de conocer el mecanismo de secreción se basa en el hecho de que la glucosa además de ser la señal que pone en marcha el mecanismo, es metabolizada en la célula beta.

Hay evidencias que orientan a considerar el metabolismo de la glucosa como el desencadenante de la secreción. Otras encambio hacen pensar en la existencia de un glucorreceptor o glucosensor que al unirse a la glucosa dispararía el mecanismo de secreción.

Este glucosensor determinaría la afinidad de la glucosa con el mecanismo responsable de la secreción de insulina.

La afinidad glucosa-receptor o glucosa transportador, podría modificarse en algunas circunstancias, tales como el ayuno.

El ayuno resulta un modelo experimental de gran interés, porque bloquea el mecanismo antes citado de secreción de la célula beta.

Valiéndose del modelo experimental que supone el ayuno y utilizando técnicas experimentales como el páncreas aislado y perfundido de rata, el objetivo de este trabajo es el

estudio del mecanismo de secreción de la célula beta desde un punto de vista bioquímico.

2º MATERIAL Y METODOS.

2.1) ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Hemos utilizado ratas machos wistar-albino, con un peso comprendido entre 270 y 300 grs. correspondiente a unas 10 semanas de edad. Las ratas están sometidas a una dieta standard cuya composición se detalla en la pagina siguiente. La anestesia la realizamos con pentobarbital sódico inyectado intraperitonealmente a la dosis de 4 mgs/100 gr de peso, quedando anestesiada la rata a los pocos minutos y el efecto dura aproximadamente unas dos horas.

El tiempo de duración de la intervención para el aislamiento del pancreas depende del entrenamiento adquirido por el operador. En nuestro caso la duración aproximada de la extracción del pancreas con el marco duodenal es de 30 minutos

2.2) DESCRIPCION DE LA TECNICA OPERATORIA

Se han descrito dos métodos fundamentales de perfusión. El primero de los modelos, descrito por ANDERSON y LONG en 1947 incluye pancreas, estómago y duodeno. En esta preparación se perfunde una considerable masa de tejido extrapancreático correspondiente al lecho vascular del tronco celíaco. Este modelo ha sido perfeccionado y ampliamente utilizado posteriormente por GRODSKY et al 1963. El otro modelo fué descrito por SUSSMAN et al en 1966, en una preparación que incluye pancreas y duodeno. Más tarde LOUBATIERES 1968.

CONTENIDO EN PRINCIPIOS NUTRITIVOS, MINERALES Y VITAMINAS DEL
PIENSO SANDERS PARA RATAS DE LABORATORIO ("SANDERSMUS")

Proteína Bruta	:	19	%
Grasa Bruta	:	3,5	%
Unidades Alimenticias	:	102	%
Proteína Digestible por U.A:		165	grs.
Fibra Bruta	:	4,5	%
Materias Minerales	:	7,5	%
Calcio	:	1,25	%
Fósforo	:	0,75	%
Cloro	:	0,51	%
Sodio	:	0,33	%
Magnesio	:	0,35	%
Potasio	:	1,20	%
Azufre	:	0,20	%
Manganeso	:	90	mg./Kg.
Hierro	:	200	mg./Kg.
Cinc	:	50	mg./Kg.
Cobre	:	12	mg./Kg.
Cobalto	:	0,2	mg./Kg.
Vitamina A	:	20.000	U.I./Kg.
Vitamina D	:	3.000	U.I./Kg.
Vitamina E	:	65	mg./Kg.
Vitamina K	:	8	mg./Kg.
Vitamina B ₁	:	6	mg./Kg.
Vitamina B ₂	:	10	mg./Kg.
Vitamina B ₆	:	6	mg./Kg.
Vitamina B ₁₂	:	12	mcg./Kg.
Acido Pantoténico	:	20	mg./Kg.
Niacina	:	50	mg./Kg.
Acido Fólico	:	4	mg./Kg.
Colina	:	1.500	mg./Kg.

modifica el modelo excluyendo también el duodeno; su preparación consiste exclusivamente en pancreas con su sistema vascular, quedando la porta libre a través de la cual fluye el líquido de perfusión directamente a un sistema colector. Nuestros trabajos están hechos con el modelo de SUSSMAN sumamente modificado según la técnica descrita por GOBERNA en su tesis doctoral (1968). La perfusión del pancreas se consigue con su sistema circulatorio propio introduciendo una cánula en la aorta por la que haremos pasar el medio de perfusión oxigenado y un colector nos permitirá recoger fraccionadamente el líquido que sale por la porta. El pancreas se irrigará por medio del tronco celíaco y de la arteria mesentérica superior.

Se hace una incisión abdominal en la línea media a lo largo de la línea alba (laparatomía). Son necesarias incisiones laterales, una a cada lado para tener un campo operatorio amplio. Se desplaza hacia la derecha del animal las asas intestinales y la grasa epididimaria hacia abajo. Nos encontramos con el colon descendente cuya porción distal está unida a la pared abdominal posterior por una película de mesenterio. Haremos una ligadura sencilla en la porción distal de colon y a continuación disecamos el borde derecho del colon descendente cortando el epiplón y despegándole de las asas a que está unido hasta que se nos hace visible la arteria mesentérica superior. A continuación haremos lo mismo en el borde izquierdo del colon descendente y en el superior del transversal cuidadosamente pues en esta etapa estamos liberando el borde inferior del pancreas. Nos quedará totalmente disecada la arteria

mesentérica superior y apreciamos la arteria cólica izquierda que irriga colon descendente, la cual debe ser seccionada entre dos ligaduras.

Desplazando todas las asas hacia la izquierda localizaremos el duodeno en cuya porción distal en el primer ojal que queda entre los vasos arqueados haremos una ligadura doble seccionando el duodeno. En este momento la arteria mesentérica superior debe ligarse lo más distalmente posible y a continuación cortar por debajo de la ligadura. Cortando el colon distal por encima de la ligadura que hicimos podremos retirar todas las asas intestinales y el colon del campo operatorio.

El objetivo siguiente es liberar el pancreas del bazo. Tirando con unas pinzas de la curvatura mayor del estómago podremos cortar fácilmente una fina película de epiplón que recubre el pancreas y se extiende entre el bazo, estómago y duodeno. Tirando del borde externo del bazo podremos ver los vasos esplánicos en número variable habiendo tres más importantes y con tres ligaduras dobles seccionarlos y retirar 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. Entre dos ligaduras podremos cortar dicha arteria. A continuación ligamos proximalmente en la curvatura mayor un pequeño trozo de epiplón rico en grasa, por donde a veces discurre una pequeña arteria, y seccionamos entre el borde del estómago y la ligadura. La ligadura del esófago que puede ser sencilla será facilitada tras seccionar el epiplón que le une a las lengüetas hepáticas y a la curvadura menor del estómago. Tras esto seccionamos el esófago distalmente a la ligadura.

Por transparencia ó sobre fondo blanco podremos apreciar una zona rica en grasa que se extiende unida a parte proximal del cuerpo del pancreas y una zona que le mantiene unido al antro gástrico. Se debe

separar toda esta grasa del pancreas para lo cual son suficientes tres ó cuatro ligaduras la última de las cuales la hacemos a través de un pequeño ojal que hay entre antro y duodeno. Tras hacer estas ligaduras, que son sencillas, cortamos proximalmente a ellas quedándonos el pancreas libre de grasa que permanece unida al estómago. A continuación haremos una ligadura entre estómago y duodeno, seccionando proximalmente a ella y retirando así el estómago de la cavidad abdominal.

Desplazando el duodeno hacia la izquierda podremos ver la cara posterior de la cabeza del pancreas por donde discurre el colédoco intimamente relacionado con la vena porta y arteria hepática propia que se dirige hacia el hilio hepático. Con una pinza muy fina disecaremos la porta separándola de colédoco y arteria hepática y haremos una ligadura que nos servirá de referencia ulteriormente para cortar la porta permaneciendo cerrado el flujo a través de la hepática. Los peligros mayores en este paso consisten en desgarrar la porta ó en ligar la pancreático-duodenal superior pues la ligadura de la hepática se hace muy próxima a ella.

El pedículo renal izquierdo, arteria, vena y ureter incluyendo también la suprarrenal se puede seccionar entre dos ligaduras. De esta manera y mediante disección roma podremos apreciar la aorta abdominal requiriéndose una nueva ligadura para liberarla del tejido para-aórtico de este lado hasta el diafragma. La arteria renal derecha se puede visualizar por transparencia a través de la vena cava inferior, excluyéndola a la circulación tras una doble ligadura que realizaremos entre su salida de la aorta y la citada vena.

Posteriormente conviene ligar todo el tejido para-aórtico en este lado hasta el diafragma.

La aorta abdominal se liga distalmente a la salida de mesentérica superior y ambas renales dejándola preparada para la última fase de la extracción del pancreas. (Fig.1).

Tras toda esta preparación se abre el tórax de la rata y se pasa una ligadura que coja la aorta torácica lo más distalmente posible separándola de la vena cava. A continuación se pinza la aorta a nivel del cayado y se hace una incisión distal que permita la introducción de una cánula a través de la cual fluye el líquido de perfusión. La cánula quedará anudada contra las paredes de la aorta. Si la perfusión se realiza normalmente podrá verse como el hígado palidece al ser sustituida la sangre por el líquido de perfusión. En este momento buscamos la ligadura que hicimos en arteria hepática y seccionamos proximalmente a esta, incluyendo la porta a través de la cual sale el líquido de perfusión. Se introduce el pancreas en la cámara de perfusión tras haber liberado totalmente la aorta de la pared abdominal del diafragma. (Figs.2y3)

A los pocos minutos vemos como el pancreas estabilizará su presión arterial entre 10 y 20mm. de mercurio al tiempo que se inician los movimientos peristálticos en duodeno. Es en este momento cuando iniciamos el experimento de perfusión según lo programado en nuestro trabajo.

Al terminar la perfusión controlamos el comportamiento de cada pancreas observando el aumento en la presión arterial, tras un pulso de adrenalina, que puede elevarla hasta 100 ó más mm. de mercurio, y/ó mediante un pulso de glucosa hipertónica que provoca un pico de insulina indicándonos que el sistema vascular o la

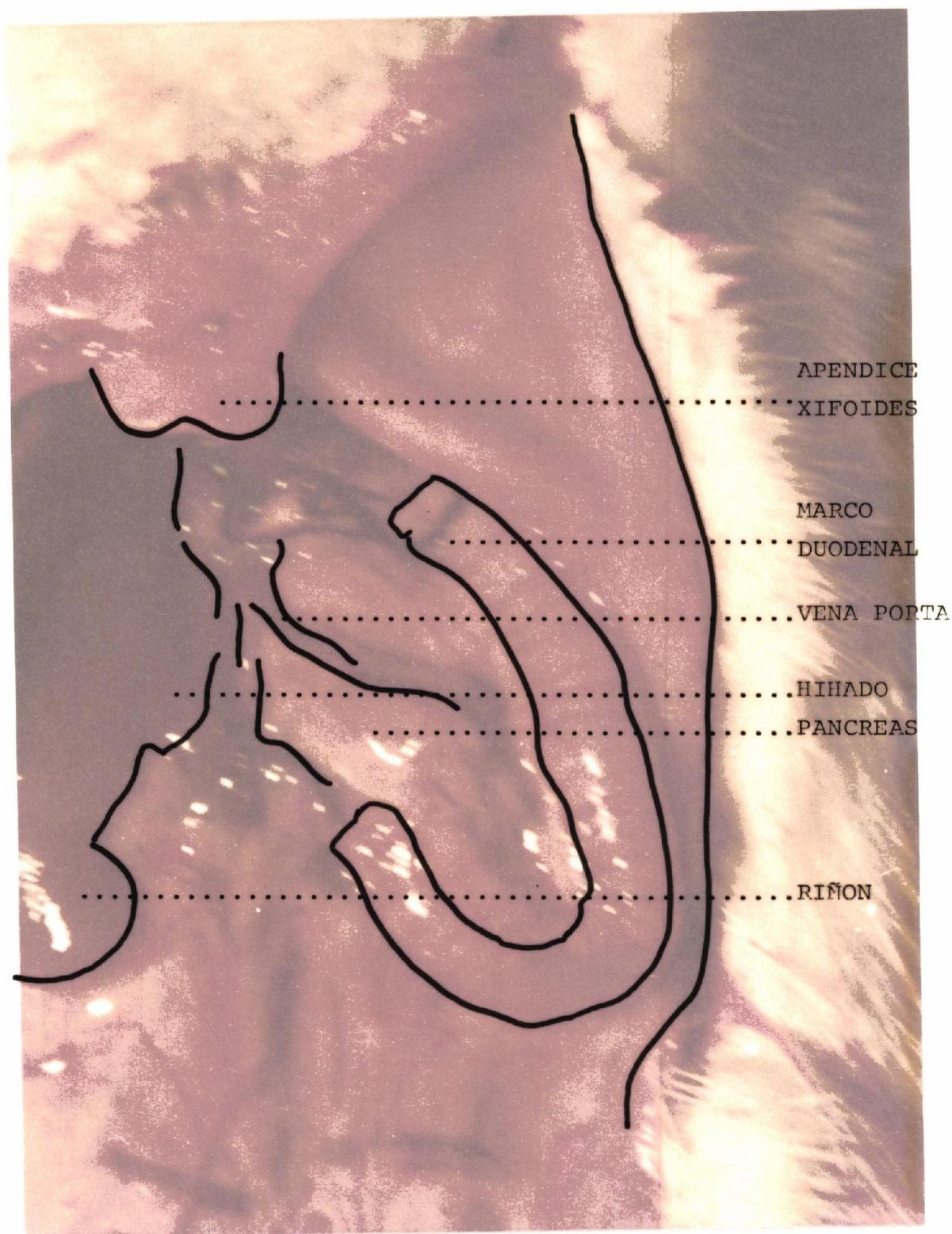


Fig.1

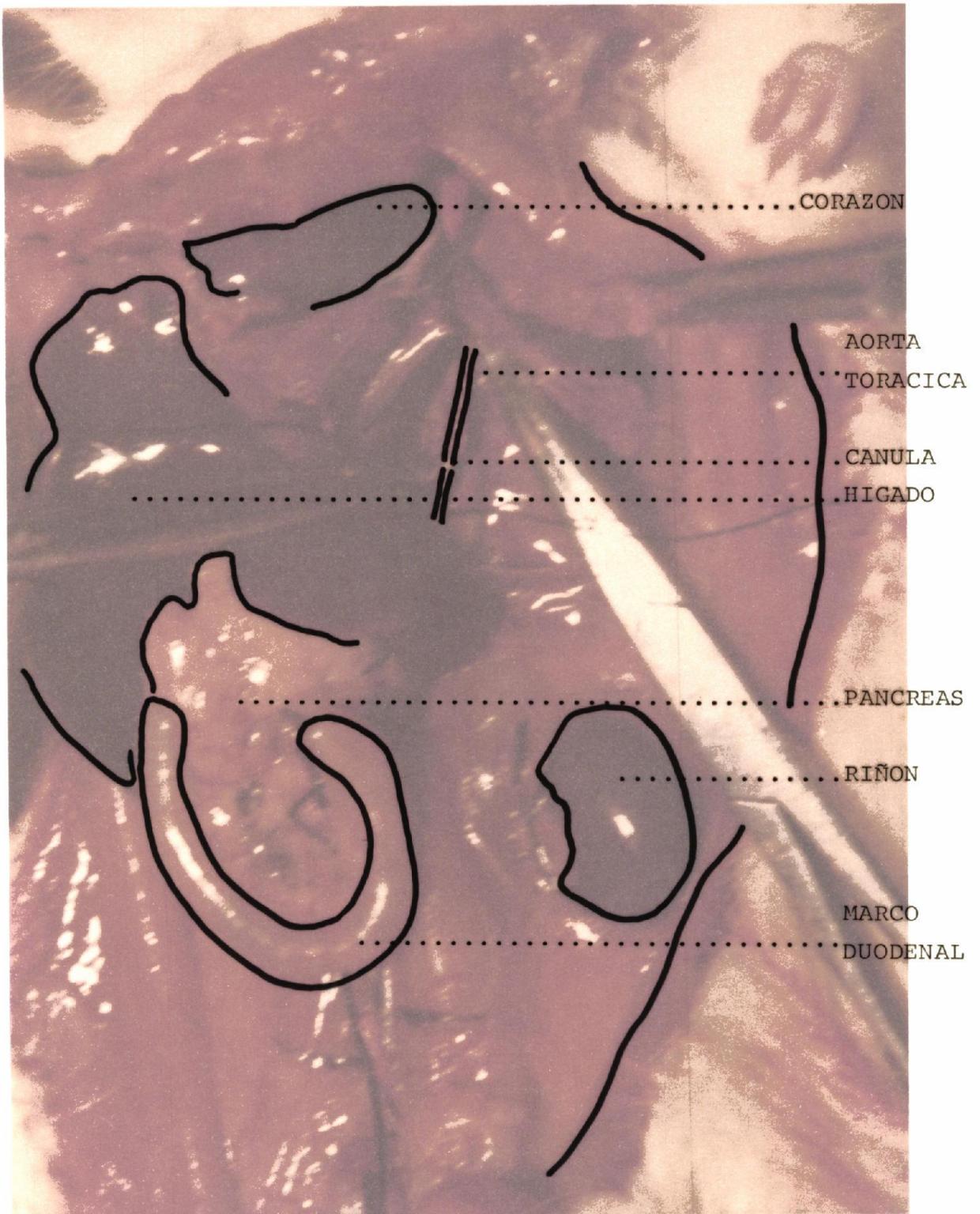


Fig.2

ENTRADA DEL LIQUIDO DE PERFUSION

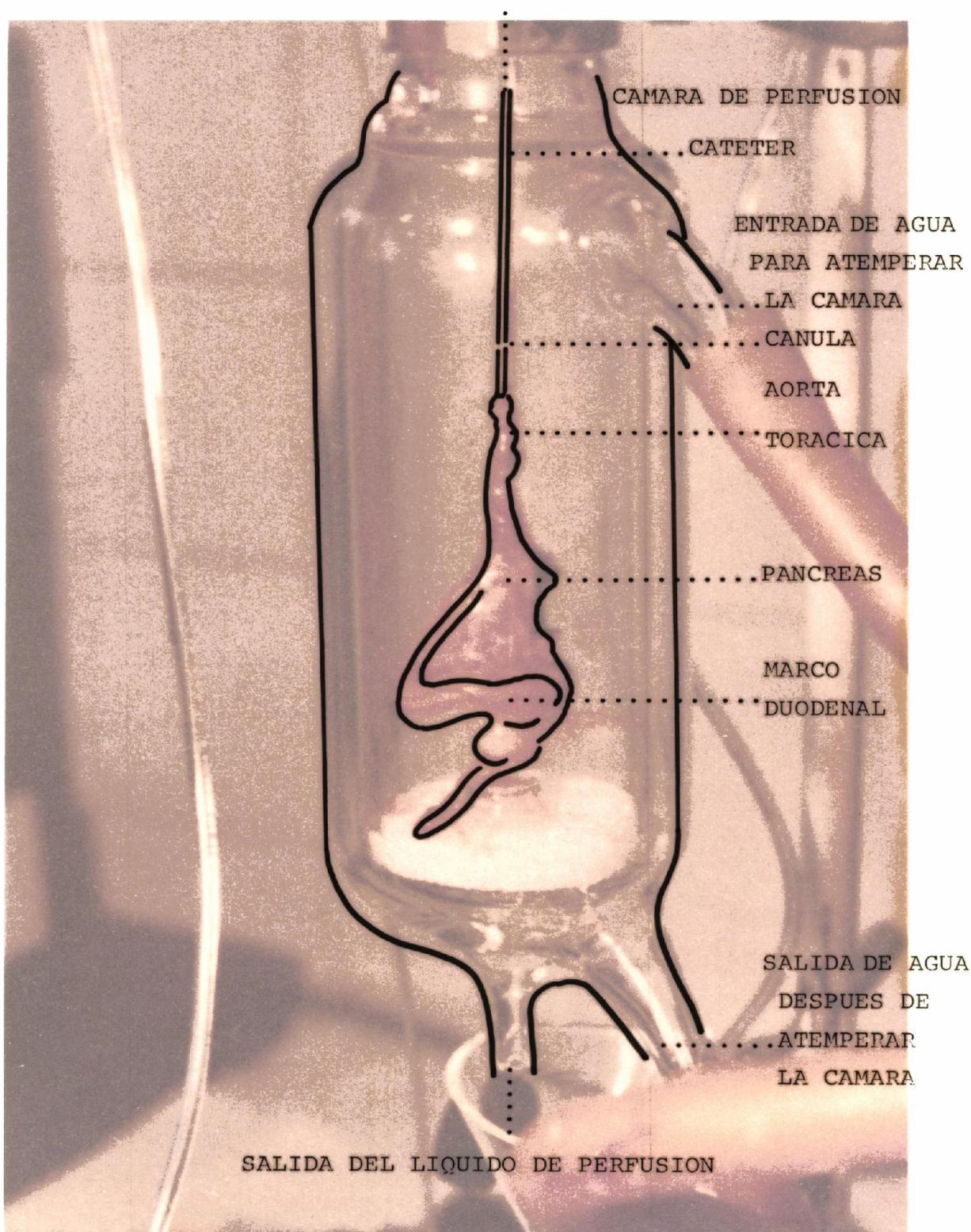


Fig.3

respuesta endocrina son normales.

2.3) DESCRIPCION DEL SISTEMA DE PERFUSION.

Es un conjunto de unidades destinadas a proporcionar un preparado duodeno-pancreático aislado en un medio interno artificial (líquido de perfusión) que posea unas características fisicoquímicas dentro de los márgenes fisiológicos que se dan normalmente in vivo. (Fig.4) Cada una de estas unidades, que describimos a continuación, cumple con una función determinada:

1. Circulación del líquido de perfusión.

Esta función análoga a la del corazón en el animal entero corre a cargo de una bomba que impulsa al líquido de perfusión a través del sistema vascular del preparado. En nuestro trabajo hemos utilizado una bomba "cerrada" (el líquido de perfusión no está en contacto con el mecanismo de la bomba; vease Ross, 1972), y "peristáltica", es decir, proporciona un flujo pulsátil. Su funcionamiento reside en la compresión secuencial de un tubo flexible por una serie de cilindros montados circularmente separados equidistantemente, según el tipo de bomba. Desde el punto de vista fisiológico o bioquímico no parecen existir razones de peso para elegir un flujo pulsátil o uno continuo en la perfusión de un órgano aislado (Ross, 1972).

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

se utiliza un volumen-minuto de 2,5 ml/min., aproximadamente el utilizado por Sussman et al (1966) en su preparado duodeno-pancreático y que cubre perfectamente las necesidades de oxígeno del mismo.

Grodsky et al (1963), que utilizan un preparado mayor (gastro-duodeno-explénico) perfunden con un flujo de unos 10 ml/min. En cualquier caso, la elección del flujo de perfusión reside en la adecuación de dos factores importantes para la supervivencia del preparado: aporte de oxígeno y presión hidrostática de perfusión.

2. Oxigenación del líquido de perfusión.

Esta función la realiza en nuestro sistema un oxigenador de membrana (tipo "cerrado", Ross, 1972). El fundamento de este tipo de oxigenador es que el gas y el medio no están en contacto directo, sino separados por una membrana permeable al gas. El tipo de oxigenador utilizado en este trabajo consiste en un recipiente de sección tronco-cónica con cuatro entradas en su cara superior. Dos de ellas son para que entre y salga el líquido de perfusión, conectadas mediante sendos tubos de plástico a un reservorio donde está almacenado el líquido de perfusión, y a la bomba de perfusión, respectivamente. Mediante esta disposición el oxigenador se mantiene siempre lleno de líquido.

Las otras dos entradas a la cámara de oxigenación están ocupadas por los extremos de un huso constituido por una multitud de finísimos conductos de celulosa, suspendidos en el interior de la cámara. El espacio limitado por estos conductos es por donde circula la mezcla gaseosa utilizada en la perfusión. El oxígeno

difunde a través de la pared de los conductos para solubilizarse en el líquido de perfusión, que se mantiene en continua agitación mediante un agitador magnético situado en el fondo de la cámara para lograr una masa líquida uniformemente oxigenada. La pared de los conductos son de silicona con una gran permeabilidad al oxígeno. La mezcla gaseosa utilizada para la perfusión está constituida por un 95% de oxígeno y un 5% de anhídrido carbónico (carbógeno) que se inyecta en el huso de la cámara a una presión de $0,4 \text{ kg/cm}^2$ ($=789,411 \text{ mm Hg}$).

3. Registro de la presión hidrostática.

La presión de perfusión del preparado duodeno-pancreático la hemos controlado en todos los experimentos (circuito "cerrado") mediante la conexión de un manómetro de mercurio en un punto del circuito de perfusión cercano al pancreas, para mantener un flujo de $2,5 \text{ ml/min}$. Hemos registrado una presión de perfusión variable de un pancreas a otro, oscilando entre 20 y 25 mm Hg. Estas cifras coinciden con el límite inferior descrito por Sussman (1966) para su preparado.

Esta diferencia puede residir en la ausencia en nuestro preparado de la cánula portal que Sussman utiliza y que es desechada en la modificación de la técnica de perfusión descrita por Goberna (1969). La cánula portal puede aumentar las resistencias periféricas y elevar así la presión en el preparado.

En todos los experimentos que se han seleccionado para la presentación de este trabajo, la presión se mantuvo constante durante todo el tiempo de perfusión, siendo ello un buen sintoma del funcionamiento fisiológico del preparado (Sussman, 1966;

Ross, 1972). Si el tiempo de perfusión se prolonga mucho (más de 70 minutos) puede empezar a subir lentamente la presión, debido seguramente al edema tisular del preparado.

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

4. Mantenimiento de la temperatura.

Se consigue una temperatura estable de 37° C para el líquido de perfusión y la cámara donde se sitúa el páncreas mediante el uso de un termostato que regula la temperatura de un depósito de agua. Este mismo termostato tiene un sistema de bombeo acoplado que hace circular el agua caliente a través de un cilindro de vidrio que contiene un serpentín por donde circula el líquido de perfusión y por la doble pared de la cámara de perfusión, manteniéndose ambos a 37°C.

5. Conexiones y cámara de perfusión.

Siguiendo el esquema de la figura 10 puede describirse el aparato de perfusión en una serie de unidades enumeradas en el orden en que llega a ellas el líquido de perfusión. Todas las unidades están unidas entre si por medio de un catéter de plástico de unas características especiales (Tygon, calibre 2/32), para impedir pérdidas de oxígeno.

El encendido de la bomba de perfusión hace que el líquido conte-

nido en un reservorio (1) pase al oxigenador y de éste (a través de la bomba) al serpentín de calentamiento. De aquí llega hasta un captador de burbujas (tubo en T con una rama vertical) que elimina el peligro tan frecuente de una embolia gaseosa y pasa ya directamente al páncreas que se encuentra en la cámara de perfusión. Esta cámara de forma cilíndrica con una doble pared lateral que permite su calentamiento por circulación de agua a 38-39°C, un fonde de vidrio poroso donde descansa el páncreas y un tampón perforado por donde entra el catéter que se introduce en la aorta.

6. Infusión de sustancias en el páncreas.

Con el objeto de conseguir aumentos rápidos de la concentración de las diversas sustancias utilizadas en el líquido aferente al páncreas sin necesidad de circular por todo el sistema ni de diluir en los depósitos de la perfusión se infundieron todas ellas inmediatamente antes de la entrada en el órgano. De esta manera se evita todo el espacio muerto del circuito de perfusión que desde el oxigenador hasta la cámara de perfusión y se puede separar con bastante nitidez la infusión consecutiva de dos sustancias distintas.

El infusor utilizado es una bomba de precisión cuyo motor empuja el émbolo de una jeringa que contiene la sustancia a infundir, a una concentración determinada. El flujo proporcionado por este infusor depende del calibre de la jeringa y de la velocidad de trabajo del motor. En casi todos los experimentos hemos utilizado una jeringa de 20 ml. y una velocidad de empuje del motor (posición 6 del "Perfusor sage instrumen Model 352") tales que, proporcionan un flujo líquido de 14 ml/hora o 0,2333 ml/min:

La concentración de glucosa para el infusor se calcula multiplicando este cociente por la concentración deseada de glucosa en el líquido de perfusión (3 mg/ml) :

$$10.7158 \times 3 \text{ mg/ml} = 32.1474 \text{ mg/ml.}$$

El volumen de solución de glucosa (32.1474 mg/ml) a preparar para el infusor depende del tiempo total que se desee infundir esta sustancia . En la práctica, estas soluciones se preparan pesando la sustancia cristalina en una balanza de precisión y disolviéndola "siempre" en solución salina fisiológica (0,9 gr% de ClNa), ajustando el pH a 7,35 antes de completar el volumen. El líquido perfundido que fluye de la vena porta de forma continua sale de la cámara de perfusión a través de la lámina de vidrio poroso que ésta tiene en su base y se recoge continuamente en fracciones de dos minutos (unos 5 ml). Este proceso de recogida se automatiza con la utilización de un colector de fracciones calibrado para cambiar de tubo cada 2 minutos. Las muestras que se van recogiendo son colocadas inmediatamente a 0°C y una vez terminada la perfusión se congelan todos los tubos a -20°C hasta el día de la determinación de insulina.

7 . Líquido de perfusión.

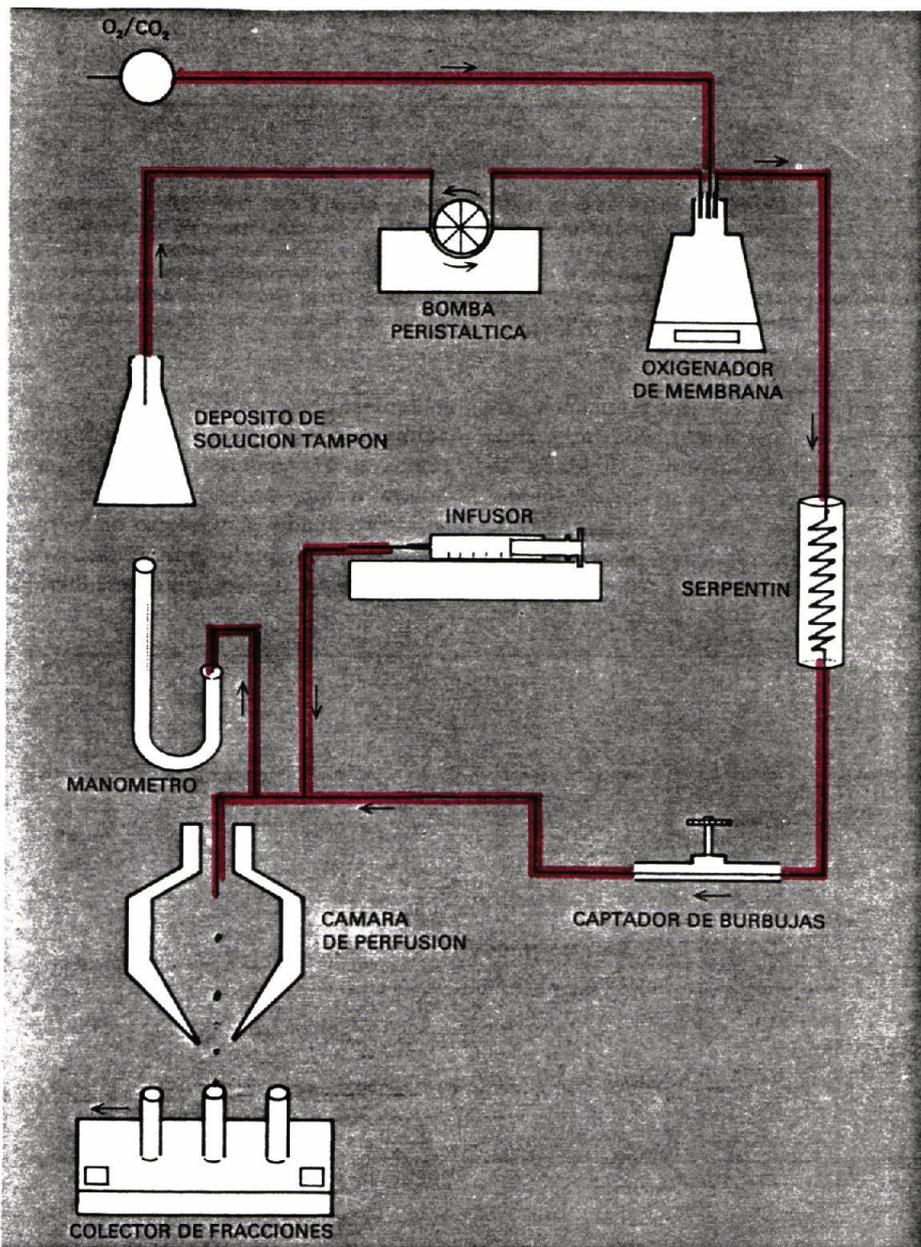
Se ha utilizado como líquido de perfusión la solución salina de Krebs-Ringer-Bicarbonato. Las sales componentes de ésta solución se prepararon en soluciones concentradas y se conservaron en frío (4°C), tomándose cada día las cantidades necesarias para preparar la solución de Krebs.

A continuación se describe la concentración (gr /100 ml=%) de cada una de estas soluciones, el volumen utilizado de cada una de ellas para preparar 780 ml de Krebs y la concentración de cada una de las sales.

		<u>Volumen</u>	<u>Conc. final (mM)</u>
CLNa	(2,5%)	200 ml	109.69
CO ₃ HNa	(6,5%)	42 ml,	41.66
ClK	(5,7%)	8 ml	7.84
PO ₄ H ₂ K	(10,5%)	2 ml	1,98
SO ₄ Mg.7 H ₂ O	(39,07%)	2 ml	4.06
H ₂ O	bidestilada	520 ml	
Cl ₂ Ca. 2 H ₂ O	(3,09%)	6 ml	4.23

Después de añadidos y mezclados todos los componentes referidos en la tabla anterior se ajusta el pH de la solución con ClH 1N hasta un pH=7-3,7,35 y se añade albúmina bovina purificada(BEHRING WERKE AG) en la proporción de 0,5%. La presión osmótica de la solución salina es de unos 343 m0sM/L; la presión oncótica de la albúmina contribuye a retrasar laaparición del edema tisular que ocurre siempre en este tipo de preparados .

Todos los reactivos utilizados en la preparación del Krebs-Ringer-bicarbonato son de grado de pureza analítico (Merck).



Esquema del aparato utilizado en la perfusión del páncreas. El páncreas se introduce en la cámara de perfusión que está atemperada a 37,5°C. En líneas rojas se representan los conductos por donde circula la solución tampón utilizada. Las flechas indican el sentido de la corriente. La oxigenación se realiza en un oxigenador de membrana que recibe por una parte carbogéneo (O₂/CO₂) y por otra el líquido de perfusión. Finalmente, el colector de fracciones, que está programado a tiempos de dos minutos, nos permite estudiar la dinámica de secreción (R. Goberna 1978).

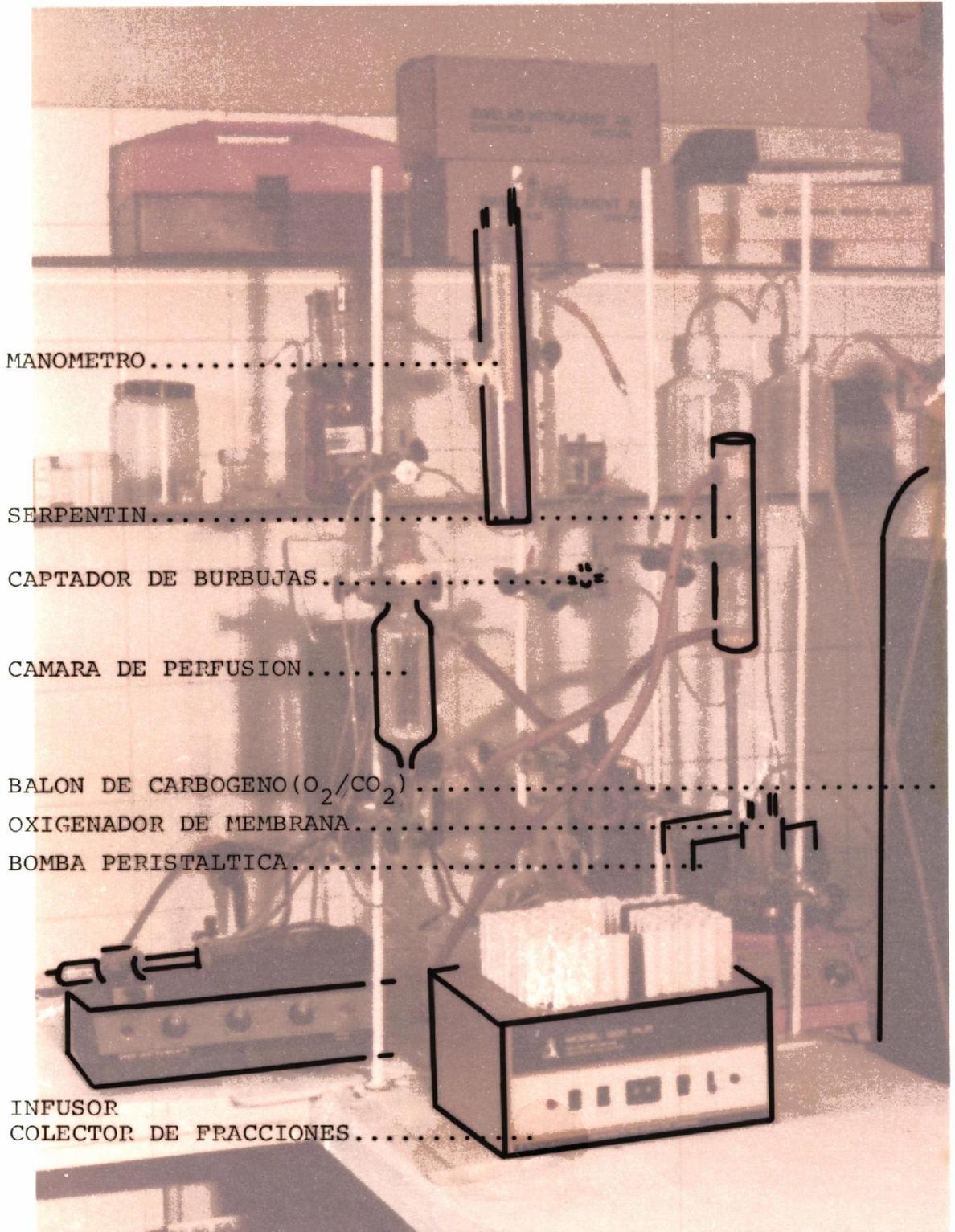


Fig.4

2.4) DETERMINACION DE LA INSULINA

2.4.1) Producción de anticuerpos.

Los anticuerpos se obtuvieron por inmunización de 20 cobayas hembras de unos 400 grs de peso con insulina porcina cristalina.

Material. Solución de insulina: a) se prepara una solución que contiene 8'3 mg de insulina porcina cristalizada en 12'7ml de CLH 0'0003 N. La insulina fue un obsequio de los laboratorios Hoescht. b) Adyuvante completo de Freund (Difco). Es un antígeno inespecífico constituido por un extracto de cápsulas de bacilo tuberculoso en suspensión oleosa. Ambas soluciones de mezclan mediante agitación continua tomando 10 ml de ambas soluciones hasta obtener una suspensión homogénea de aspecto opalescente que contiene aproximadamente 10 mU de insulina/ml.

Método. Durante cuatro meses, haciendo un total de 8 inmunizaciones (quincenales) se inyectó a los cobayas 1 ml de solución antigénica por vía subcutánea en la zona lumbar. De todos los animales con los que se comenzó la inmunización murieron 5; probablemente por comas hipoglucémicos ya que tras las inyecciones de insulina era evidente un estado de hipoglucemia de la que eran recuperados dándoles a beber agua azucarada o inyectando intraperitonealmente glucosa hipertónica (Glucosmón Leo).

Una semana despues de la última inmunización se les extrajo sangre por punción cardiaca a los cobayas que sobrevivieron. Se separó el suero y se almacenó a 20°C. De los 15 antisueros obtenidos solamente tres mostraron un buen título de anticuerpos. Para nuestro trabajo se seleccionó el número 3 (Ab 3) del cual se hizo posteriormente un estudio completo. De todo el antisuero se tomó 1 ml que se diluyo al 1% con tampón barbital sódico 0'1 M a pH 8'6 que además contiene un 0'5% de albúmina bovina purificada y un 1% de suero de cobaya no inmunizado. La solución se dividió en 200 fracciones de 0'5 ml de la que se tomó el anticuerpo para la titulación y posteriores radioinmunoensayos.

2.4.2) Titulación de anticuerpos.

Fueron incubadas diluciones variables del anticuerpo con una cantidad constante de insulina marcada con I_{125} y estas mismas diluciones se incubaron con la misma cantidad de insulina I_{125} más otra cantidad constante de insulina sin marcar (10 μ U) con la intención de conocer la dilución del antisuero a la cual se obtiene mayor sensibilidad para detectar las 10 μ U de insulina fría por el desplazamiento que se observase en la cantidad de insulina marcada unida al anticuerpo.

El material empleado en la titulación de los anticuerpos fue el siguiente:

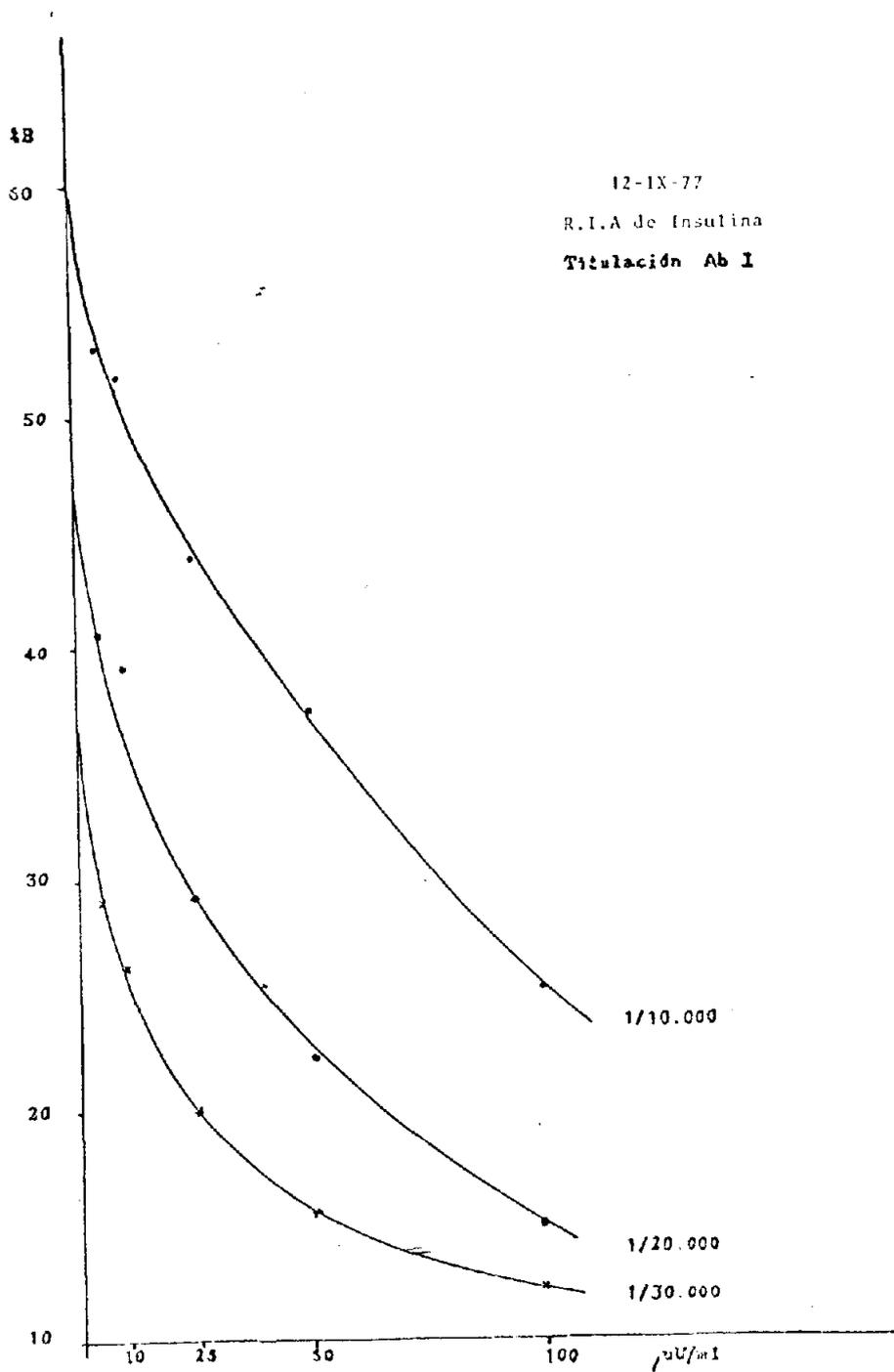
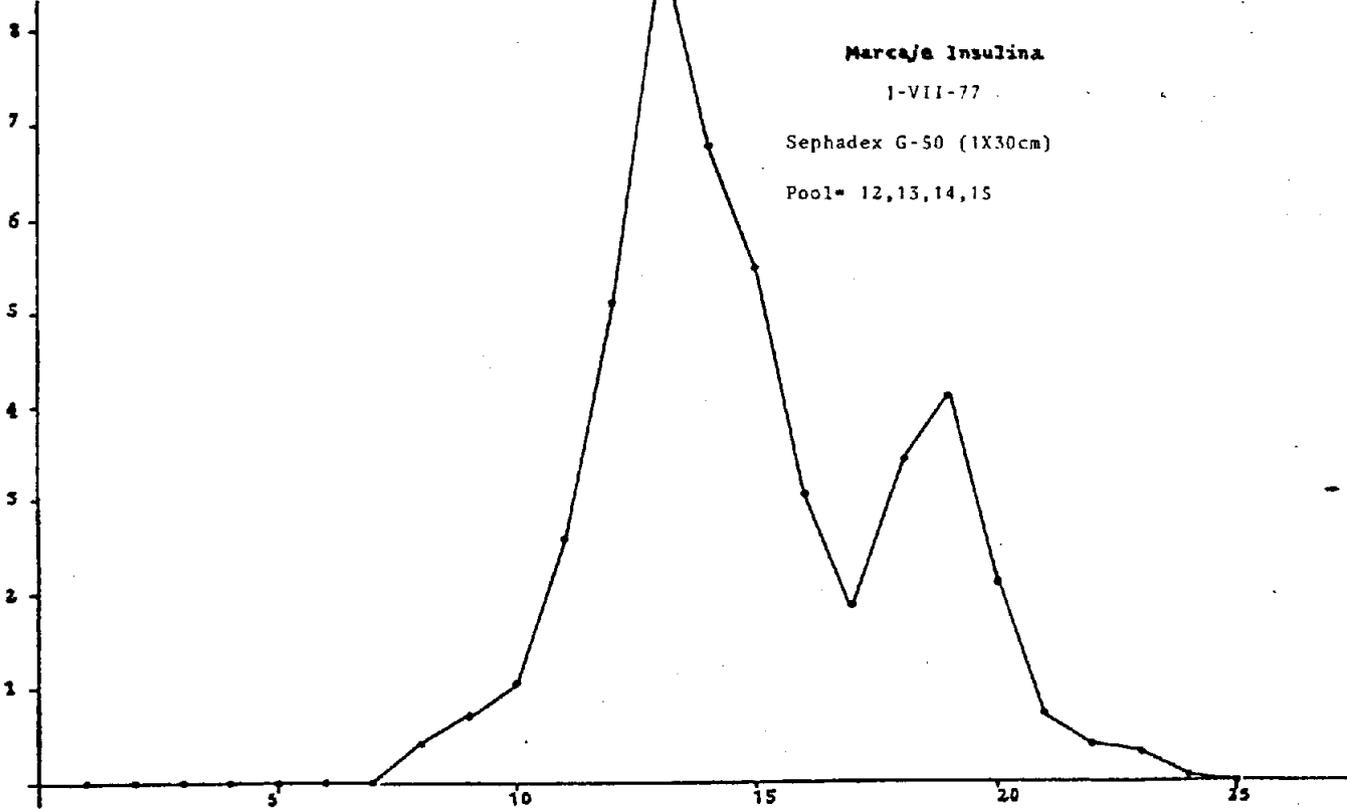


Fig.5 Curva de titulacion del anticuerpo.

- Tampón barbital sódico (Serva) 0'1 M. Después de pesar la cantidad adecuada para el volumen necesario se filtró a través de papel y a continuación se llevó el pH a 8'6 utilizando CLH 1 N. Este tampón llevaba también mertiolato al 0'01% y albúmina bovina al 0'5%.
- Insulina I₁₂₅. Esta insulina, cuyo marcaje y purificación se describirá más adelante fue disuelta lo mismo que el anticuerpo y la insulina sin marcar en el tampón antes descrito.
- Insulina fría. Se prepara una solución de la misma que contenga 10 μ U a partir de la solución reserva que contiene 250 μ U/ml'
- Anticuerpo cuya obtención ha sido descrita y que se diluira en tampón barbital a una concentración 4 veces inferior a la deseada en el medio de incubación ya que este tiene un volumen total de 2 ml y el de anticuerpo es 0'5 ml (Lucas, 1975).

2.4.3) Marcaje de insulina con I₁₂₅

Se ha utilizado la técnica de Hunter y Greenwood (1962) que está basada en la oxidación por la cloramina T del yoduro radiactivo en yodo atómico e I⁺ que se une a uno o más de los carbonos del anillo bencénico de las moléculas de tirosina, de las cuales hay cuatro en la insulina, dos en la cadena A en posición 14 y 19 y otros dos en la cadena B en posición 16 y 26. La acción de la cloramina T se detiene al cabo de 20 segundos mediante la acción del

$\text{cpm} \times 10^5$ 

metabisulfito.

Material.

- Insulina porcina cristalizada (1 mg=25 U).
- I_{125} Amershan, ref. IMS-30, con una actividad total de un milicurio en un volumen de 10 μ l.
- Tampón veronal 0'1 M, pH=8'6. Se prepara un litro en agua bidestilada y desionizada disolviendo 20'62g de veronal sódico y 0'24g de trimerosal en aproximadamente 800 ml; se ajusta el pH con CLH 1N y se enrasa a 1 litro. Se conserva a 4°C.
- Tampón fosfato 0'5 M, pH 7'5. Se disuelve 3'4 g de PO_4H_2K en aproximadamente 40 ml de agua bidestilada, se ajusta el pH con NaOH 1 N y se enrasa a 50 ml. Se conserva a 4°C.
- Tampón fosfato 0'05 M, pH 7'5. Se prepara añadiendo 90ml de agua bidestilada a 10 ml del tampón anterior.
- Cloramina T. Se disuelven 35mg de cl. T 3 H_2O en 10ml de tampón fosfato 0'05 M. Debe mantenerse a oscuras hasta su uso inmediato.
- Metabisulfito sódico. Se disuelven 24 mg en 10 ml de tampón fosfato 0'05 M.
- Ioduro potásico. Se disuelven 250 mg de IK en 25 ml de tampón fosfato 0'05 M y se conserva a 4°C.
- Albúmina bovina. Se utiliza al 20% en tampón veronal 0'1 M, pH 8'6.

Método.

Método.

Con una microjeringa Hamilton provista de cateter Portex nº1 se toman por este orden:

- 25 μ l de tampón fosfato 0'5 M, pH 7'5.
- 10 μ l de cloramina T (35 ug).
- 5 μ l de insulina (5 ug).
- 10 μ l de I_{125} (1 mCi) o su equivalente según la pérdida de actividad en el tiempo.

Se agita durante 20 segundos. Se añade después:

- 50 μ l de metabisulfito sódico (120 ug) (MBNa).

Se vuelve a agitar y se añade:

- 100 μ l de yoduro potásico (1 mg) (IK).
- 100 μ l de albúmina bovina al 20 % (BSA). Se agita por última vez.

Para averiguar la actividad específica y el % de incorporación del I_{125} se utiliza la precipitación con ácido tricloroacético (TCA), cuya técnica se expone a continuación.

Precipitación con ácido tricloroacético. Se toma una alícuota de 5 μ l de la mezcla de marcaje y se disuelve en 5 ml de tampón veronal 0'1 M, pH 8'6 conteniendo BSA 0'5 %.

Se prepara por triplicado, para cada muestra radioactiva, en tubos de plástico y puestos en una batea con hielo los siguientes reactivos:

- 1 ml de tampón veronal 0'1 M, pH 8'6.

- 0'1 ml de BSA al 20 %.
- 0'1 ml de muestra radioactiva.
- 1 ml de TCA al 20 %.

Se tapan todos los tubos con parafilm y se agitan. Se dejan en reposo 10 minutos. Despues se centrifugan a 3000 rpm, durante 5 minutos. Una vez centrifugados se aspiran los sobrenadantes y se cuenta la radioactividad de los precipitados.

Se preparan, también por triplicado, tubos que solo contengan 0'1 ml de las respectivas muestras, se cuenta la radioactividad y se calculan los correspondiente porcentajes.

2.4.4) Purificación de la insulina.

La insulina I_{125} que se ha recogido del marcaje está impurificada por una pequeña parte de insulina que se ha degradado formando agregados de mayor peso molecular y el I_{125} que no se ha incorporado. La purificación y eliminación de esta fracción degradada y del exceso de I_{125} se hace en una columna de Sephadex G-50 (1x50 cm). Se utiliza tampón veronal 0'1 M, pH 8'6. Se hace un prelavado con 0'2 ml de BSA al 20 %. Se preparan 70 tubos de plástico con una gota de BSA al 20 %.

Se añade la mezcla de marcaje y se eluye. De los tres picos obtenidos se selecciona la parte más activa del segundo y se mezcla el contenido de los tubos de esta

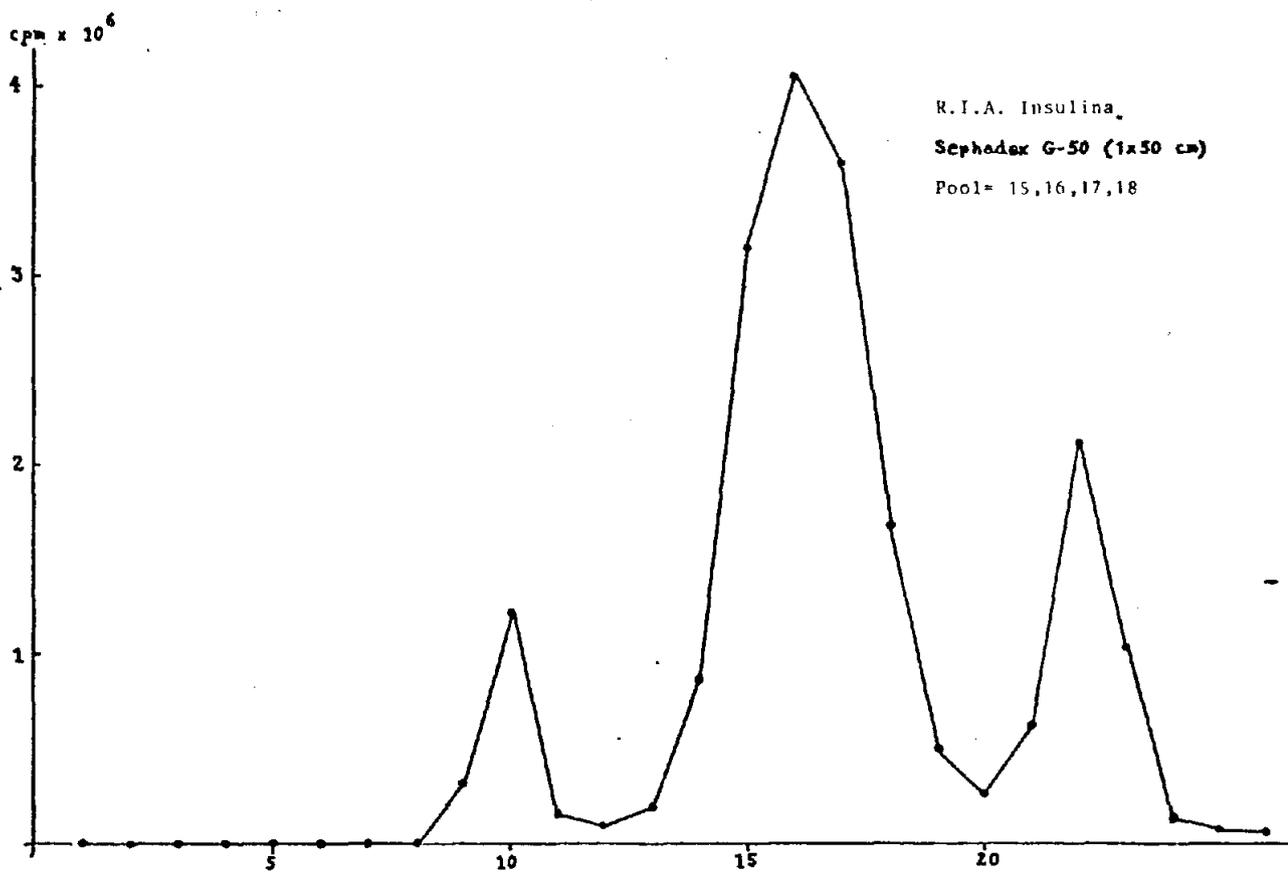


Fig.7 Purificacion en sephadex G-50 de la insulina marcada

fracción. Se divide en alícuotas de 0'5 ml cada una y se congela a -20°C .

Puede trabajarse con este trazador durante tres semanas. Después es necesario repurificar en una columna de características similares a la anterior hasta un máximo de 3 semanas más.

Preparación de la insulina fría.

Para la curva de calibración se utiliza insulina porcina cristalina, de la misma utilizada para el marcaje (1 mg=25 U).

Una vez disuelta en CLH 0'003 N y dejada en reposo 30 minutos, se toma 0'1 ml de dicha solución y se mezcla con 2'4 ml de tampón veronal 0'1 M, pH 8'6, 0'5 % de BSA, con lo que queda a 10^6 $\mu\text{U/ml}$. Se mezcla 0'5 ml de esta solución con 49,5 ml de tampón quedando a una concentración de 10^4 $\mu\text{U/ml}$. Se divide en alícuotas de 1 ml y se congelan a -20°C .

Preparación de las fracciones libre y ligada al anticuerpo.

La insulina que queda libre se puede separar de la ligada al anticuerpo por diferentes métodos. En el presente trabajo se ha utilizado una suspensión de carbón al 5%-dextrano T-70 (0'5%) en tampón veronal sin albúmina agitada constantemente y preparada al menos 15 minutos antes de su uso. La insulina libre penetra en los canalículos del carbón, mientras que la fracción ligada

al anticuerpo no puede penetrar por su gran tamaño. Los tubos se dejan en reposo durante 5 minutos.

Se centrifugan a 3000 rpm durante 10 minutos y se aspiran con vacío los sobrenadantes.

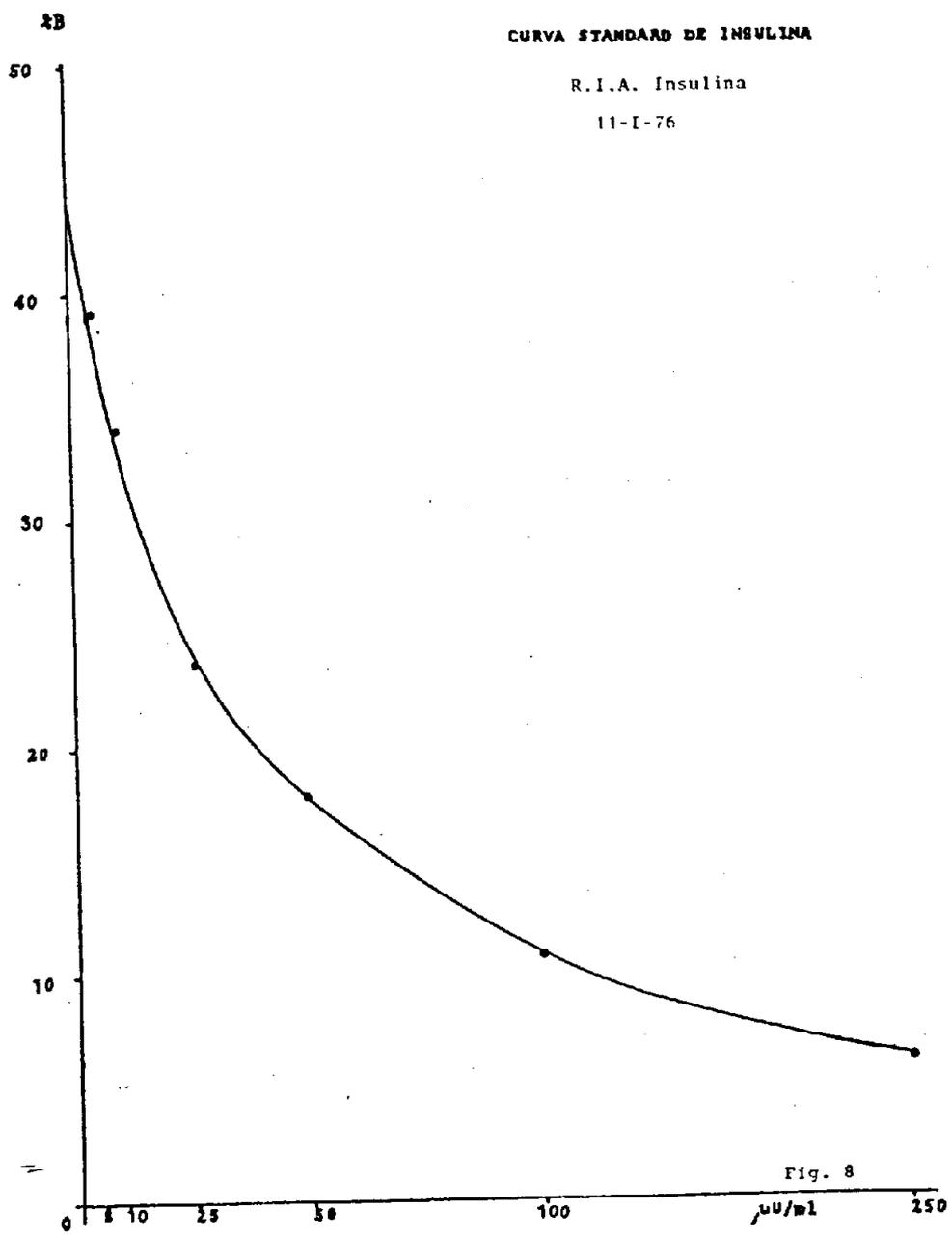


Fig. 6

Fig. 8

PREPARACION DE LA CURVA STANDARD E INTERPOLACION DE PROBLEMAS.

Utilizar buffer veronal 0'1M pH 8,6, 0'5% BSA preparando con agua bidestilada y desionizada.

Descongelar una alicuota de IA*. Preparar las siguientes concentraciones a partir del "stock" de 10.000 μ U/ ml, teniendo en cuenta que para pasar de una a otra se debe haber agitado varias veces y teniendo en reposo al menos 2-3 minutos.

0, 5, 10, 25, 50, 100, 250, μ U/ ml.

0,1 ml (10.000 μ U / ml + 3,9 ml buffer	250 μ U/ ml
2 ml (250 μ U/ml) + 3 ml buffer	100 μ U/ ml
1 ml (100 μ U ml) + 1 ml buffer	50 μ U/ ml
0,5 ml (100 μ U ml) +1,5ml buffer	25 μ U/ ml
0,2 ml (100 μ U/ml) +1'8ml buffer	10 μ U/ ml
0,1 ml (100 μ U/ml) +1,9 ml buffer	5 μ U/ ml
0,1 ml (100 μ U/ml) +3,9 ml buffer	2'5 μ U/ ml

PREPARACION DEL Ab EL DIA DEL ANALISIS:

A partir del "stock" diluido $\frac{1}{100}$, realizar una nueva dilución $\frac{1}{200}$ para que quede a título inicial $\frac{1}{20.000}$ y final de $\frac{1}{80.000}$.

PREPARACION DE LA INSULINA - I¹²⁵ EL DIA DE ANALISIS :

Diluir el trazador según el tiempo pasado desde el marcaje de modo que 0'1 ml equivalgan a 10.000 cpm primitivas.

* IA: Insulina análisis.

RADIOINMUNOANALISIS PARA PERFUSADOS Y PERIFUSADOS :

Curva standard por triplicado. El 0 lleva buffer en lugar de insulina. Pipetear sucesivamente, a temperatura ambiente:

(0'5 ml standard)

(0'9 ml buffer)

(0,1 ml insulina -I¹²⁵)

(0,5 ml Anticuerpo)

(0'1 ml Insulina

Otro triplicado como control, que contenga (1'9 ml buffer

Con ello se tienen los 24 primeros tubos de análisis.

Las muestras se tratan de la siguiente manera.

(0,5 ml muestra)

(0,9 ml buffer)

(0,1 ml Insulina-I¹²⁵)

(0,5 ml Anticuerpo)

Incluyendo para cada perfusión ó perifusión completa un control que contenga (0,5 ml muestra

(1,4 ml buffer

(0,1 ml Insulina -I¹²⁵

Agitar todos los tubos. Preparar además 10 tubos de actividad total que contengan solo 0,1 ml Insulina - I¹²⁵

Incubar 3 días 4°C.

Separar las fracciones libre y ligada añadiendo a todos los tubos (excepto a la actividad total) 0'5 ml de una suspensión de carbón (5%)- Dextrano T70 (0'5%) en buffer veronal sin albúmina agitada constantemente y preparada al menos 15 minutos antes de su uso.

Dejar los tubos en reposo 5 minutos.

Centrifugar a 3.000 rpm durante 10 minutos.

Aspirar a vacio los sobrenadantes.

Contar la radiactividad de los sedimentos (fracción libre F) durante 2 minutos y también la de los tubos de actividad total y de 5 tubos vacios (fondo).

Restar al porcentaje de todos los tubos la media de los fondos.

Calcular la media de los triplicados.

Calcular el porcentaje de los valores con respecto a la actividad total para obtener % F.

Calcular las correspondientes fracciones ligadas % B = 100-%F.

Corregir estos valores de % B restándoles el % B del control de adsorción inespecífica correspondiente.

Representar estos valores de % B corregidos frente a las V/ml. -

NOTA: Las perfusiones normalmente se colectan a 2'5 ml/minuto en periodos de 2 minutos y el resultado se expresa en ng/min.

Si V es el volumen de nuestra (ml) recogido en 2 minutos y X es el resultado en $\mu\text{U/ml}$, como $1 \text{ ng} = 25 \mu\text{U}$, el resultado práctico es :

$$\text{ng/min} = 0,02 \cdot V \cdot X$$

2.5) Diseño experimental.

Grupo I: Controles (n=23).

I₁: Controles: 1^{er} Periodo glucosa 2'75 mM. 2°Periodo glucosa 16'7 mM.

I₂: Controles: 1^{er} Periodo glucosa 5'5 mM. 2°Periodo glucosa 33'4 mM.

Grupo II: Ayuno y estimulación con glucosa (n=24).

II₁: 1 día de ayuno: 1^{er} Periodo glucosa 2'75 mM.
2°Periodo glucosa 16'7 mM.

II₂: 1 día de ayuno: 1^{er} Periodo glucosa 5'5 mM.
2°Periodo glucosa 33'4 mM.

II₃: 4 días de ayuno: 1^{er} Periodo glucosa 2'75 mM.
2°Periodo glucosa 16'7 mM.

II₄: 4 días de ayuno: 1^{er} Periodo glucosa 5'5 mM.
2°Periodo glucosa 33'4 mM.

II₅: 8 días de ayuno: 1^{er} Periodo glucosa 2'75 mM.
2°Periodo glucosa 16'7 mM.

Grupo III: Ayuno y estimulación con arginina (n=17).

III₁: Controles: 1^{er} Periodo glucosa 2'75 mM. 2°Periodo glucosa 2'75 mM + arginina 2'5 mM.

III₂: Controles: 1^{er} Periodo glucosa 2'75 mM. 2°Periodo glucosa 2'75 mM + arginina 5 mM.

III₃: Controles: 1^{er} Periodo glucosa 2'75 mM. 2°Periodo glucosa 2'75 mM + arginina 15 mM.

- III₄: 4 días de ayuno: 1^{er} Periodo glucosa 2'75 mM.
2°Periodo glucosa 2'75 mM + arginina 2'5 mM.
- III₅: 4 días de ayuno: 1^{er} Periodo glucosa 2'75 mM.
2°Periodo glucosa 2'75 mM + arginina 5 mM.
- III₆: 4 días de ayuno: 1^{er} Periodo glucosa 2'75 mM.
2°Periodo glucosa 2'75 mM + arginina 15 mM.
- III₇: 8 días de ayuno: 1^{er} Periodo glucosa 2'75 mM.
2°Periodo glucosa 2'75 mM + arginina 5 mM.

Grupo IV: Ayuno y estimulación con beta-OH butirato(n=16)

- IV₁: Controles: 1^{er} Periodo glucosa 5'5 mM. 2°Periodo glucosa 5'5 mM + beta-OH-butirato 7mM.
- IV₂: 4 días de ayuno: 1^{er} Periodo glucosa 5'5 mM.
2°Periodo glucosa 5'5mM + beta-OH-butirato 7 mM.
- IV₃: 8 días de ayuno: 1^{er} Periodo glucosa 5'5 mM.
2°Periodo glucosa 5'5 mM + beta-OH-butirato 7 mM.

Grupo V: Ayuno y realimentación (n=16).

- V₁: 4 días de ayuno + 2 realimentación: 1^{er} Periodo glucosa 2'75mM. 2°Periodo glucosa 16'7 mM.
- V₂: 4 días de ayuno + 2 realimentación: 1^{er} Periodo glucosa 5'5 mM. 2°Periodo glucosa 33'4 mM.
- V₃: 8 días de ayuno + 2 realimentación: 1^{er} Periodo glucosa 2'75 mM. 2°periodo glucosa 16'7 mM.
- V₄: 8 días de ayuno + 2 realimentación con sonda: 1^{er} Periodo glucosa 2'75 mM. 2°Periodo glucosa 16'7mM.

Grupo VI: Ayuno y estimulación con niveles elevados de Ca^{2+} (n=8) (A) Teofilina (n=16) (B) y db-AMPC (n=3) (C).

- VI_{A1}: 4 días de ayuno: 1^{er} Periodo glucosa 2'75 mM + Ca^{2+} 7mM. 2°Periodo glucosa 16'7mM + Ca^{2+} 7 mM.
- VI_{A2}: 4 días de ayuno: 1^{er} Periodo glucosa 5'5 mM + Ca^{2+} 7 mM. 2°Periodo glucosa 33'4 mM + Ca^{2+} 7 mM.
- VI_{B1}: Controles: 1^{er} Periodo glucosa 2'75 mM + teofilina 5 mM. 2°Periodo glucosa 16'7mM + teofilina 5 mM.
- VI_{B2}: Controles: 1^{er} Periodo glucosa 5'5mM + teofilina 5 mM. 2°Periodo glucosa 33'4 mM + teofilina 5 mM.
- VI_{B3}: 4 días de ayuno: 1^{er} Periodo glucosa 2'75 mM + teofilina 5mM. 2°Periodo glucosa 2'75mM + teofilina 5 mM.
- VI_{B4}: 4 días de ayuno: 1^{er} Periodo glucosa 5'5mM + teofilina 5mM. 2°Periodo glucosa 33'4mM + teofilina 5 mM.
- VI_{C1}: 4 días de ayuno: 1^{er} Periodo glucosa 2'75mM. 2° Periodo glucosa 16'7mM + db-AMPC 2 mM.

3º RESULTADOS.

Siguiendo la distribución de grupos ya citada en material y método, diseño experimental (pag.90), pasamos a la descripción de los resultados obtenidos en cada uno de ellos.

3.1) PERFUSIONES CONTROL.

En la fig.(9) se muestra la dinamica de secreción de insulina en un grupo control (n=5). En abscisas se representa el tiempo en minutos y en ordenadas la secreción de insulina en $\mu\text{U}/\text{min}$. La perfusión esta dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 min de duración con glucosa 2'75 mM y un 2° periodo con glucosa 16'7 mM. Al final de la perfusión se infundió noradrenalina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 2'75 mM el pancreas responde con una secreción basal de insulina que oscila levemente en 30 y 40 $\mu\text{U}/\text{min}$.

Al pasar de glucosa 2'75 mM a glucosa 16'7mM, aumenta rapidisimamente la secreción de insulina alcanzando en 4 min unos 200 μU . Siendo el máximo de secreción obtenido el de 240 μU unos 25 minuto despues de iniciada la perfusión con altos niveles de glucosa. La perfusión con noradrenalina provoca un descenso rápido de la secreción que llega a unos 80 μU en el minuto 100 de perfusión.

Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla n° 1 pag. 97.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la \bar{X} del periodo de glucosa 2'75mM es de $34'06 \pm 5'574$ μ U/min. La del periodo de glucosa 16'7mM $172'58 \pm 7'508$ μ U/min. y la del periodo con infusión de noradrenalina de $108'86 \pm 7'398$. Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

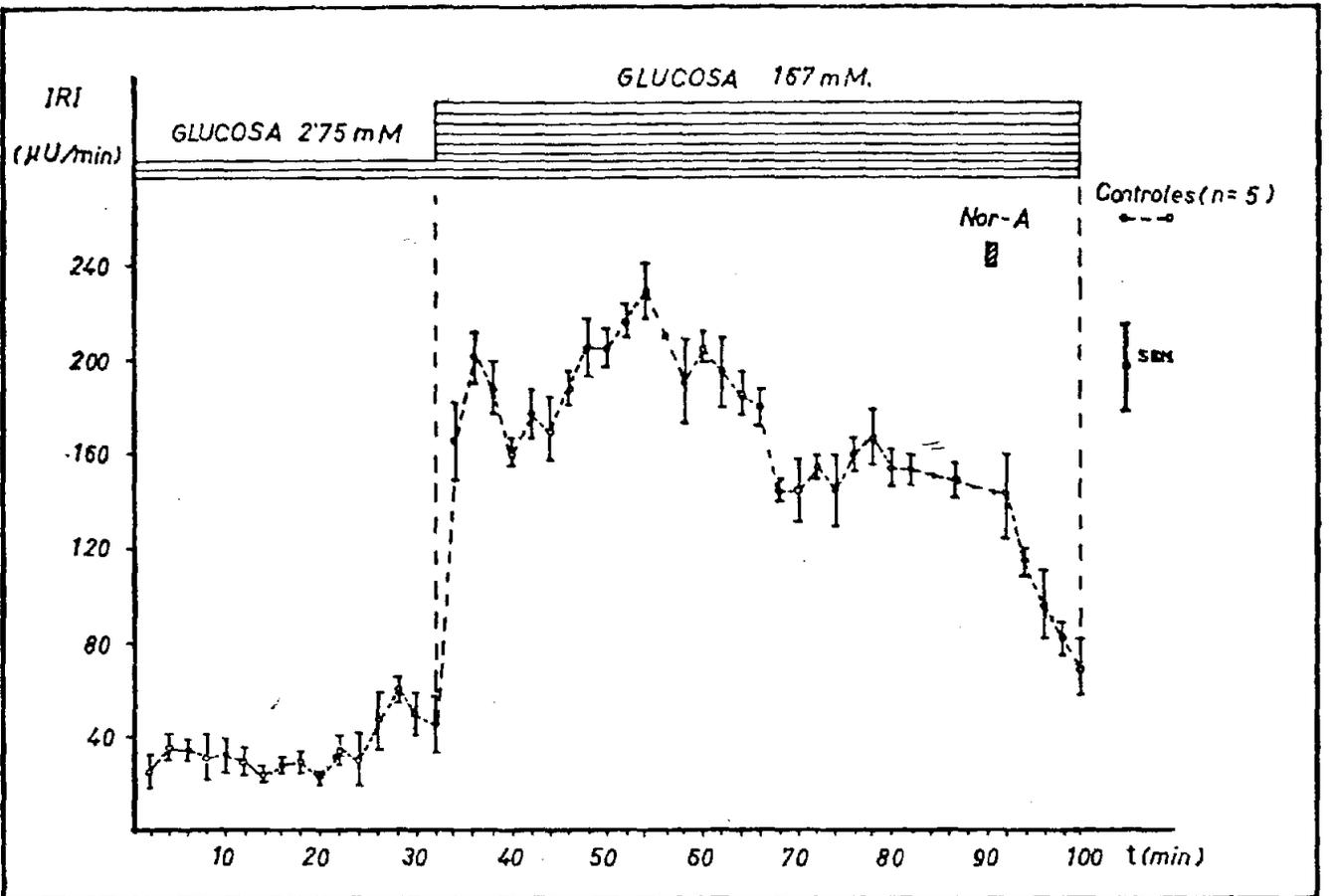


Fig. 9 ACCION DE LA GLUCOSA 2'75 Y 16'7 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO CONTROL.

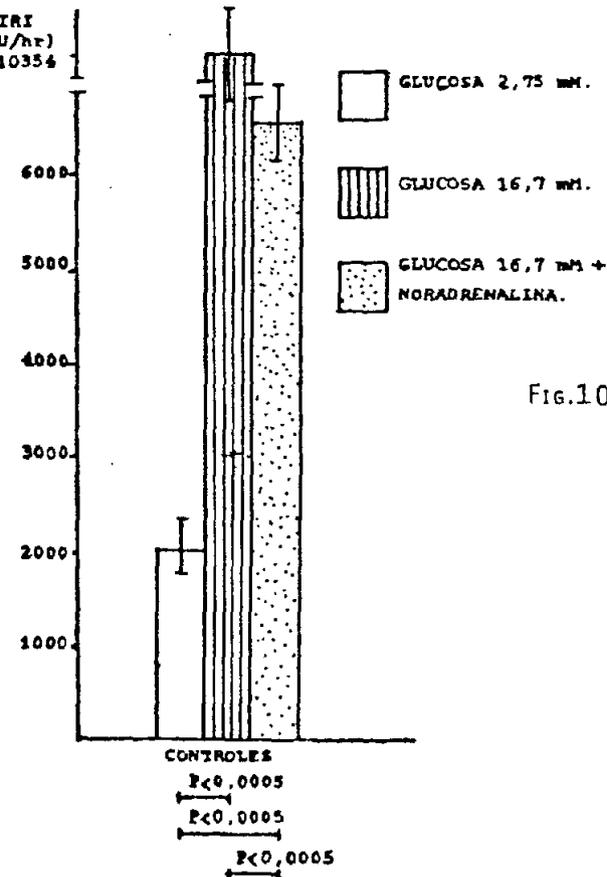


Fig.10 CONTROLES: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 2'75, 16'7 Y 16'7 mM MAS NORADRENALINA. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

TABLA 1

CONTROLES CON GLUCOSA 2'75 y 16'7 mM

Tubo n°	INSULINA (μ U/min.)					\bar{X}	SEM
1	40	32	17	27	14	26	5'350
2	53	42	30	32	23	36	5'840
3	48'5	36	31	30	28	34	4'125
4	43'0	38	30	18	21	30	5'350
5	46	37	26	32	19	32	5'159
6	43'5	36'5	11	21	30'5	28'5	6'400
7	38'5	24'6	15'9	20'5	12	22'3	5'111
8	40	34'5	18'6	24	22'5	28	4'477
9	46'5	39'5	12'5	25'5	21	29	6'914
10	33	27'5	17'5	19'5	12'5	22	4'209
11	49	40	20'4	30'3	31	34	5'411
12	51'5	35'5	13'5	30	19'5	30	8'162
13	73	53	30	47'5	36'5	48	8'316
14	81	67	43	61'5	49'5	60'4	7'461
15	68'5	56'5	35	50'5	39'5	50	6'717
16	69	58'5	25'5	42'5	34'5	46	8'838
17	193	173'5	131'5	172	170	169	11'319
18	237'5	209'5	183'6	198'5	191'0	204'2	10'429
19	211'0	200'5	167'5	194'5	176'5	190'5	8'959
20	186'3	165'0	140'0	160'0	148'0	160	8'875
21	198	180	165'0	177	170'0	178	6'314
22	197'5	177'5	147'5	169'5	159'0	170	9'625
23	211'3	195	172	193'5	178'0	190	7'740
24	220	215	195	211	200	208	5'210
25	218	214	187	209	210	207	6'025
26	244'3	223	198'5	218'5	205'5	218	8'877
27	247'0	235'5	217'5	226'5	223'5	230	5'840

28	233'5	213'5	192'5	209'5	201	210	11'317
29	212	198	178	192	180	192	6'964
30	229	204'5	195	203'5	198'5	206	8'925
31	221	203	179'5	189'5	187	196	8'175
32	206'3	197'5	169'3	181'5	175'5	186'0	7'720
33	206'0	189'5	165'5	170'5	168'5	180	8'656
34	168	154	128	141	132	144'6	8'228
35	163	158	129	140	135	145	7'390
36	172'5	161	142'5	153	144'5	154'7	6'186
37	158	151	129	148	134	144	6'050
38	181'3	165	142'5	163'5	147'5	160	7'740
39	183	177	151	170'5	161	168'5	6'365
40	180	159'5	129'5	151'5	140	152	9'625
41	169	167	135'4	145	139'3	151	7'890
42	171	157	133	151	140	150'4	7'412
43	168	152	137	149'5	138'5	149	6'194
44	163	158	126	145	138	146	7'491
45	160	155	129	144	137	145	6'354
46	168	150	129'5	140	133'5	144'2	7'698
47	139	122'5	104'5	110	106'5	116'5	7'195
48	119'5	99'5	83'8	90'0	87'4	96	7'173
49	107	84	62	80'5	76'5	82	8'092
50	87	78'0	44	72'5	61'5	68	8'326

En la fig. (11) se muestra la dinámica de secreción de insulina en otro grupo control (n=5).

La perfusión está dividida en dos periodos:

Un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 5'5mM y un 2° periodo con glucosa 33'4mM. Al final de cada perfusión se infundió noradrenalina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 5'5mM el pancreas responde con una secreción basal de insulina que oscila entre 35 y 45 μ U/min.

Al pasar de glucosa 5'5mM a glucosa 33'4mM aumenta rápidamente la secreción de insulina alcanzando en 4 minutos unos 310 μ U siendo el máximo de secreción obtenido el de 350 μ U a los 16 minutos de iniciada la perfusión con altos niveles de glucosa.

La perfusión con noradrenalina provoca un descenso rápido de la secreción que llega a 114 μ U en el minuto 100 de la perfusión.

Los valores individuales de estas perfusiones aparecen en la tabla n° 2 pag. 102.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

El nivel medio de secreción logrado con la glucosa 5'5mM en este experimento fué de $29'4 \pm 4'144$ μ U/min. y con glucosa 33'4mM fué de $314'6 \pm 2'822$ μ U/min. existiendo diferencia significativa con las anteriores

perfusiones control. La media del periodo con infusión de noradrenalina es de $147'15 \pm 1'974$ uU/min.

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

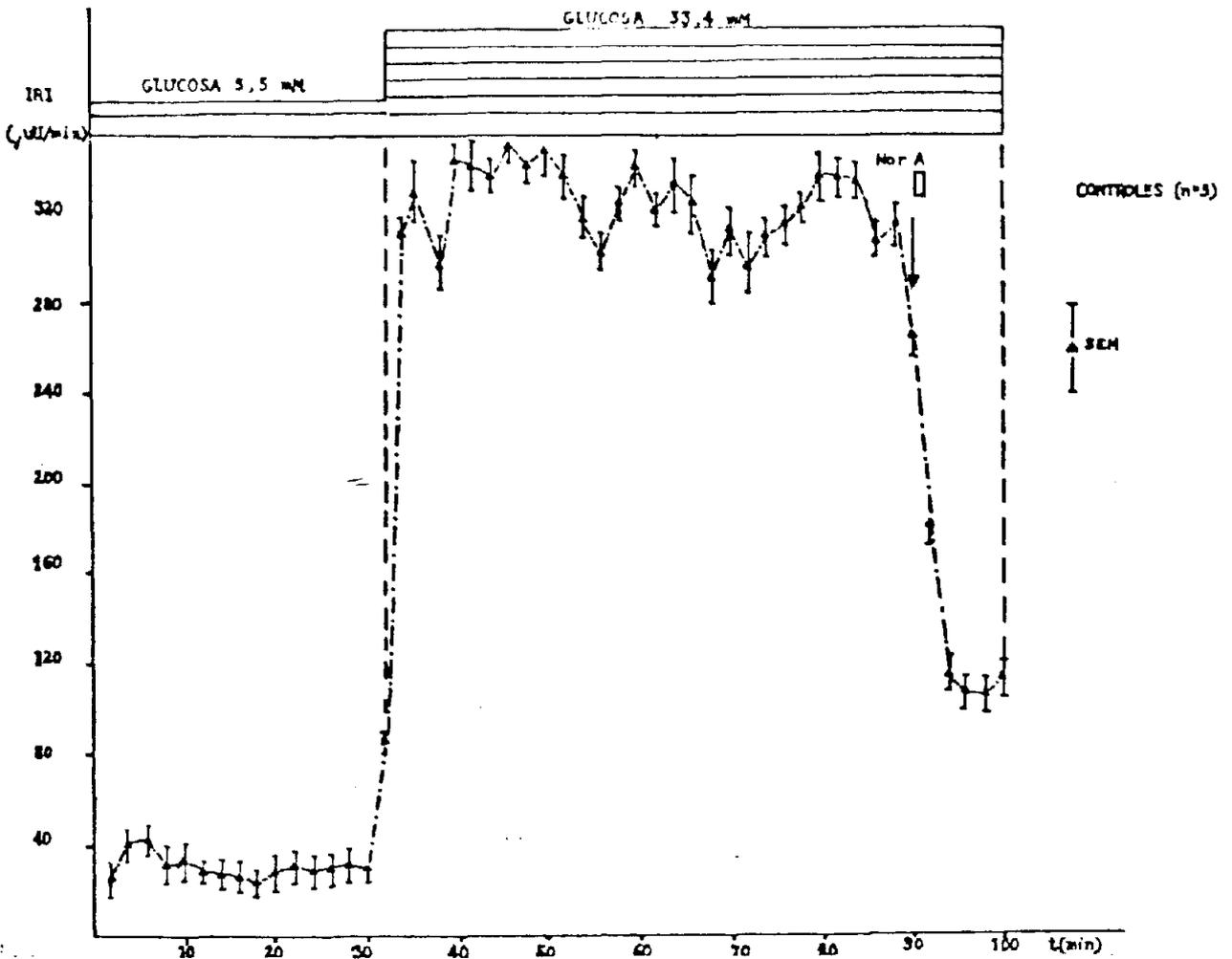


FIG.11 ACCION DE LA GLUCOSA 5'5 Y 33'4 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO CONTROL.

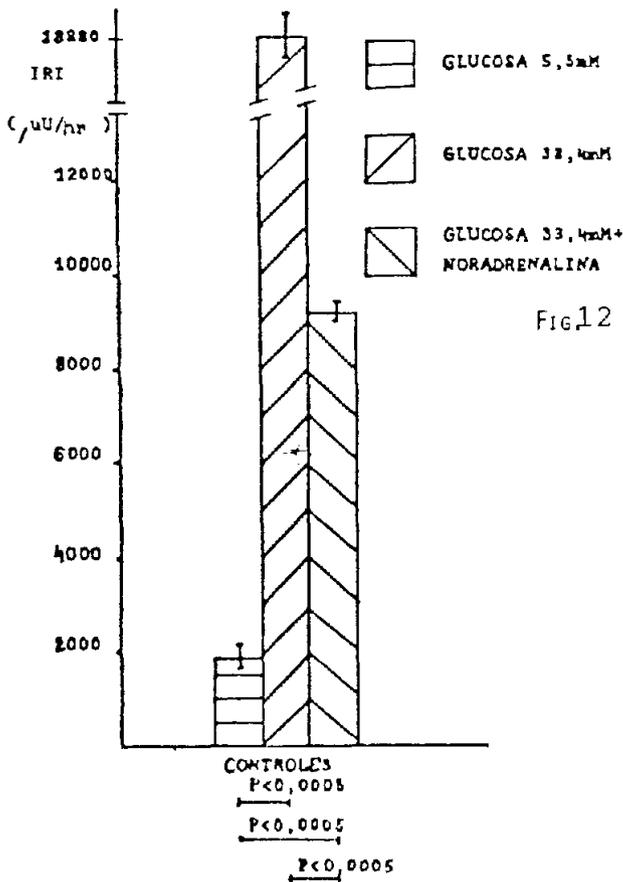
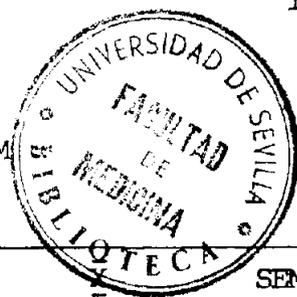


FIG.12 CONTROLES: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 5'5, 33'4 Y 33'4 mM MAS NORADRENALINA. EN ABSCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

TABLA 2

CONTROLES CON GLUCOSA 5'5 y 33'5 mM



Tubo n°	INSULINA (μ U/min.)						SEM
1	11	47	24	20	19	24'2	6'795
2	25	59	40	46	30	40	6'795
3	42	55'2	40	26'0	47'0	42	5'357
4	20	49	15	30	36	30	6'717
5	32	51	38	22	17	32	6'717
6	29'8	34'1	18'8	28	18'8	28	3'424
7	19	39	12	33	27'0	26	5'385
8	27	37	15'3	10'4	30'6	24	5'489
9	26'6	35'5	11'9	15'5	22'0	22'3	4'658
10	26'0	41'2	12	28'0	33'0	28	5'357
11	37	44'3	27	20	22'0	30	5'162
12	27	45	21	30	20	28	5'032
13	21	43	17'6	34'5	29	29	5'124
14	37	44	30	23	18	30'4	5'227
15	18	38	42	28'5	16	28'5	5'804
16	88	103	80	78	84	86'6	4'969
17	310'5	328'3	304'6	307	300	310	5'438
18	286	342	341	326	344	327'8	12'218
19	311	309	280	281	289	294	7'516
20	354	332'6	327'6	336'8	355'4	341'2	6'301
21	332'6	336'5	364'8	352	314'8	340'1	9'555
22	339	337	328	352	324	336	5'440
23	357	355	346	331	361	350	5'979
24	345	343	353	341'6	320	340'6	6'140
25	326	384	331	339	351	346'2	11'570
26	349	346	338	318	328	336	6'425

27	329	326	319	295	310	315'8	6'865
28	298	304	308	286	315	302	5'480
29	330	241	311	318	320	324	5'840
30	347	338	328	333	352'8	339'7	5'059
31	338	314'6	320'5	310	317	320	5'375
32	310	333	359	338	320	332	9'334
33	363'8	322	296	317'8	320	324	12'314
34	331	294	268	282	274	290	12'500
35	325	323	315	278	320	312'2	9'740
36	326	304	279	269	303	296'2	11'265
37	323	320	313	308	286	310	7'342
38	310	316'6	322'5	321	290'8	312	6'425
39	328	318	309	335	311	320	5'561
40	321	327	351	330	347	335'2	6'542
41	336	332	356	318	323	333	7'348
42	338	349	319	334	320	332	6'330
43	324	300'6	396'5	293	306	306	5'710
44	327	324	317	310	292	316	6'970
45	259	270	289	248	255	264'2	7'995
46	201'3	162	183'5	185	168	180	7'740
47	105	126	116	116	97	112	5'601
48	100	115	95	120	111	108	5'210
49	107	111	84	106	115	104	6'025
50	99	128	118	121	104	114	6'050

3.2) PERFUSIONES DE AYUNO Y ESTIMULACION CON GLUCOSA.

En la fig. (13) se muestra la dinamica de secreción de insulina en un grupo de 24 horas de ayuno (n=6)

La perfusión está dividida en dos periodos:

Un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 2'75mM y un 2° periodo con glucosa 16'7mM. Al final de la perfusión se infundió noradrenalina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 2'75mM el pancreas responde con una secreción basal de insulina que oscila entre 18 y 20 μ U/ min.

Al pasar de glucosa 2'75mM a glucosa 16'7mM aumenta rápidamente la secreción de insulina alcanzando a los 14 minutos unos 170 μ U siendo el máximo de secreción obtenido.

La perfusión con noradrenalina provoca un descenso rápido de la secreción que llega a unos 95 μ U en el minuto 100 de la perfusión.

Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla n° 3 pag.107.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la \bar{X} del periodo de glucosa 2'75mM es de 19'5 \pm 4'338 μ U/min. frente a 34'06 \pm 5'574 μ U/min en el control.

La del periodo de glucosa 16'7mM es de 134'2 \pm 6'596 μ U/min frente a 172'5 \pm 7'508 μ U/min en el control p.94 y la del

periodo con infusión de noradrenalina es de $103'9 \pm 8'755$ $\mu\text{U}/\text{min}$. frente a $108'8 \pm 7'39$ $\mu\text{U}/\text{min}$. en el grupo control. Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

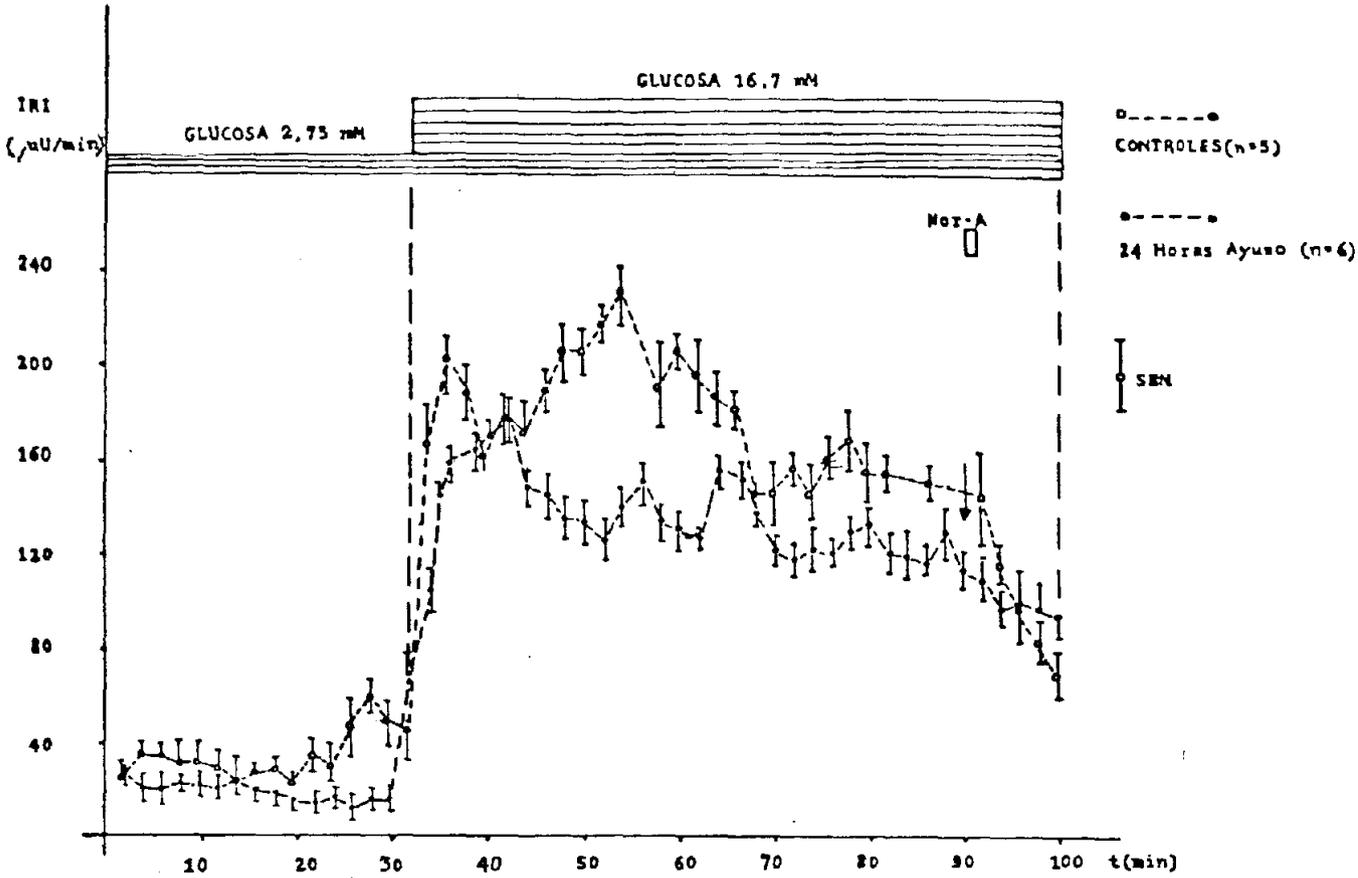


Fig.13 ACCION DE LA GLUCOSA 2'75 Y 16'7 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO DE 24 HORAS DE AYUNO.

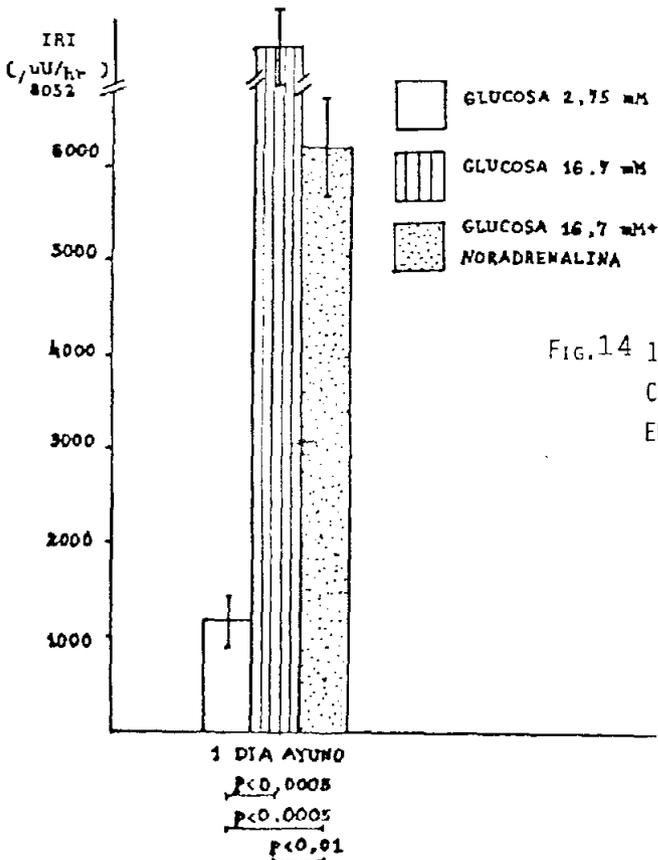


Fig.14 1 DIA DE AYUNO: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HOJA CON GLUCOSA 2'75, 16'7 Y 16'7 mM MAS NORADRENALINA. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

1 DIA DE AYUNO Y GLUCOSA 2'75 y 16'7 mM.

Tubo n°	INSULINA (μ U/min.)					\bar{X}	SEM
1	32	26	21	35	16	26'0	3'889
2	37	18	8	25	16	20'8	5'447
3	41'0	10	15	27'0	9'0	20'4	6'778
4	27'6	19'0	21'5	31'5	16'9	23'3	3'045
5	36	14'3	17'4	26	21'6	23'06	4'235
6	39	18	13'5	22	9'5	20'4	5'704
7	38'5	21'0	20'3	30'5	10'4	24'1	5'326
8	33	11'3	18'6	23	14'4	20'06	4'235
9	32	9'5	15'5	14'0	14'5	19'1	4'449
10	29	8'0	16'0	20	12'0	17'1	4'031
11	28'5	9'0	10'0	18	8'0	14'7	4'335
12	30'1	10'8	12'8	23'5	8'8	17'2	4'589
13	26'5	7'0	15'5	13'5	6'5	13'8	4'060
14	27'0	8'5	14'0	23	9'5	16'4	4'120
15	31	8'0	13'0	21	10'0	16'6	4'724
16	95	48'3	77	69	65'4	71'1	8'359
17	122'5	94'5	88	116	100	104'2	7'281
18	161	137	140	151	139	145'6	4'556
19	174	150'0	157	168	146	159'0	5'916
20	191	160	171	177'5	152'5	170'4	7'515
21	163'5	129	140'0	145	130'5	141'6	6'962
22	202'5	157'3	175	179'4	171'5	177'1	8'209
23	168	149	140	153	135	149'0	6'393
24	163	140	135	158	129	145'0	7'390
25	156'3	131'5	125'5	147'5	119'3	136'02	7'720
26	151	119'5	117	133	109'5	126'0	8'175

27	161'3	143'5	127'5	145	122'5	140'0	7'719
28	169	145	139'3	167	135'4	151'1	7'890
29	153'5	138	123'5	142'5	112'5	134	8'066
30	151'5	130	120'2	136	111'5	129'8	7'650
31	135	129'5	123'3	130'6	119'4	127'5	3'093
32	170'5	158	153	160	141	156'5	5'379
33	169	154'5	142	161'5	135'5	152'5	6'876
34	162'1	130'8	129'6	141	126'6	138'02	7'255
35	137	124'5	116'5	126	108'5	122'5	5'353
36	132	121'5	110'5	126'5	103	118'7	5'912
37	148'3	122'5	110	128'5	102	122'2	8'936
38	134	120'5	115'5	128	110	121'6	4'793
39	145	129	128'2	136	117	131'04	5'177
40	149'5	136	129	141	116	134'3	6'333
41	147'3	121'5	109	127	101	121'16	8'915
42	144	123	116	131	86'0	120'0	10'833
43	132	118'5	107'5	123	106'5	117'5	5'376
44	154'8	128'5	120'6	142	104	130	9'764
45	127	117	108	124	95'5	114'3	6'402
46	137'3	112'5	99'5	116	90'5	111'2	8'913
47	121'5	93	90'4	102'5	86'8	98'8	6'969
48	134	102	80	114'5	73'5	100'8	12'423
49	128	102	85	114	77	101'2	10'400
50	117	102'5	85'5	106	75	97'2	8'393

En la figura 15 se muestra la dinámica de secreción de insulina en un grupo de 24 horas de ayuno (n=5) . La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 5'5mM y un segundo periodo con glucosa 33'4mM. Al final de la perfusión se infundió noradrenalina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 5'5mM el pancreas responde con una secreción basal de insulina que oscila levemente entre 18 y 25 μ U/min.

Al pasar de glucosa 5'5mM a glucosa 33'4 mM aumenta rápidamente la secreción de insulina alcanzando a los 4 minutos unas 150 μ U , siendo el máximo de secreción obtenido el de 290 μ U unos 26 minutos después de iniciada la perfusión con altos niveles de glucosa.

La perfusión con noradrenalina provoca un descenso rápido de la secreción que llega a unos 120 μ U en el minuto 100 de la perfusión.

Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla n° 4 pag. 112.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la \bar{X} del periodo con glucosa 5'5mM es de $20'8 \pm 4'158$ μ U/min frente a $29'4 \pm 4'144$ μ U/min en controles

La del periodo de glucosa 33'4mM es de $233'2 \pm 6'907$ μ U/min frente a $314'6 \pm 2'822$ μ U/min en controles (p.99), la del

periodo de infusión con noradrenalina es de $127'79_{-5}'665$ frente a $147'1_{-1}'97$ uU/min en el grupo control .

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

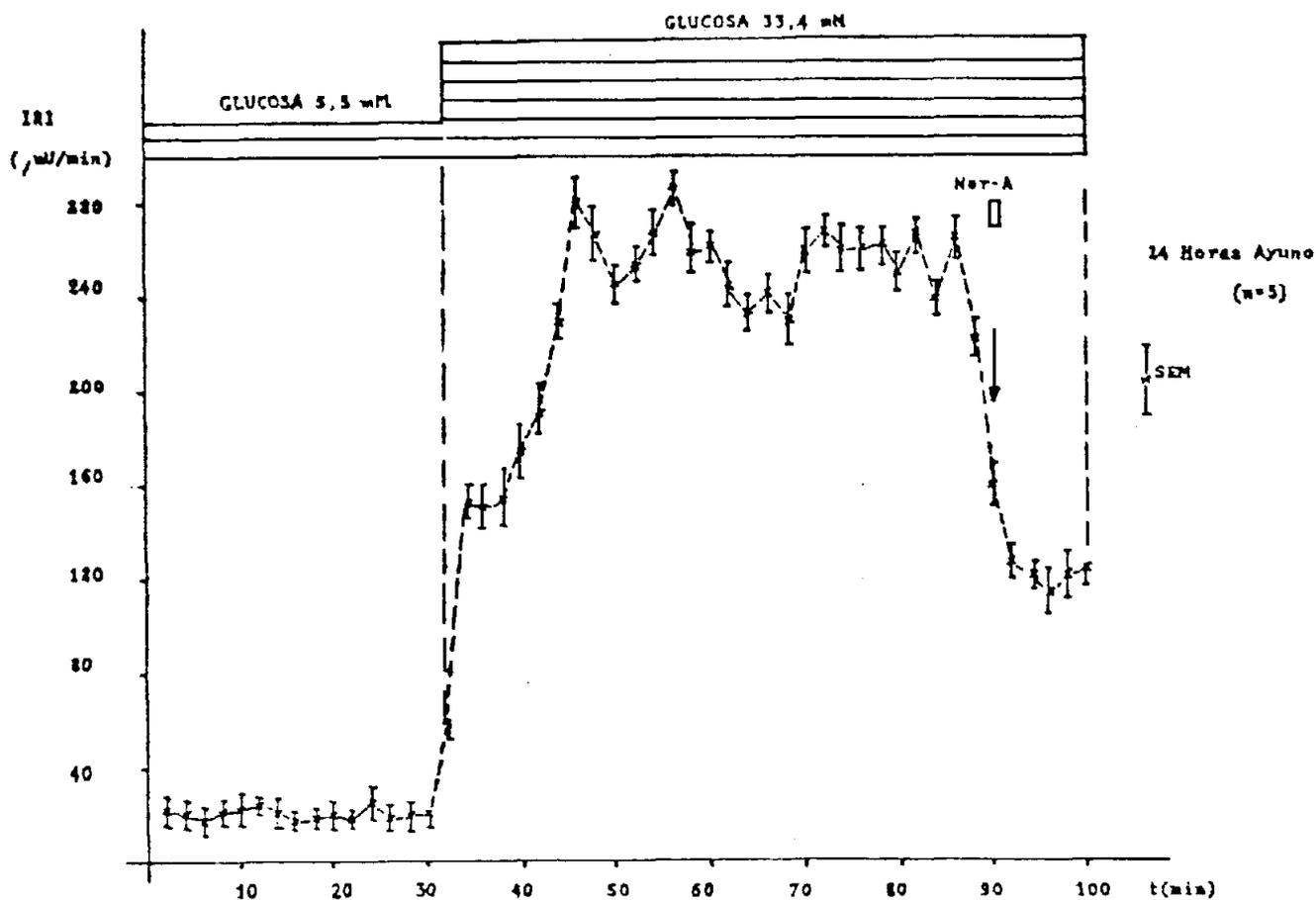


Fig.15 ACCION DE LA GLUCOSA 5'5 Y 33'4 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO DE 24 HORAS DE AYUNO.

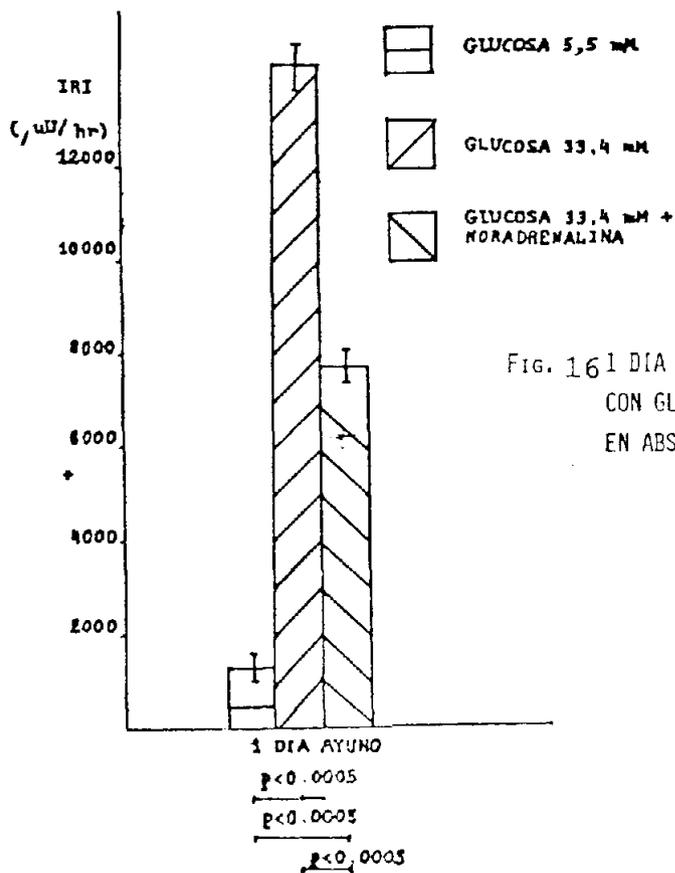


Fig. 16 1 DIA DE AYUNO: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 5'5, 33'4 Y 33'4 mM MAS NORADRENALINA. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

1 DIA DE AYUNO Y GLUCOSA 5'5 y 33'4 mM

Tubo n°	INSULINA (μ U/min.)					\bar{X}	SEM
1	11	40	16	23	19	21'8	5'538
2	10	35	17	26'5	18'5	21'4	4'800
3	9'5	30'5	17'5	21	9'0	17'5	4'454
4	10'0	19'0	15	25	21	20'0	3'807
5	11'5	38'6	14'5	27'5	18'5	22'1	5'502
6	18	32	20	26	25	24'2	2'745
7	10	38'4	19	24'4	20'5	22'5	5'177
8	14'4	28	15'8	19'5	16'5	18'8	2'724
9	11'5	31'2	14'9	20	19'4	19'5	3'727
10	10	37	13'5	20'2	19'5	20	5'193
11	12'5	27'8	15'5	21'2	18	19	2'934
12	15'3	40	18'5	30	21'5	25	4'991
13	10	30	13	23'9	20'5	19'5	4'055
14	11'5	33	14	22	19'5	20	4'194
15	10'5	31	15	26'1	23	21'1	4'154
16	48	76	51	70'5	54'5	60	6'232
17	144	170	150	166	155	157'5	5'431
18	137'4	171	141'3	169'5	145'5	153'7	7'890
19	139'5	184	142	164	157'5	157'4	9'107
20	158'3	203	173	180'4	176	178'1	8'092
21	172'5	210	182'5	201	196'5	192'5	7'477
22	217	235	225	232'5	244'5	230'8	5'197
23	257'5	312	265	290	286'5	282'2	10'820
24	246	294	263'5	278	271'5	269'5	9'360
25	230'5	260'5	233	257'5	243'5	245	6'860
26	238	267	250	258	257	254	5'396

27	254'5	291	260'5	267	263'2	267'2	7'020
28	274	307	279	289	288'5	287'5	6'314
29	243	281	250	267	259	260	7'410
30	248	276	258	264'2	260	261'2	5'086
31	229	264	237	255	240	245	6'354
32	219	254	226	239	233	234'2	6'683
33	230	261	235	245	239	242	6'194
34	204	254'8	228'5	242	220'6	230	9'760
35	236	286	250	270	258	260	9'360
36	250	278	265'5	275	271'5	268	5'542
37	245	287	250'5	268	252'5	260	10'530
38	244'5	283	250'5	272	252'0	260'4	8'165
39	244'5	290	249'5	270	251	261'0	9'442
40	237	270	240	258	245	250	6'882
41	254	283	258'5	277	262'5	267'0	6'212
42	228'1	257	232'1	248	239	240'8	5'886
43	249'5	283'5	258'5	275	260'5	265'4	6'820
44	213'5	235	218'5	227	219'0	222'6	4'225
45	148'5	180	151'5	164'5	164	161'7	6'256
46	118	146'5	120	131'2	128	128'7	5'666
47	109	133'5	116'5	127	122'5	121'7	4'718
48	90	123	93'5	117	112'5	107'5	7'319
49	102'5	145	115'5	128	121'6	122'5	7'851
50	115'5	130'5	123	128'5	127'5	125'0	5'979

En la fig. 17 se muestra la dinámica de secreción de insulina en un grupo de 4 días de ayuno ($n=5$). La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 2'75mM y un segundo periodo con glucosa 16'7mM. Al final de la perfusión se infundió noradrenalina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 2'75mM el pancreas responde con una secreción basal de insulina que oscila levemente entre 12 y 19 μ U/min.

Al pasar de glucosa 2'75mM a glucosa 16'7mM aumenta lentamente la secreción de insulina, siendo el máximo de secreción obtenido el de unos 100 μ U/ a los 58 minutos despues de iniciada la perfusión con altos niveles de glucosa.

La perfusión con noradrenalina provoca un descenso rápido de la secreción que llega a unos 50 μ U en el minuto 100 de la perfusión.

Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla nº 5 pag. 117.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la \bar{X} del periodo con glucosa 2'75mM es de $13'1 \pm 3'389 \mu$ U/min frente a $34'06 \pm 5'574 \mu$ U/min en el grupo control (p.94) La del periodo de glucosa 16'7mM

es de $55'9 \pm 7'361$ μ U/min frente a $172'5 \pm 7'508$ μ U/min en el grupo control (p.94) y la del periodo de infusión con noradrenalina es de $73'08 \pm 7'848$ μ U/min frente a $108'8 \pm 7'39$ μ U/min en el grupo control

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

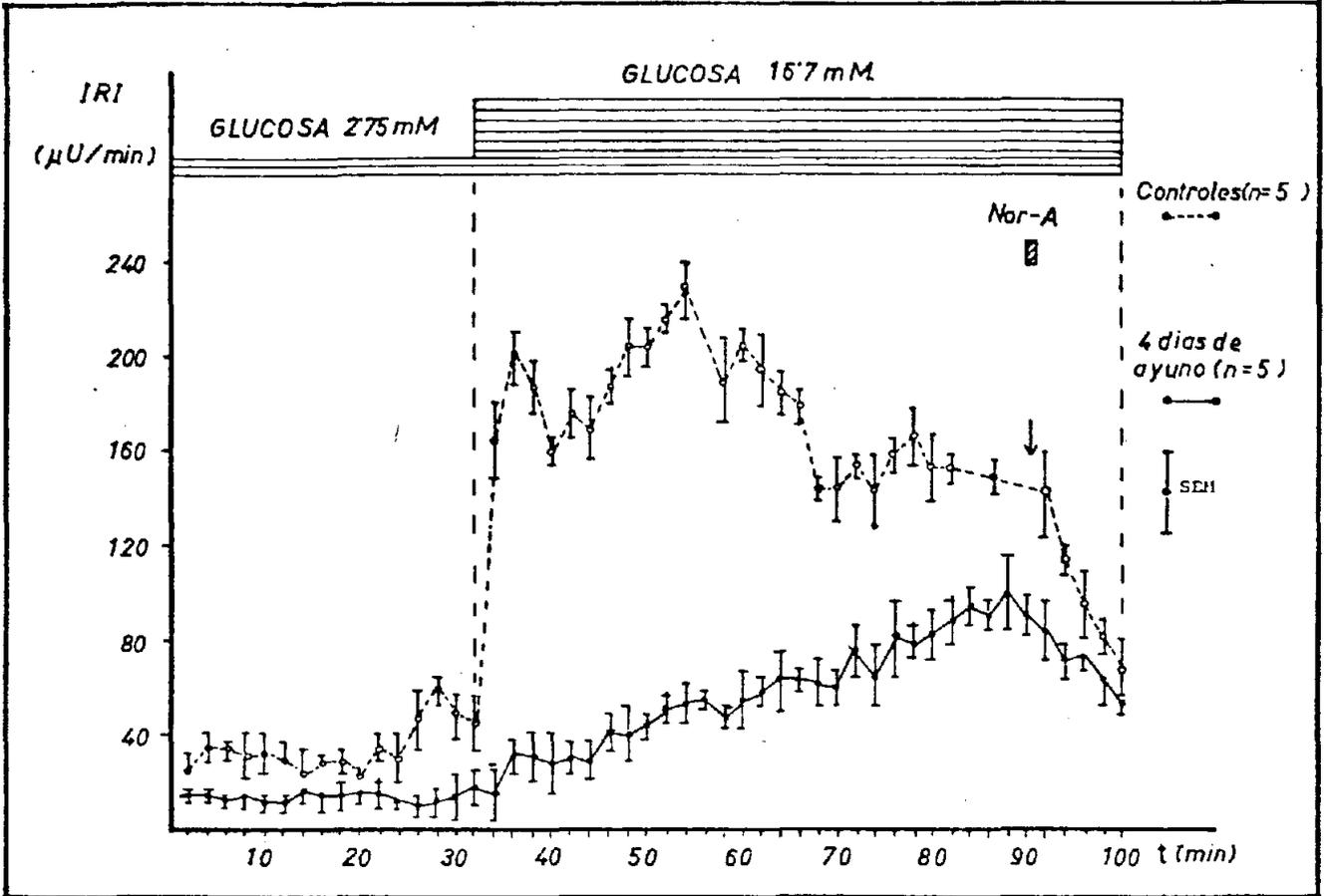


FIG. 17 ACCION DE LA GLUCOSA 2.75 Y 16.7 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO DE 4 DIAS DE AYUNO.

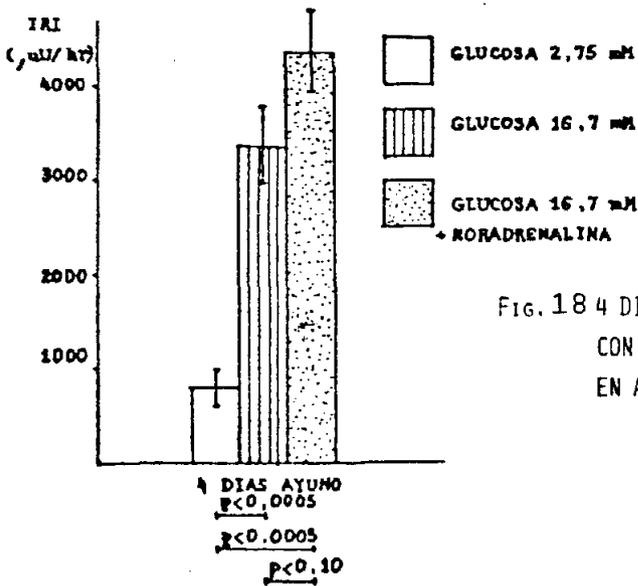


FIG. 18 4 DIAS DE AYUNO: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 2.75, 16.7 Y 16.7 mM MAS NORADRENALINA. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

4 DIAS DE AYUNO Y GLUCOSA 2'75 y 16'7 mM

tubo n°	INSULINA (μU/min.)					\bar{X}	SEM
1	16	7	29	9'0	10	14'2	4'463
2	14'0	10'5	27'0	13'5	7'5	14'5	3'729
3	15'0	8'0	22'5	5'0	9'5	12'0	3'450
4	13'6	9'5	15'2	7'4	10'0	13'1	3'550
5	12	6'0	22'0	5'5	9'5	11'0	3'494
6	19'5	7'0	10'5	5'0	8'0	10	2'833
7	19'0	9'5	27'5	8'5	15'5	16	3'872
8	19'0	9'5	22'5	7'0	12'0	14	3'264
9	17'0	6'5	24'5	8'5	13'5	14	3'588
10	21'0	10'8	23'1	8'8	11'3	15'0	3'272
11	16'0	8'5	17'5	9'0	10	14'2	4'010
12	10'3	7'5	17'6	5'0	16'0	12	3'536
13	11'0	6'5	19'0	4'5	9'0	10	2'800
14	10'0	6'0	35'0	3'5	4'5	11'8	6'601
15	17'5	8'8	20	10'8	15'7	14'5	2'329
16	24'0	8'5	33'0	5'5	19'5	18'1	5'644
17	15'0	8'0	33'3	9'0	10'5	15'1	5'244
18	39'5	14'0	58'5	17'0	33'5	32'5	9'043
19	41'5	19'5	53'5	12'0	23'5	30	8'518
20	34'0	20'4	52'5	10'3	23'5	28	8'013
21	36'0	20'5	51'0	16'5	30'0	30	6'828
22	31'8	20'0	45'2	10'0	38'0	29	7'041
23	47'0	31'0	60'0	26'0	41	41	6'717
24	34'5	29'5	61'0	27'5	47'5	40	7'044
25	55'0	30'5	68'4	20'8	32'6	44	9'793
26	57'0	46'0	61'0	31'0	55'0	50	5'979
27	56'5	40'0	79'0	33'5	51'0	52	8'790
28	60'5	45'0	78'5	38'0	49'0	54'2	7'922

29	52'5	34'5	58'0	36'5	48'5	46	5'092
30	65'0	29'0	84'0	38'0	55'0	54'2	10'905
31	63'0	43'0	78'0	50'0	57'0	58'2	6'683
32	71'0	47	85	54'0	65	64	7'412
33	73'0	39'0	82'0	56'0	68	63'6	8'326
34	78'0	46'4	80'0	50'3	56'0	62	7'890
35	63'0	48'0	79'0	50'0	60'0	60	6'194
36	76'4	72'0	99'0	54'3	69'0	74'1	8'092
37	64'5	47'0	85'0	54'0	69'5	64	7'333
38	85'5	87'0	103'3	64'0	70'0	82	7'741
39	80'0	70'0	98'0	65'0	77'0	78	6'314
40	88'0	72'0	101'0	67'0	82'0	82	6'717
41	94'5	70'5	109'3	76'0	89'5	88	7'699
42	103'0	77'5	124	67	99'5	94'2	11'214
43	94'0	67'5	131	74'5	82'0	89'8	12'518
44	106	80'5	123'0	93'5	99'6	100'5	7'851
45	98'0	65'5	120'0	73	94'5	90'2	10'820
46	89	71'5	105'3	66'5	87'5	83'9	7'719
47	79'0	49'5	100'0	60'0	71'5	72	9'629
48	74'0	69	97'0	61'0	70'0	74'2	6'795
49	70'0	55	89'0	48	59	64'2	7'995
50	60'6	45'3	67'0	40'4	57'0	54'06	5'489

En la figura 19 se muestra la dinámica de secreción de insulina en un grupo de 4 días de ayuno (n=5) . La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 5'5mM y un segundo periodo con glucosa 33'4mM. Al final de la perfusión se infundió noradrenalina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 5'5mM el pancreas responde con una secreción basal de insulina que oscila entre 15 y 20 μ U. Al pasar de glucosa 5'5mM a glucosa 33'4mM aumenta rápidamente la secreción de insulina alcanzando a los 6 minutos unas 210 μ U y siendo el máximo de secreción obtenido el de unos 220 μ U unos 24 minutos después de iniciada la perfusión con altos niveles de glucosa. La perfusión con noredrenalina provoca un descenso rápido de la secreción que llega a unos 120 μ U en el minuto 100 de la perfusión.

Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla nº 6 pag.122.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

La media \bar{X} del periodo con glucosa 5'5mM es de 17'9 \pm 4'431 μ U/min frente a 29'4 \pm 4'144 en el grupo control (p.99). La del periodo de glucosa 33'4mM es de 181'5 \pm 8'367 μ U/min frente a 314'6 \pm 2'822 μ U/min en el grupo control (p.99), la del periodo de infusión

con noradrenalina es de $127'5 \pm 7'349$ μ U/min frente a $147'1 \pm 1'974$ μ U/min en el grupo control (p.99).

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

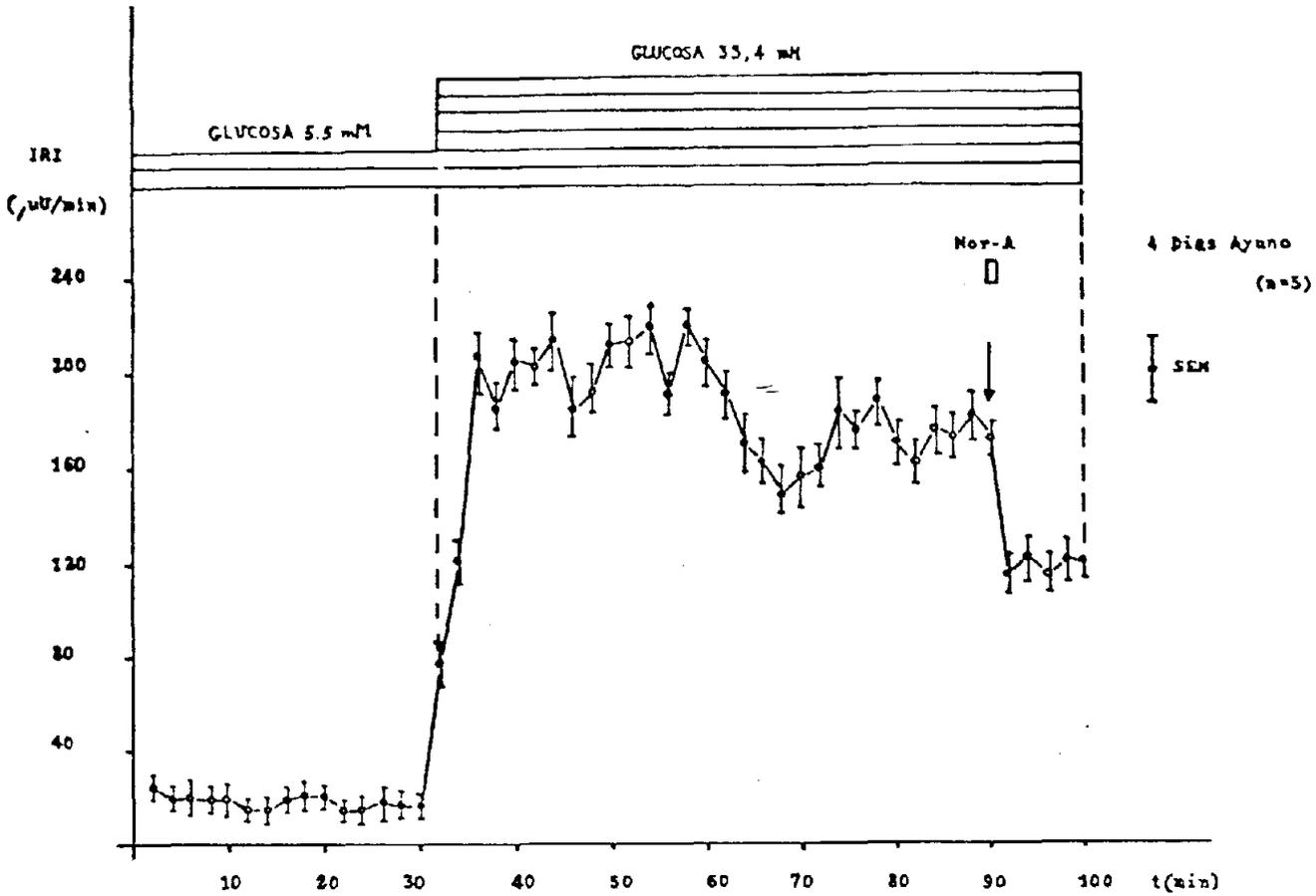


FIG. 19 ACCION DE LA GLUCOSA 5'5 Y 33'4 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO DE 4 DIAS DE AYUNO.

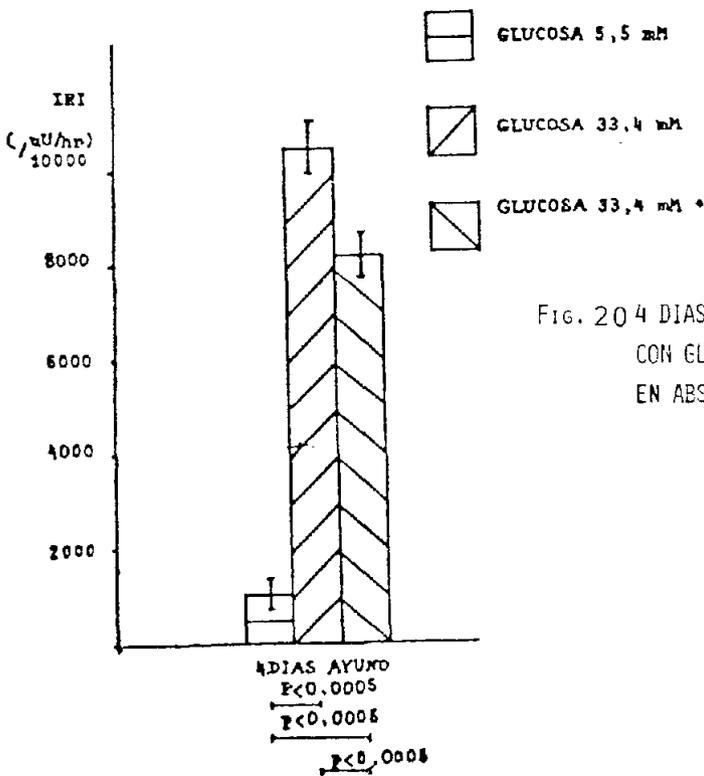


FIG. 20 4 DIAS DE AYUNO: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 5'5, 33'4 Y 33'4 mM MAS NORADRENALINA. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

4 DIAS DE AYUNO Y GLUCOSA 5'5 y 33'4 mM

Tubo n°	INSULINA (uU/min.)					\bar{X}	SEM
1	22	37	17	26	21	24'6	3'817
2	12'8	29'1	8'8	27	19'8	19'5	4'385
3	12'0	35	16'5	26	10'5	20	5'169
4	7'5	30'2	16	22'0	14'5	18'04	4'265
5	11	34'0	9'6	25'5	15'0	19'0	5'215
6	11'5	25	8'5	20	10'0	15	3'575
7	10	28'5	7'5	19'5	8'0	14'7	4'557
8	15'0	36'0	8'5	20'5	9'5	17'9	5'599
9	14'5	39'6	10'5	22'5	16'5	20'7	5'703
10	15'5	31'0	17'5	26'0	10'0	20'0	4'209
11	9'5	27'5	8'0	14'9	11'5	14'3	3'910
12	8'5	25'6	6'0	19'5	10'5	14'02	4'115
13	8'6	35'5	10'0	21'5	13'5	17'8	5'539
14	6'4	30'1	10'0	23'5	15'0	17'0	4'865
15	10	28'0	8'5	22'0	14'5	16'6	4'128
16	55'3	101	71'4	83'0	75'0	77'1	8'359
17	100'0	146'3	120'5	125'0	108'0	120'2	8'875
18	195	235	210	216	185'0	208'2	9'665
19	169	208'3	175	192	190'5	187'0	7'740
20	186'0	230'0	207	210	200	206'6	8'012
21	185'5	222	205'5	208'5	198	203'9	6'730
22	180'5	232	220'5	221'5	217	214'3	9'852
23	157	216'3	188'5	192	171	185	11'238
24	165	221'5	195	204'5	175	192'2	11'328
25	205	237'5	210	217'6	190'8	212'1	8'601
26	200	246	209	229	195	215'8	10'650

27	210'6	244'8	218'5	232	194	220	9'760
28	178	213	196'5	203	169'5	192'5	8'959
29	210	244	215'5	225	205'5	220	7'630
30	193	239	200'5	212	185'6	206'2	10'429
31	175	222	167'5	200	196'5	192'2	10'820
32	155'5	212'1	148'5	175	163	170'8	12'538
33	169	178	135	169	164	163'3	8'223
34	130'5	170'4	121'8	156	133'6	148'7	9'793
35	140	186	131	167	157	156'2	10'905
36	153'5	184	136	168	161'5	159'5	9'360
37	170	227	178	190	163'5	185'7	12'556
38	169	197	164	179	176	177	6'314
39	190'5	210'3	177	195'5	171'5	188'9	7'699
40	149'5	200	160	179	171'5	172	9'625
41	160	188	155	172	138	162'6	9'36
42	172	199	160	183	171	177	7'37
43	166'4	196	150'3	178	170	172'1	8'355
44	163'3	218	171	185'4	178	183'1	10'570
45	165	196	158	181	175	175	7'355
46	108	139	160	120	87	114	9'048
47	120'5	147'3	110	127	100	120'9	8'975
48	114'6	138	108'5	121	95'5	115'5	7'850
49	117'5	143'5	107	121'5	110'5	120	7'155
50	109'5	141	110'5	124	115	120	6'531

En la figura 21 se muestra la dinámica de secreción de insulina de los grupos control (n=5) 24 horas de ayuno (n=5) y 4 días de ayuno (n=5).

La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 5'5mM y un segundo periodo con glucosa 33'4mM. Al final de la perfusión se infundió noradrenalina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 5'5mM el páncreas responde con una secreción basal de insulina casi idéntica para los grupos de 1 y 4 días de ayuno, siendo ligeramente superior la del grupo control.

Al pasar de glucosa 5'5mM a glucosa 33'4mM aumenta rápidamente la secreción de insulina en los tres grupos alcanzando a los 4 minutos unas 300 μ U en el grupo control, 150 μ U en el grupo de 1 día de ayuno y de 120 μ U en el grupo de 4 días de ayuno.

La perfusión con noradrenalina provoca un descenso rápido de la secreción en los tres grupos estudiados, que llega a unos 120 μ U en el minuto 100 de la perfusión.

Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en las tablas n°2, 4 y 6.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Las medias del periodo con glucosa 5'5mM son de $29'4 \pm 4'144$, $20'8 \pm 4'158$ y $17'9 \pm 4'431$ μ U/min para los grupos control, 1 y 4 días de ayuno respectivamente. Las del periodo de glucosa 33'4mM son $314'6 \pm 2'822$, $233'2 \pm 6'907$ y $181'5 \pm 8'367$ μ U/min, para los grupos control 1 y 4 días de ayuno respectivamente y las del periodo de infusión de noradrenalina son de $147'1 \pm 1'974$, $127'7 \pm 5'665$ y $127'5 \pm 7'34$ μ U/min.

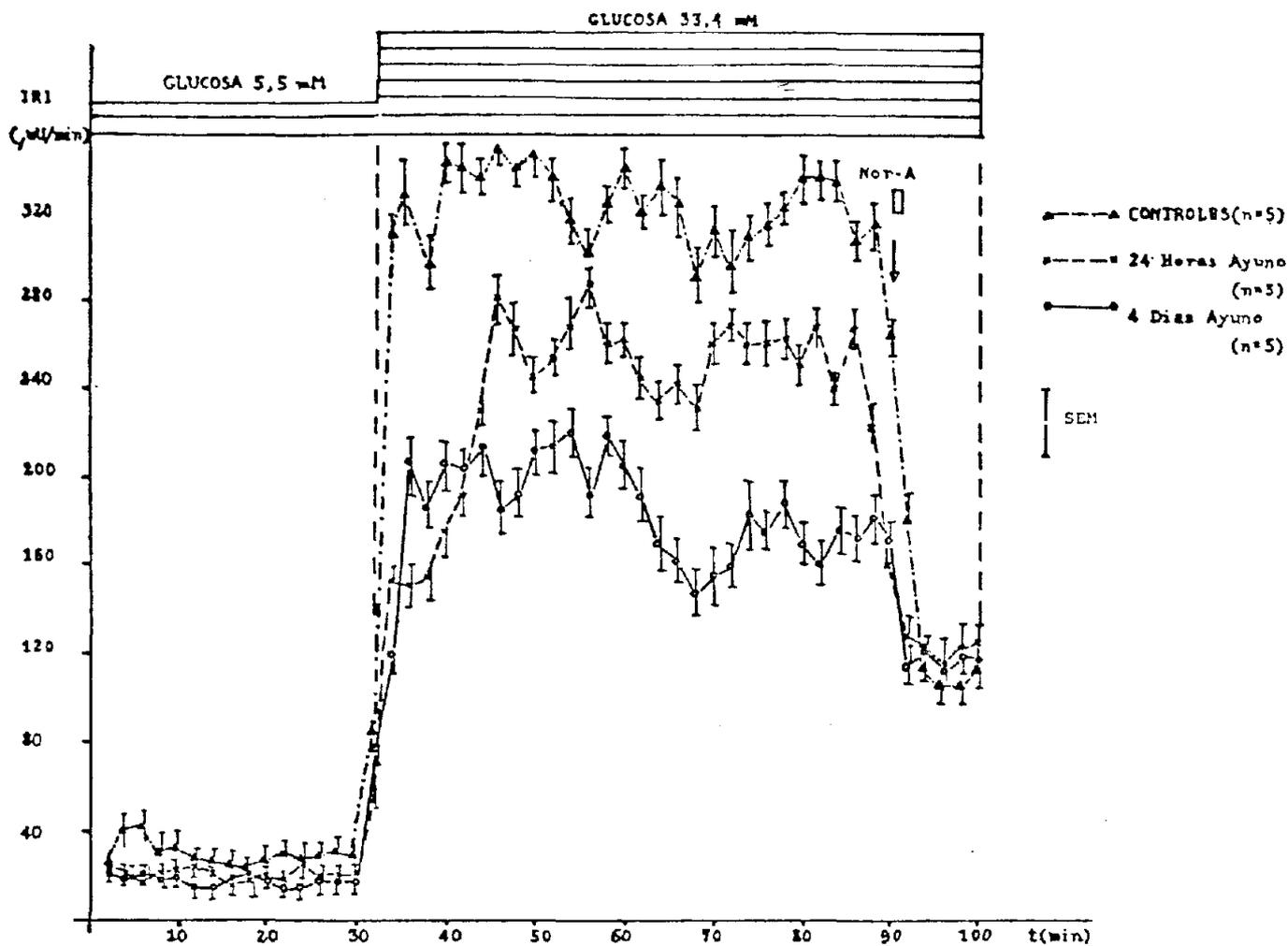


Fig.2.1 ACCION DE LA GLUCOSA 2.75 Y 16.7 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN EL GRUPO CONTROL; EL DE UNO Y CUATRO DIAS DE AYUNO.

En la figura 22 se muestra la dinámica de secreción de insulina en un grupo de 8 días de ayuno ($n=4$). La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 2'75mM y un segundo periodo con glucosa 16'7mM. Al final de la perfusión se infundió noradrenalina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 2'75mM el pancreas responde con una secreción basal de insulina que oscila levemente entre 10 y 15 $\mu\text{U}/\text{min}$. Al pasar de glucosa 2'75mM a glucosa 16'7mM aumenta ligeramente la secreción de insulina alcanzando en 4 minutos unas 40 μU , siendo el máximo de secreción obtenido el de 70 μU a los 32 minutos después de iniciado la perfusión con altos niveles de glucosa.

La perfusión con noradrenalina provoca un descenso lento de la secreción que llega a unos 20 μU en el minuto 100 de la perfusión.

Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla nº 7 y pag. 130

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los períodos antes citados.

La media del periodo de glucosa 2'75mM es de $9'56 \pm 3'148 \mu\text{U}/\text{min}$ frente a $34'06 \pm 5'574 \mu\text{U}/\text{min}$ en el grupo control (p.94). La del periodo de glucosa 16'7mM es de $44'7 \pm 7'882 \mu\text{U}/\text{min}$ frente a $172'5 \pm 7'508 \mu\text{U}/\text{min}$ en

el grupo control (p.94), la del periodo con infusión de noradrenalina de $26'2 \pm 5'575$ /uU/min frente a $108'86 \pm 7'398$ /uU/min.

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

=

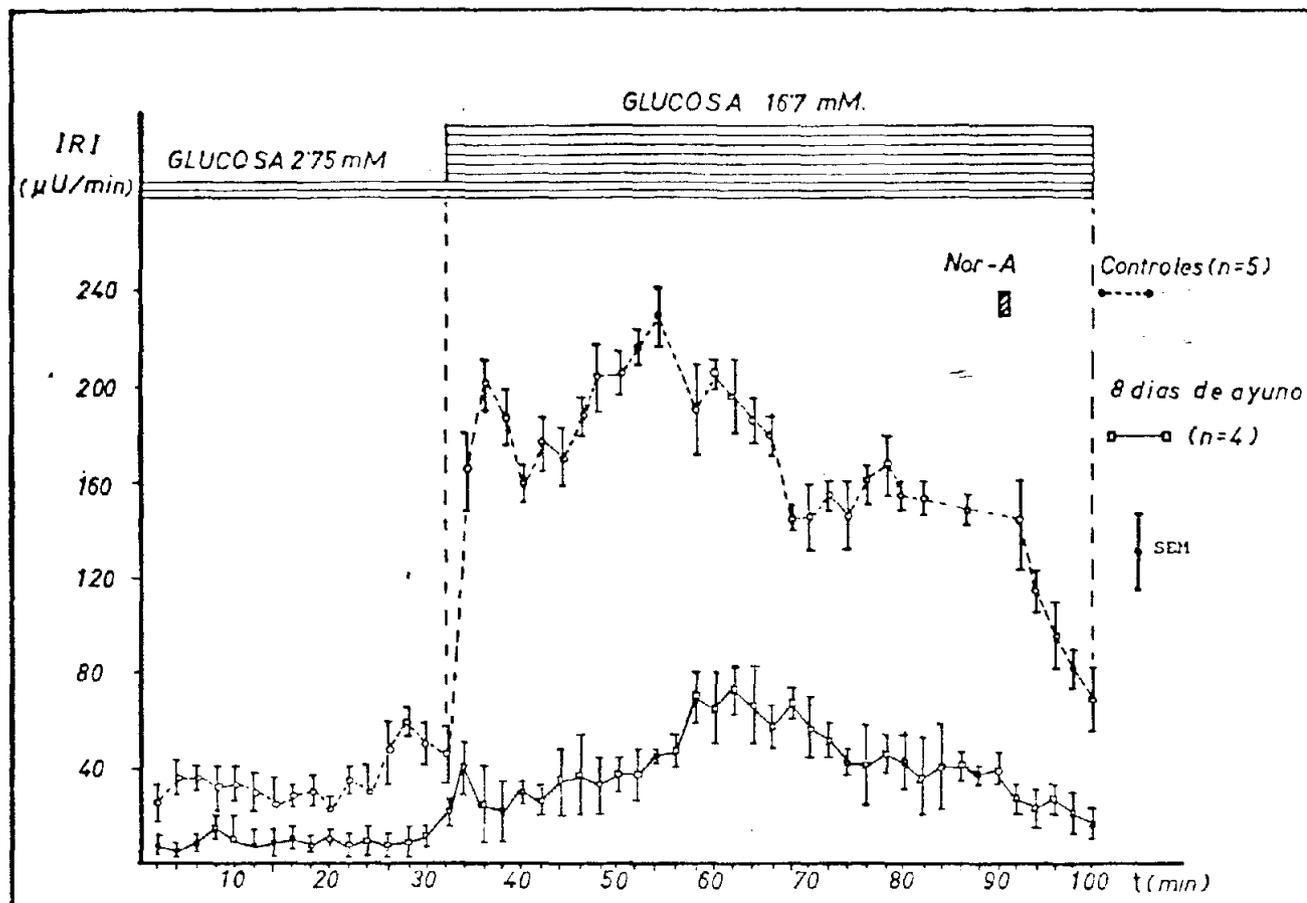


FIG.22 ACCION DE LA GLUCOSA 2.75 Y 16.7 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO DE 8 DIAS DE AYUNO.

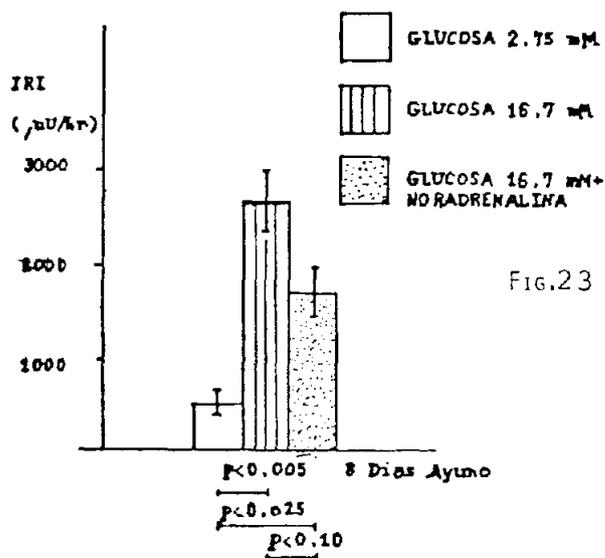


FIG.23 8 DIAS DE AYUNO; SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 2.75, 16.7 Y 16.7 mM MAS NORADRENALINA. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

8 DIAS DE AYUNO Y GLUCOSA 2'75 Y 16'7 mM.

Tubo n°	INSULINA (uU/min.)				\bar{X}	SEM
1	3'8	18'9	6'2	3	7'9	4'277
2	4	11'3	5	3'6	6	2'077
3	8	20	5	3'5	9'1	4'322
4	16	26	8	5'3	13'8	5'370
5	6'9	19'2	7	4'5	9'4	3'830
6	6	16	5'6	4	8	3'157
7	10'5	19	5	6'5	10'2	3'624
8	11	19'2	9'5	6	11'4	3'227
9	9'6	16'7	6'3	3'3	8'9	3'323
10	9'5	20	6'5	4'5	10'1	3'979
11	6	18	7	4'4	8'8	3'575
12	10'5	19'5	6	4	10	3'979
13	6'5	16	5'5	3'8	8	3'164
14	8'5	21	5	6	10'1	4'270
15	13'5	20	6'1	9	12'1	3'495
16	25'9	30	11'5	20'5	22	4'614
17	53	57'3	27'6	22'4	40	10'174
18	27'5	41	22	14'6	26'2	6'437
19	24'5	35'2	18	10'5	22	6'043
20	37	47	29'5	12'5	31'5	8'403
21	27	48'2	20	17	28	8'124
22	44'5	59'5	25'5	14'5	36	11'532
23	40	54	32'5	19'5	36'5	8'323
24	41'5	52'5	21'2	12'5	31'9	10'579
25	39'5	62	27	23'5	38	10'052
26	37	61	30	25	38'2	9'206
27	48	70	35	31	46	10'143

28	45'5	75'3	41	33'2	48'7	10'631
29	73	91'3	63	52'2	69'8	9'594
30	58'5	90'5	63	53'5	66'3	9'551
31	85	97	65'5	57'5	76'2	10'404
32	67	91	60'5	54'5	68'2	9'239
33	58	87	53	45'2	60'8	10'532
34	63	96	57'5	54'5	67'7	11'061
35	59	76	49'5	40'5	56'2	8'763
36	55	65	52	36	52	6'943
37	45'5	61	39'5	31	44'3	7'304
38	45'3	68'3	32'3	25'7	42'9	10'848
39	43'8	72'1	39'6	36'6	48	9'422
40	56	69'5	30	21'5	44'2	12'893
41	44	60	31	12	36'7	11'732
42	40'5	75'5	29'5	14'5	40	14'985
43	45	56	32'5	28'5	40'5	7'214
44	41	54	30'5	26'5	38	7'098
45	47	55	35	23	40	8'083
46	33	42	25	16	28	6'411
47	28	39	18	11	24	7'039
48	31	42	24	17	28'5	6'155
49	27	30	13	10	20	5'754
50	16	30'2	10	8	16	5'789

3.3) PERFUSIONES DE AYUNO Y ESTIMULACION CON ARGININA.

La arginina es un conocido potenciador de la secreción de insulina producida por glucosa.

Es capaz de superar la respuesta insulina-secretora máxima producida por la glucosa.

Durante toda la perfusión se utiliza glucosa 2'75mM.

El motivo de la utilización de glucosa en concentraciones basales se debe al papel permisivo de esta para provocar la secreción de insulina estimulada por otros agentes insulino-secretorees (entre ellos la arginina).

En la figura 24 se muestra la dinámica de la secreción de insulina en un grupo control (n=6).

La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 2'75mM y un segundo periodo con glucosa 2'75mM+arginina 5mM, al final de la perfusión se suprimió la arginina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 2'75mM el pancreas responde con una secreción basal de insulina que oscila levemente entre 20 y 26 μ U/min. Al pasar a glucosa 2'75mM más arginina 5mM aumenta rápidamente la secreción de insulina alcanzando a los 4 minutos 87 μ U, siendo el máximo de secreción obtenido. Al suprimir la arginina de la perfusión hay un descenso lento de la secreción de insulina, que llega a 22 μ U en el minuto 70 de la perfusión. Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla n°8 pag. 135.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la media del periodo de glucosa 2'75mM es de $23'3 \pm 0'39$ μ U/min. La del periodo de glucosa 2'75mM + arginina 5mM es de $63'69 \pm 2'109$ μ U/min y al suprimir la arginina, es de $33'07 \pm 3'990$ μ U/min. Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

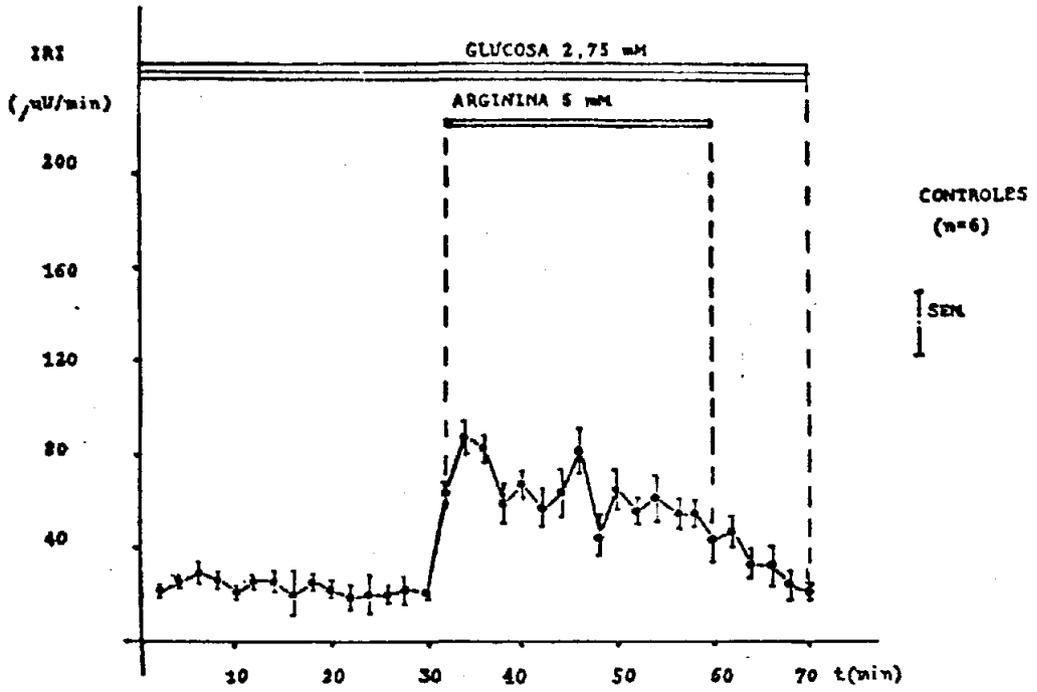


FIG.24 ACCION DE LA ARGININA 5 mM EN PRESENCIA DE GLUCOSA 2'75 mM SOBRE LA SECCION DE INSULINA EN UN GRUPO CONTROL.

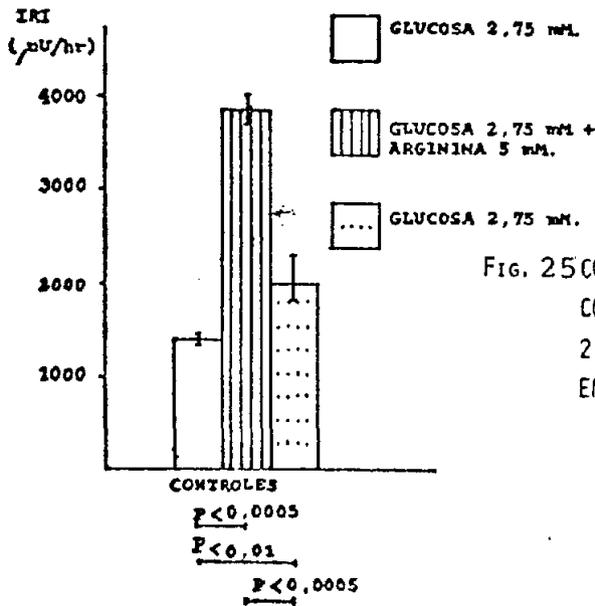


FIG. 25 CONTROLES; SECCION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 2'75 mM, ARGININA 5 mM MAS GLUCOSA 2'75 mM Y GLUCOSA 2'75 mM. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

TABLA 8

CONTROLES ARGININA 5mM CON GLUCOSA 2'75mM

Tubo n°	INSULINA (μ U/min)						\bar{X}	ESM
1	25'5	19	25	20	21'3	25	22'6	1'285
2	27'7	22'7	24	27'5	30	26'6	26'4	1'189
3	38	37'6	17'5	29	26'3	32	30	3'444
4	24'1	32'2	23	25	26	35	27'5	2'168
5	23	20	25	20	22	18'9	21'5	1'020
6	31	28	22	23'7	28'5	26	26'5	1'481
7	17	36	25	26'1	22	27'2	25'6	2'815
8	23'2	22	13'2	23'3	17	24'3	20'5	10'696
9	19'5	25	31	27	22'3	26'1	25'2	1'773
10	17'5	27'9	27'5	22'5	23'4	18'1	22'8	1'987
11	31'2	12	15'7	22'3	16	18'9	19'4	3'019
12	20	13	27	22'5	20	19	20'2	11'536
13	27	15'0	18	20	23'1	17'2	20'0	1'953
14	14	30'7	23	14	22'5	29	22'2	3'185
15	12	24	25	14	23	20	20	2'444
16	72	61	69	57	62	61'9	64	2'491
17	94'5	105	91	81	74	79	87'4	5'154
18	95	92	87	81	73	80	84'6	3'673
19	99	50	55	57	56	59	61'2	6'458
20	77	80	54	69	57	68'4	67'5	4'656
21	61'4	42'3	73'4	64	39	71'5	58'6	6'549
22	93	42	58	70	80	39	63'7	9'544
23	104	83	95	45	76	91	82'3	9'250
24	40'5	34'5	39'8	72'1	60'2	34'1	46'8	6'988
25	87'5	43'7	68'5	55'4	73'3	65	65'6	6'727
26	46	61'2	76	48	52'5	53	56'1	4'948

27	85	45	55	75	79	35	62'3	9'062
28	43	60	72	52	45	59	55'1	4'828
29	39	63	68	57	53	51	55'1	4'529
30	32	60'2	31'9	39'8	72'1	34'1	45	7'620
31	43'5	40'6	58'2	45'1	70'2	34'1	48'6	5'903
32	52	25'6	37'1	22'5	43'5	21'5	33'7	5'594
33	49'5	19'6	59	30'1	28	15'5	33'6	7'655
34	37'5	15'2	42'5	27'5	25'1	17'1	27'5	4'858
35	21	27	13	20	21'4	30	22	2'648

En la figura 26 se muestra la dinámica de secreción de insulina en un grupo control (n=2).

La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 2'75mM y un segundo periodo con glucosa 2'75mM + arginina 2'5mM, Al final de la perfusión se suprimió la arginina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 2'75mM el pancreas responde con una secreción basal que oscila entre 20 y 30 μ U.

Al pasar a glucosa 2'75mM más arginina 2'5mM apenas aumenta la secreción de insulina, alcanzando a los 4 minutos 38 μ U, siendo el máximo de secreción obtenida el de 40 μ U a los 22 minutos despues de iniciado la perfusión con arginina 2mM.

Al suprimir la arginina de la perfusión hay un lento y pequeño descenso de la secreción de insulina que llega a 15 μ U en el minuto 70 de la perfusión.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la media del periodo del glucosa 2'75mM es de $25'37 \pm 3'839$ μ U/min. La del periodo de glucosa 2'75mM + arginina 2'5mM es de $30'48 \pm 6'569$ μ U/min.

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

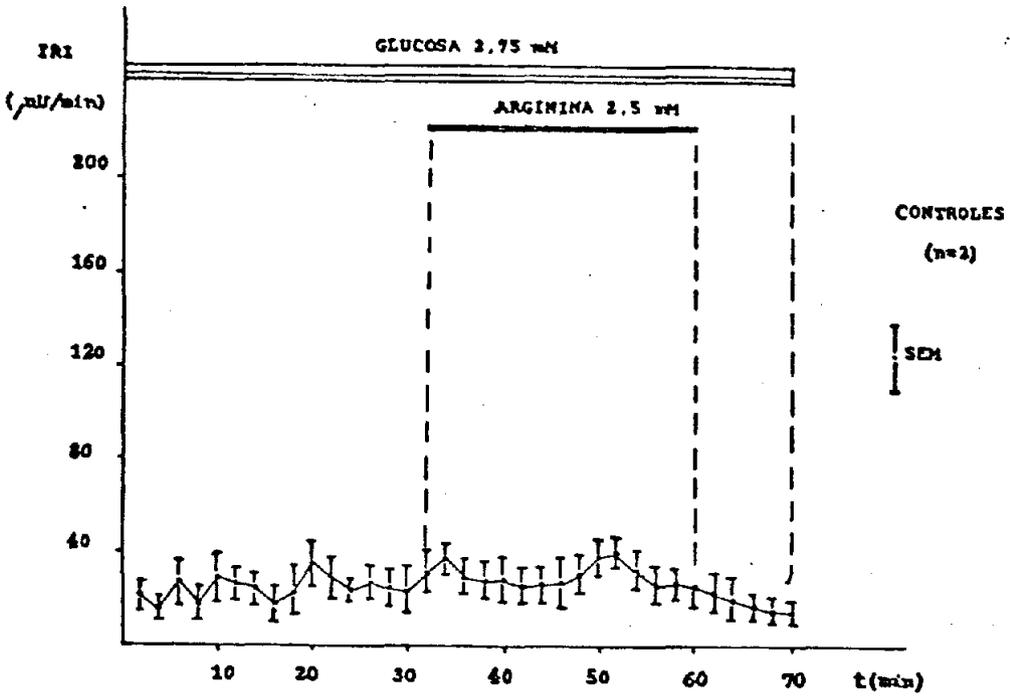


Fig.26 ACCION DE LA ARGININA 2'5 mM EN PRESENCIA DE GLUCOSA 2'75 mM EN UN GRUPO CONTROL.

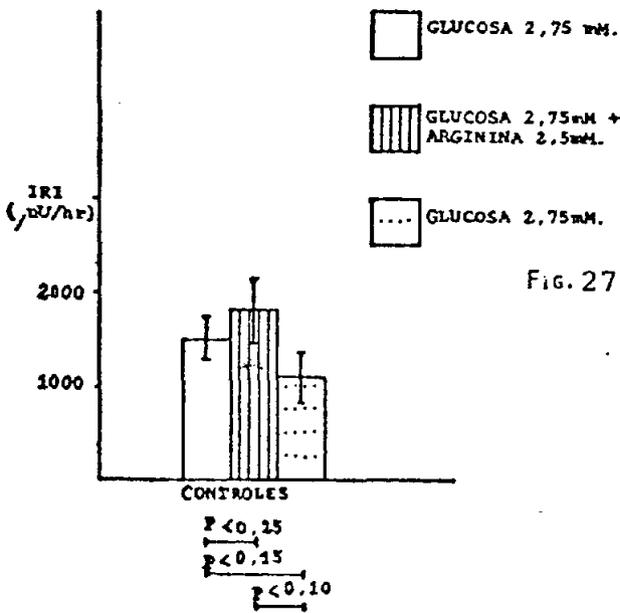


FIG. 27 CONTROLES: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HO CON GLUCOSA 2'75 mM ARGININA 2'5 mM MAS GLUCOSA 2'75 mM Y GLUCOSA 2'75 mM. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

TABLA 9

CONTROLES ARGININA 2'5 mM CON GLUCOSA 2'75mM

TUBO n°	INSULINA (/uU/min)		\bar{X}	SEM
1	25'2	18	21'6	5'091
2	15'1	20	17'5	3'464
3	21'5	34	27'7	8'838
4	15	22	18'5	4'949
5	21'9	36'6	29'2	10'394
6	25	32'7	28'8	5'444
7	23'2	30'4	26'8	5'091
8	23	14'2	18'7	6'222
9	18	28	23	7'071
10	31	40'9	36	7'000
11	24	36	30	8'485
12	28	21	24'5	4'949
13	24	31'6	27'6	5'374
14	22	31	26'5	6'363
15	18	30	24	8'485
16	27	38	32'5	7'778
17	35	42'6	38'8	5'374
18	26'2	35	30'6	6'222
19	23	32'7	27'8	6'858
20	22'5	35	28'7	8'838
21	21'6	30'6	26'1	6'363
22	22	30	26	5'656
23	21'5	34	27'7	8'838
24	27	36	31'5	6'363
25	32'8	41'7	37'5	6'293
26	37'6	43	40'3	3'818

27	28	37'7	32'8	6'858
28	20'4	30	25'2	6'788
29	23	30	26'5	4'949
30	20	30'7	25'3	7'566
31	20	28'5	24'2	6'010
32	15	25	20	7'071
33	15'5	21'9	18'7	4'525
34	10'4	18	15'2	3'959
35	12'8	17'2	15	3'111

En la figura 28 se muestra la dinámica de secreción de insulina en un grupo control ($n=3$)

La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 2'75mM y un segundo periodo con glucosa 2'75mM + arginina 15mM, al final de la perfusión se suprimió la arginina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 2'75mM el pancreas responde con una secreción basal que oscila entre 16 y 30 μ U/min. Al pasar a glucosa 2'75mM más arginina 15mM aumenta bruscamente la secreción de insulina alcanzando a los 4 minutos 170 μ U, siendo el máximo de secreción obtenida el de 204 μ U unos 22 minutos después de iniciada la perfusión con arginina 15mM. Al suprimirse la arginina de la perfusión hay un descenso rápido de la secreción de insulina que llega a 48 μ U, en el minuto 70 de la perfusión.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la media del periodo de glucosa 2'75mM es de 25'33⁺₃'296 μ U/min. La del periodo de glucosa 2'75mM + arginina 15mM es de 171'93⁺₉'707 μ U/min, y al suprimir la arginina es de 68'97⁺₈'420 μ U/min.

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

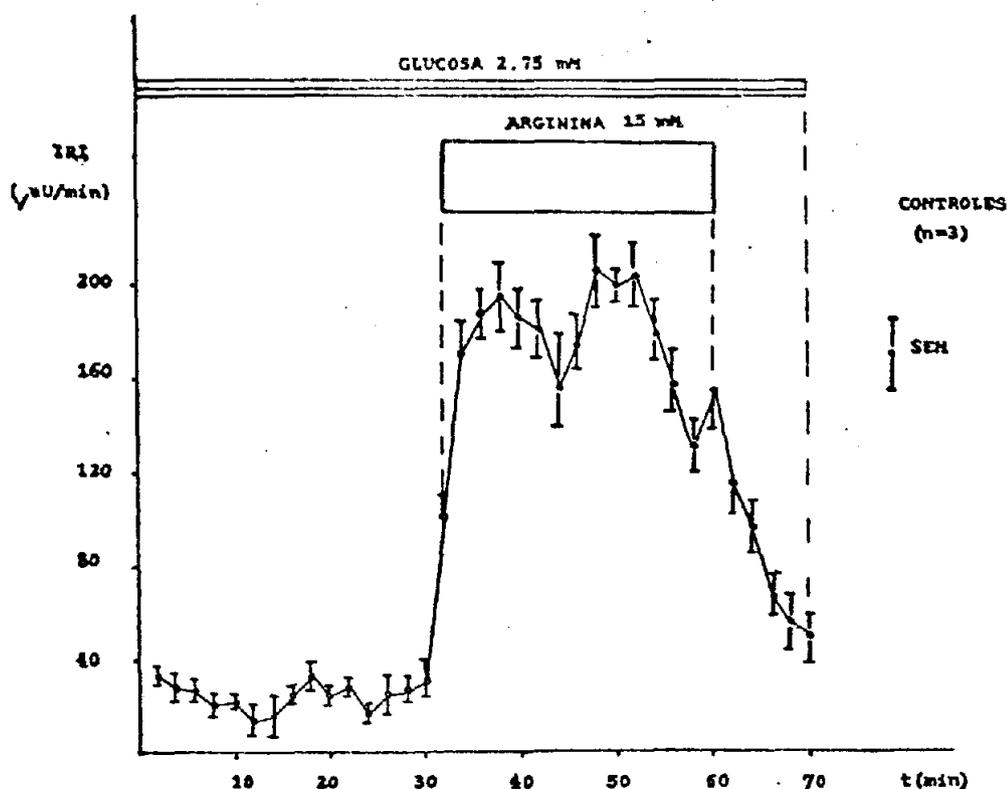


FIG. 28 ACCION DE LA ARGININA 15 mM EN PRESENCIA DE GLUCOSA 2'75 mM EN UN GRUPO CONTROL.

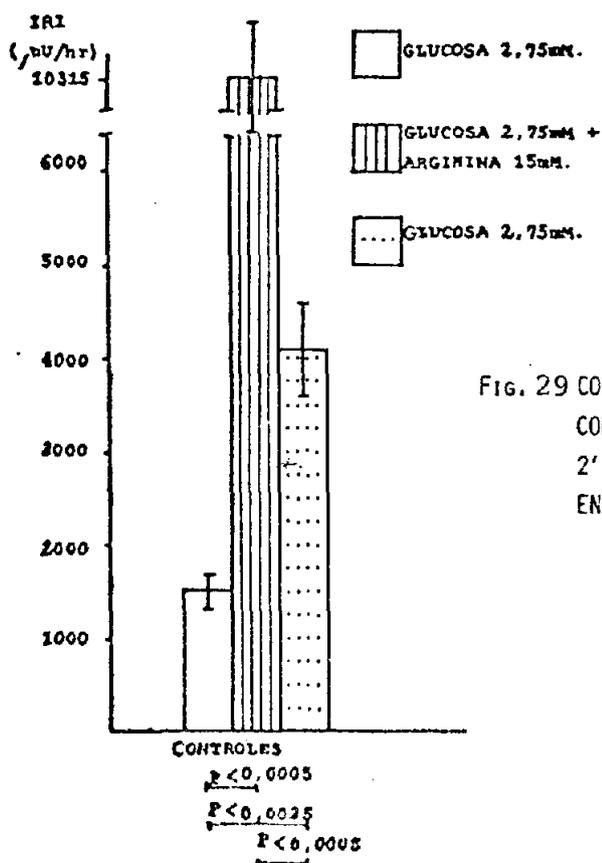


FIG. 29 CONTOLES: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 2'75mM, ARGININA 15 mM MAS GLUCOSA 2'75 mM Y GLUCOSA 2'75 mM. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

TABLA 10

CONTROLES, ARGININA 15mM CON GLUCOSA 2'75mM

Tubo n°	INSULINA (uU/min.)			\bar{X}	SEM
1	37	30'4	34'6	34	2'362
2	27	24	35'2	28'7	4'099
3	27	23'5	34	28'1	3'780
4	20	17	26	21	3'240
5	20	21'3	25	22'1	1'834
6	8	15	22	15	4'949
7	13'2	10	19'2	16'7	7'272
8	26'1	22	27'2	25'1	1'937
9	26'3	37'6	38	33'9	4'697
10	23	22'5	29	24'8	2'557
11	27'5	26'5	31	28'3	1'670
12	15'7	16	18'9	16'9	1'249
13	19'4	22'5	37'5	26'4	6'845
14	22'6	25	32'7	26'7	3'731
15	24'8	28'5	40'4	31'2	5'764
16	90'9	113	97	100	8'070
17	115	190	164	169'6	12'851
18	183	180	199	187'3	7'223
19	186	177'1	218	183'7	15'211
20	180	171	206	185'6	12'853
21	175	164	201	180'5	13'437
22	130	167'5	175	157'5	17'050
23	162'8	173	189'4	175	9'490
24	187	202	230	206'3	15'434
25	193	202	206	200'3	4'708
26	192	196'5	226'3	204'9	13'182

27	166'2	171	199	178'7	12'527
28	142'8	153	169'4	155'5	9'490
29	118'2	123	151	130'7	12'069
30	150	133	178	153'5	16'069
31	98	114	132	114'6	12'028
32	83'6	108'3	99	96'9	8'821
33	58'8	64'8	76'7	66'7	6'442
34	25'4	29'6	54	36'3	10'921
35	18'4	30'5	41'5	30'1	8'171

En la figura 30 se muestra la dinamica de secreción de insulina en un grupo control de 4 dias de ayuno (n=4).

La perfusión esta dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 2'75mM y un segundo periodo con glucosa 2'75 mM + arginina 2'5mM. En el minuto 60 de la perfusión se suprimió la arginina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 2'75mM el pancreas responde con una secreción basal de insulina que oscila entre 9 y 13 μ U. Al pasar a glucosa 2'75 mM + arginina 2'5 mM hay un pequeño aumento en la secreción de insulina alcanzando a los 4 minutos 23 μ U y manteniendose con muy pequeñas modificaciones.

Al suprimir la arginina en el minuto 60 de la perfusión hay un descenso de la secreción de insulina. En el minuto 70 de la perfusión, la secreción es de 7'2 μ U.

Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla n°11 pag.147.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la media del periodo de glucosa 2'75 mM es de $11'19 \pm 1'779 \mu\text{U}/\text{min}$. La del periodo de glucosa 2'75 mM + arginina 2'5 mM fue de $17'67 \pm 3'602 \mu\text{U}/\text{min}$ y al suprimir la arginina y continuar la perfusión con glucosa 2'75 mM solala media fue de $9'81 \pm 1'897 \mu\text{U}/\text{min}$.

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

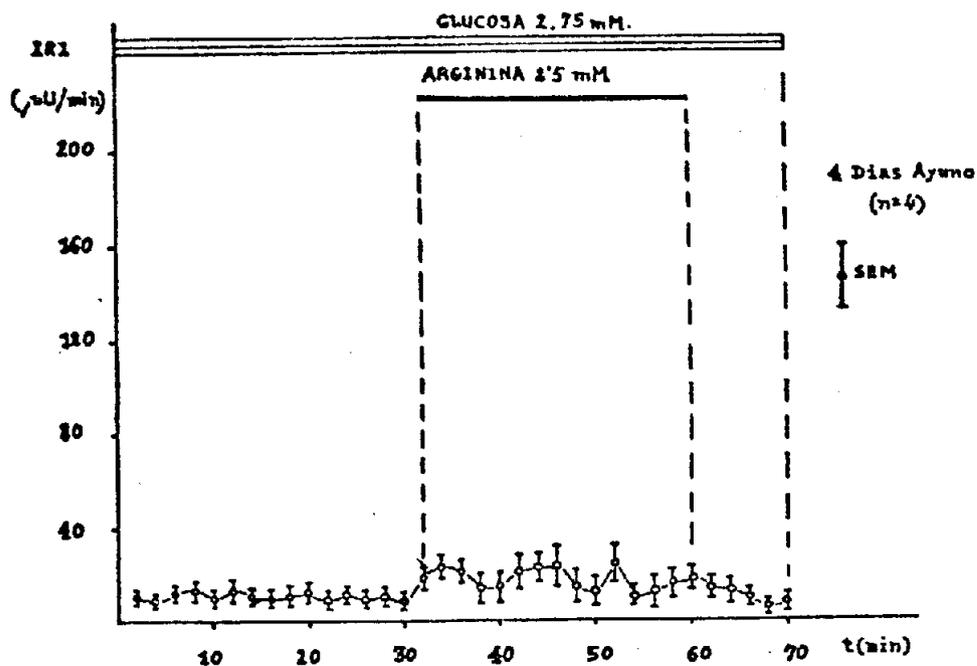


FIG.30 ACCION DE LA ARGININA 2.5mM EN PRESENCIA DE GLUCOSA 2.75mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO DE 4 DIAS DE AYUNO.

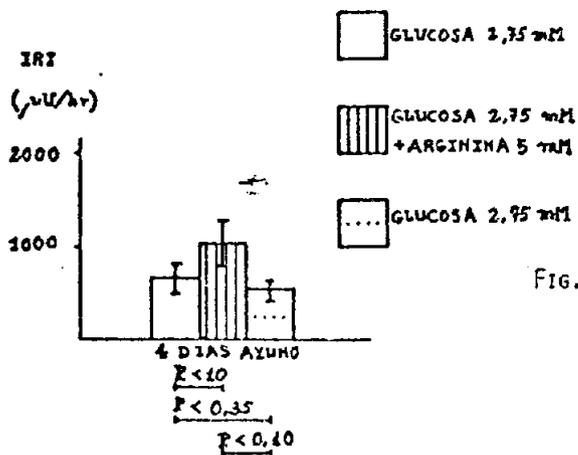


FIG.31 4 DIAS DE AYUNO: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 2.75mM, GLUCOSA 2.75mM MAS ARGININA 2.5 mM Y GLUCOSA 2.75mM. EN ABSCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

4 DIAS DE AYUNO Y GLUCOSA 2'75mM Y ARGININA 2'5mM

Tubo n°	(Insulina μ U/min)				\bar{X}	SEM
1	11'8	14'3	8'4	9'8	11	1'479
2	12'3	15'07	8'3	8'3	10'9	1'910
3	13'8	15'2	8'8	11'8	12'4	1'602
4	15'8	21'8	8'3	9'8	13'92	3'562
5	10'8	15'1	7'3	9'3	10'6	1'911
6	14	20'7	8'6	10'6	13'4	3'064
7	11'2	16'3	8'3	9'37	11'3	2'047
8	11'4	13'8	7'2	7'8	10	1'797
9	9'8	18'3	7'47	8'5	11	2'856
10	14'4	17'5	7'57	9'8	12'29	2'604
11	10'8	12'1	6'2	10'4	9'8	1'475
12	12'8	14'8	7'8	10'8	11'5	1'720
13	9'1	15'4	7'2	7'8	9'8	2'175
14	11'8	15'3	7'4	8'2	10'6	2'095
15	9'8	11'8	6'8	6'8	8'8	1'414
16	17'8	22'1	10'2	17'4	16'8	2'847
17	22'9	32'2	20'3	16'6	23	3'869
18	22'1	31'1	18'4	16'8	22'1	3'693
19	15'1	26'1	9'42	5'8	14'1	5'118
20	18'1	24'8	6'9	12'5	15'5	4'424
21	22'3	32'8	17'8	9'8	20'6	5'539
22	23'1	32'1	15'8	17'4	22'1	4'252
23	25'3	36'3	13'2	14'3	22'2	6'252
24	17'7	23'4	3'3	12'3	14'1	4'936
25	13'1	22'1	7'4	5'8	12'1	4'252
26	28'4	37'3	17'3	13'7	24'1	6'210

27	14'8	10'8	9'8	6'8	10'5	1'907
28	20	22'3	2'8	3'8	12'2	5'979
29	20'8	25'3	10'4	11'8	17	4'135
30	23'8	20'8	10'8	17	18'1	3'136
31	20'7	18'7	8'2	11'2	14'7	3'440
32	20'7	17'2	8'7	3'7	12'5	4'486
33	13'7	8'4	9	6'5	9'4	1'765
34	9	4'7	2'3	4'8	5'2	1'607
35	9'4	6	4'7	8'7	7'2	1'172

En la figura 32 se muestra la dinámica de secreción de insulina en un grupo de 4 días de ayuno (n=6). La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 2'75mM y un segundo periodo con glucosa 2'75mM + arginina 5mM. Al final de la perfusión se suprimió la arginina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 2'75mM el pancreas responde con una secreción basal de insulina que oscila levemente entre 15 y 25 μ U/min. Al pasar a glucosa 2'75mM + arginina 5mM aumenta la secreción de insulina alcanzando a los 6 minutos 49 μ U, siendo el máximo de secreción obtenido el de 52 μ U a los 22 minutos despues de iniciada la perfusión con arginina.

La supresión de arginina en el minuto 60 de la perfusión, provoca un descenso de la secreción de insulina que llega a 18'1 μ U en el minuto 70 de la perfusión.

Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla n°12 pag.152.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la media del periodo de glucosa 2'75mM es de 18'53 \pm 0'804 μ U/min frente a 23'3 \pm 0'39 μ U/min en el grupo control

La del periodo de glucosa 2'75mM + arginina 5mM fué de 36'56 \pm 1'555 μ U/min frente a 63'6 \pm 2'10 μ U/min en el

grupo control (p.132) al suprimir la arginina y continuar la perfusión con glucosa 2'75mM sola, la media fué de $23'9 \pm 3'200$ μ U/min frente a $33'0 \pm 3'99$ μ U/min en el grupo control (p.132).

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

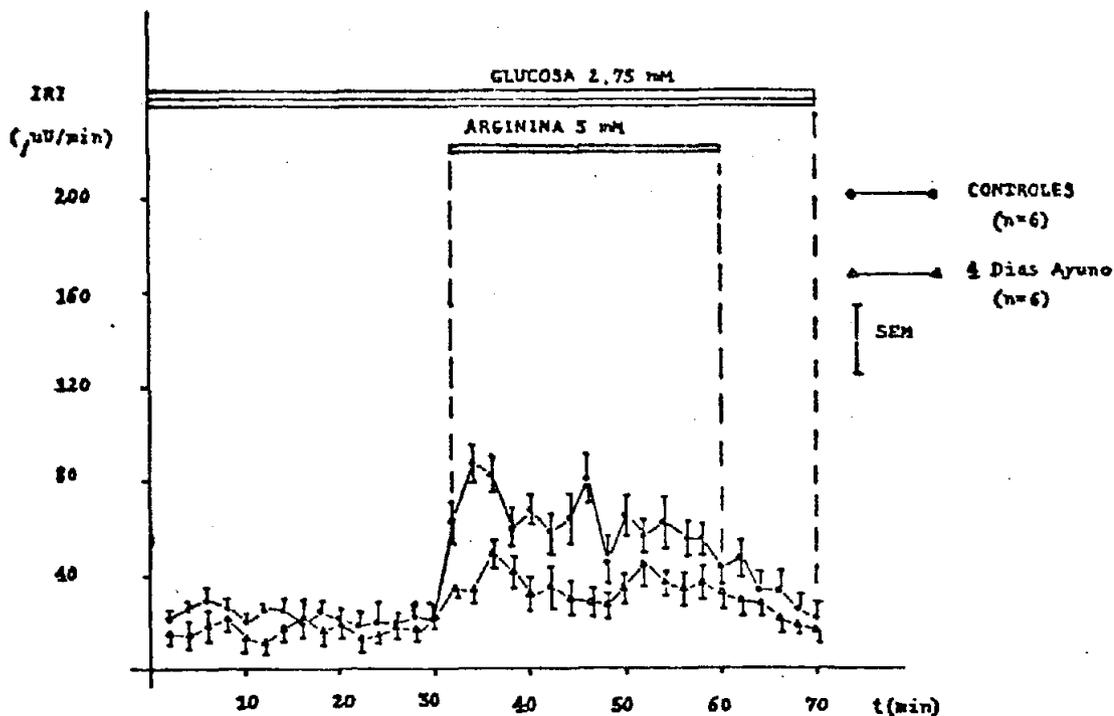


Fig. 32 ACCION DE LA ARGININA 5 mM EN PRESENCIA DE GLUCOSA 2'75 mM A LAS 4 DIAS DE AYUNO.

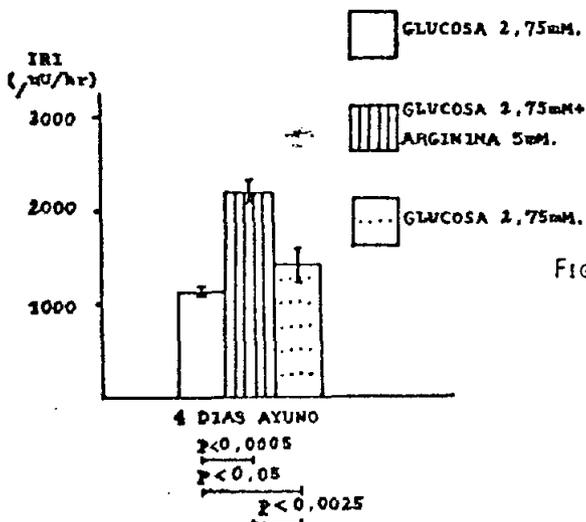


FIG.33 4 DIAS DE AYUNO: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR H...
 CON GLUCOSA 2'75 mM, ARGININA 5 mM MAS GLUCOSA 2'75 mM
 Y GLUCOSA 2'75 mM.
 EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

TABLA 12

4 DIAS DE AYUNO CON GLUCOSA 2'75mM, ARGININA 5mM

Tubo n°	INSULINA (uU/min.)						\bar{X}	SEM
1	18'5	8'2	20	13	9'4	29	16'33	3'486
2	10'5	16'2	12	30	22	7'4	16'4	3'749
3	11'5	33	23	35	14'3	34'1	25'15	4'679
4	14'5	37	22	15	38'7	6	22'33	5'881
5	13'9	11	17'3	10'7	7	26'2	14'4	3'019
6	19	12'5	4	13	20'7	4	12'20	3'185
7	25	15	13	8	30'2	14'1	17'55	3'719
8	32	22'7	31	6	30'5	21	23'86	4'426
9	9	4	11	21	35	24	17'33	5'127
10	10	26	36'5	14	25	16	21'25	4'363
11	11'1	6'2	10	33	9	12	13'5	4'354
12	17'2	12	16'1	26	7	15	15'6	2'815
13	23'3	21	22	32'3	6	12'2	19'46	4'110
14	16	20'3	14	35'2	4	19'9	18'25	4'562
15	20'2	26'1	23	31	10	28	23	3'319
16	30'1	38'3	37	29'5	41	35	35'33	2'049
17	40	26'3	33	21'5	41'6	42	34	3'869
18	57'7	34	61	52'3	54	40'9	49'4	4'436
19	38'9	42	30	55	40	43	41'33	3'611
20	33'7	26	35	40	28	12	29	4'372
21	17'5	30	32'1	62	21'6	51'5	35'6	7'789
22	30'3	31	25'3	20'2	25	51'2	30'66	4'867
23	21	18	38	40	31	24	29	4'075
24	24'1	18'1	32'5	39'5	20'1	30'5	27'5	3'647
25	51'7	30	35'6	28	25	43'6	35'66	4'581
26	72	55	34'1	45	38	70	52	7'204

27	75	42	30'6	32	25'2	50'6	37'66	2'601
28	36'3	27'5	38'6	23'9	45'5	37'6	34'66	3'527
29	44	29'8	30	39'4	42'4	39	37	2'739
30	45	35	40	58	32	26	39'33	5'025
31	39'8	12'1	30'3	33'8	41'8	22'3	30	5'018
32	24	32'5	18'9	34	36'3	28'6	29	2'950
33	28'4	14'8	19'4	39	25'4	5'44	22	5'193
34	27'6	11	20	29	22	13'6	20'5	3'243
35	29	23	13'1	20	13'5	10	18'1	3'213

En la figura 34 se muestra la dinamica de secreción de insulina en un grupo control de 4 dias de ayuno (n=4).

La perfusión esta dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 2'75mM y un segundo periodo con glucosa 2'75 mM + arginina 15 mM. En el minuto 60 de la perfusión se suprime la arginina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 2'75 mM el pancreas responde con una secreción basal de insulina que oscila entre 12 y 18 μ U. Al pasar a glucosa 2'75 mM + arginina 15 mM hay un aumento rápido en la secreción alcanzando a los 6 minutos 75'5 μ U, siendo el máximo de secreción obtenido el de 114'5 μ U a los 28 minutos despues de iniciado la perfusión con arginina.

Al suprimir la arginina en el minuto 60 de la perfusión hay un descenso de la secreción de insulina. En el minuto 70 de la perfusión la secreción es de 47'3 μ U.

Los valores individuales se las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla n° 13 pag. 156.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la media del periodo de glucosa 2'75 mM es de 15'85[±]2'241 μ U/min. La del periodo de glucosa 2'75 mM + arginina 15 mM fue de 82'37[±]6'322 μ U/min y al suprimir la arginina y continuar la perfusión con glucosa 2'75 mM sola, la media fue de 59'02[±]8'267 μ U/min.

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

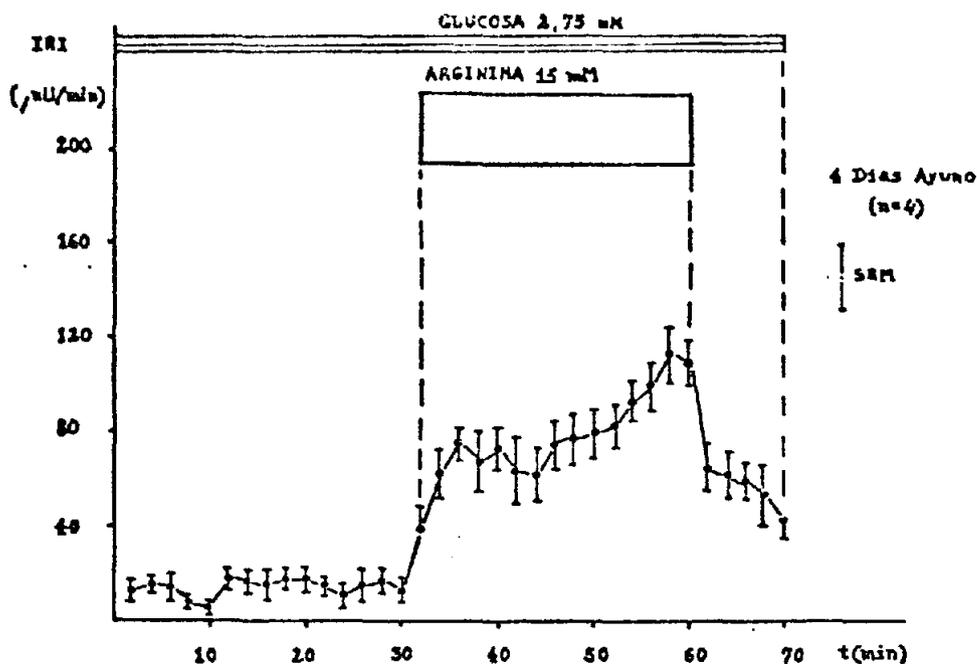


FIG. 34 ACCION DE LA ARGININA 15mM EN PRESENCIA DE GLUCOSA 2,75mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO DE 4 DIAS DE AYUNO.

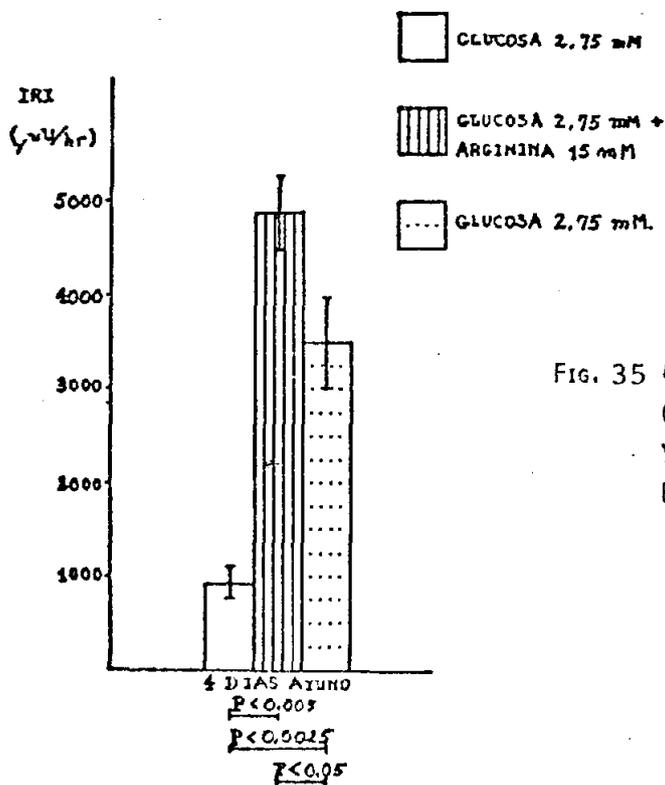


Fig. 35 4 DIAS DE AYUNO: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 2'75 mM, GLUCOSA 2'75mM MAS ARGININA 15 mM Y GLUCOSA 2'75 mM EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

4 DIAS DE AYUNO Y GLUCOSA 2'75 mM Y ARGININA 15 mM

Tubo n°	(INSULINA, μ U/min)				\bar{X}	SEM
1	9'8	13	20	21	15'95	3'134
2	21	9'5	19	17'5	16'7	2'910
3	14	7	21	24	16'5	4'384
4	9	5	13	10	9'2	1.907
5	11	7	7	5	7'5	1'453
6	12	22'6	17	27	19'6	3'775
7	21	15	13	27'5	19'1	3'774
8	22	7	15'5	25	17'3	4'603
9	12'9	14	17'5	28	18'1	3'975
10	15'3	23	8'4	26	18'2	4'574
11	12	16	18	25'2	17'8	3'191
12	7	14	6	23	12'5	4'533
13	12	18	11	30	17'7	5'041
14	12	22'2	9'9	27	17'8	4'714
15	6	9'8	18	22	13'9	4'237
16	40	52'4	63	28	45'8	7'580
17	50	80	82'2	46	64'5	9'584
18	78	86	77	61	75'5	5'230
19	56	88'4	86	42	68'1	11'397
20	81	80	81	53	73'7	6'916
21	63'8	72	93	35	65'9	12'009
22	70	82	77	34'4	65'8	10'767
23	72	90	81	57	75	7'032
24	71	86	97	56	78	9'295
25	66	104	90	54	78'5	11'322
26	88	96'6	86'8	59'2	82'6	8'115

27	88	102	109	77	94	7'147
28	82	132'6	108'4	84	101'7	11'893
29	89	132	129	108	114'5	10'034
30	108	134'6	116'4	88	111'7	9'642
31	49	87	56	73	66'2	9'881
32	41	84	60	75	65	10'862
33	45	80	52	65	60'5	8'900
34	40	86	41	57	56	12'391
35	36'5	60	38'5	54'5	47'3	6'726

En la figura 36 pag.160 se muestra la dinámica de secreción de insulina en un grupo de 8 días de ayuno (n=6).

La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 2'75mM y un segundo periodo con glucosa 2'75mM + arginina 5mM. En el minuto 60 de la perfusión se suprimió la arginina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 2'75mM el pancreas responde con una secreción basal de insulina que oscila entre 8 y 16 μ U/min. Al pasar a glucosa 2'75mM + arginina 5mM, hay un pequeño aumento en la secreción de insulina alcanzando a los 6 minutos 28 μ U y manteniendose con pequeñas modificaciones. Al suprimir la arginina en el minuto 60 de la perfusión hay un descenso de la secreción de insulina igualandose a los valores basales. En el minuto 70 de la perfusion la secrecion de insulina fue de 16,4 μ U.

Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla n° 14 pag. 161.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la media del periodo de glucosa 2'75mM es de $12'16 \pm 1'028 \mu$ U/min frente a $23'3 \pm 0'39 \mu$ U/min en el grupo control (p.132) La del periodo de glucosa 2'75mM + arginina 5mM fué de $24'9 \pm 2'407 \mu$ U/min frente a $63'6 \pm 2'109 \mu$ U/min en el grupo control (p.132) al suprimir

la arginina y continuar la perfusión con glucosa
2'75mM sola la media fué de $18'03 \pm 2'506$ μ U/min frente
a $33'07 \pm 3'990$ μ U/min en el grupo control

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras
descrito a continuación.

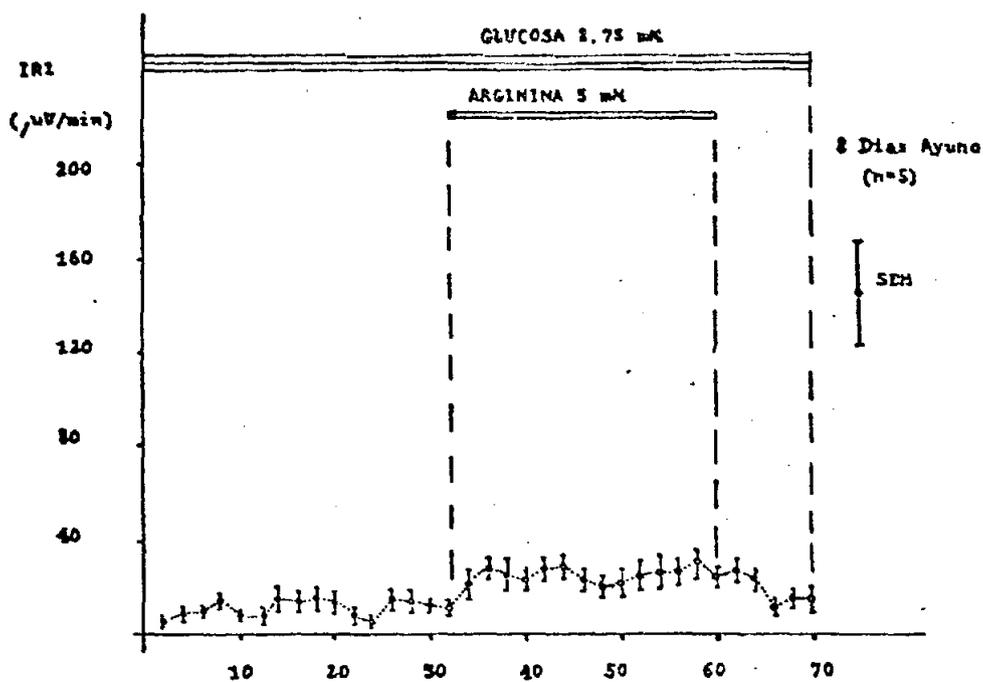


Fig.36 ACCION DE LA ARGININA 5 mM EN PRESENCIA DE GLUCOSA 2'75 mM A LOS 8 DIAS DE AYUNO.

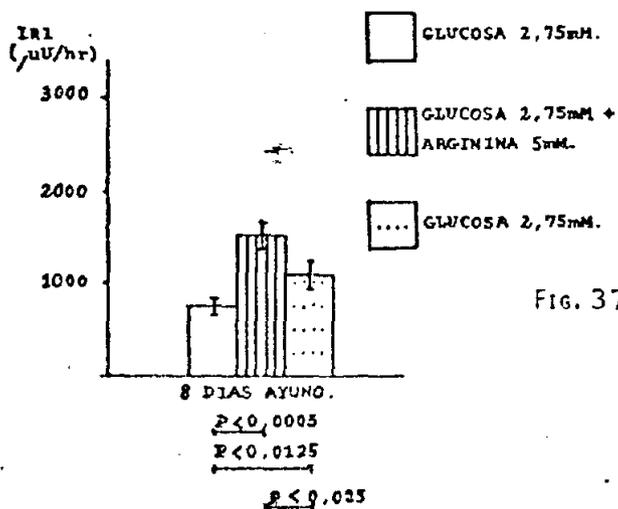


Fig. 37 8 DIAS DE AYUNO: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 2'75 mM, ARGININA 5 mM MAS GLUCOSA 2'75 mM Y GLUCOSA 2'75 mM. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

8 DIAS DE AYUNO CON GLUCOSA 2'75mM, ARGININA 5mM

Tubo n°	INSULINA (μU/min.)						\bar{X}	SEM
1	3'5	6'2	4	8	9	7'4	6'35	0'990
2	9	10	12'5	17	4	7	10	2'012
3	12	6'2	13'3	13'2	7	11'3	10'5	1'396
4	11'7	22	19	21	12'3	11'3	16	2'226
5	8'5	6'6	9'5	10	16'5	7'5	9'7	1'577
6	13	4'3	5	7	17'6	5'7	8'7	2'388
7	11	8'7	17	23'5	13	26	16'5	3'116
8	20	15	24	10	8	9	14'3	2'920
9	29	20	14	15	8	10	16	3'405
10	28	5	8	20	13	12	14'3	3'759
11	15'2	4	4'9	13	7	5'3	8'23	2'101
12	12'7	2'7	9	4	3'5	6'6	6'25	1'724
13	10	12'7	20	10	21'5	25	16'5	2'887
14	26	15'1	20	13'3	6'9	10	15'2	3'093
15	20	8'4	10	17	9'2	15'5	13'35	2'145
16	21	7'3	10	13	15.3	8'5	12'5	2'276
17	17	31	36	11	30	9	22'33	5'119
18	40	28	25	19'5	32	26	28'6	3'125
19	42	20	39	25	11	19	26	5'425
20	33	27	19	15	32	20	24'3	3'318
21	30'5	23'1	20	35	41'5	28'5	29'3	3'498
22	35'2	27	19'9	36	31	20'3	28'23	3'164
23	35	16'1	31	13'2	22'1	30	24'5	3'932
24	30'2	10	20	14	26	23	20'5	3'366
25	36	22'4	9	11	30	31	23'23	4'987
26	40	22'6	20	18	24	36	26'76	4'039

27	41	20	25	18	14'8	39	26'3	4'979
28	40	21	30	38	16	12'5	26'5	5'149
29	41'7	20'7	32	44	30'6	25'5	32'41	4'044
30	34	19'3	27'6	20	13'5	24	23	3'200
31	35	22	27	19'1	14'2	30	24'6	3'395
32	32	29	12	24'7	21	30	24'78	3'315
33	20	15'3	8'5	7'3	9	12	12'01	2'174
34	20'6	14	10	17	7	6	12'43	2'583
35	25'7	19	12'5	22	10'6	8'7	16'4	3'050

En la figura 38 se muestra la dinámica de secreción de insulina en los grupos controles (n=6), 4 días de ayuno (n=6) y 8 días de ayuno (n=5).

La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 2'75mM y un segundo periodo con glucosa 2'75mM + arginina 5mM.

Al final de la perfusión se suprimió la arginina (minuto 60).

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 2'75mM el páncreas responde con una secreción basal de insulina que va disminuyendo al aumentar el periodo de ayuno.

Al pasar de glucosa 2'75mM a glucosa 2'75mM + arginina 5mM aumenta rápidamente la secreción de insulina en el grupo control, siendo más lenta a los 4 días de ayuno y más aun a los 8 días de ayuno. A los 4 minutos se alcanza unos 8 μ U de insulina en el grupo control, frente a 34 μ U a los 4 días de ayuno y de 22 μ U a los 8 días de ayuno, siendo el máximo de secreción obtenido después de iniciada la perfusión de glucosa 2'75mM + arginina 5mM de 87 μ U a los 4 minutos en el grupo control (p.132) frente a 52 μ U a los 22 minutos en el grupo de 4 días de ayuno y 32 μ U a los 28 minutos en el grupo de 8 días de ayuno.

La supresión de arginina provoca un descenso en la secreción de insulina en los tres grupos que llega a 22, 18 y 16 μ U en los grupos control, 4 y 8 días de

de ayuno respectivamente en el minuto 70 de la perfusión. Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla n° 9, 12 y 14

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la media del periodo de glucosa 2'75mM es de $23'3 \pm 0'39$ μ U/min en el grupo control (p.132) $18'5 \pm 0'80$ μ U/min a los 4 días de ayuno y de $12'1 \pm 1'02$ μ U/min a los 8 días de ayuno. La del periodo de glucosa 2'75mM + arginina 5mM fué de $63'6 \pm 2'10$ μ U/min en los controles, $36'5 \pm 1'55$ μ U/min a los 4 días de ayuno y $24'9 \pm 2'407$ μ U/min a los 8 días de ayuno, y al suprimir la arginina y continuar la perfusión con glucosa 2'75mM sola la media fué $33'07 \pm 3'99$ μ U/min en los controles $23'9 \pm 3'20$ μ U/min en el grupo de 4 días de ayuno y de $18'03 \pm 2'506$ μ U/min en el grupo de 8 días de ayuno.

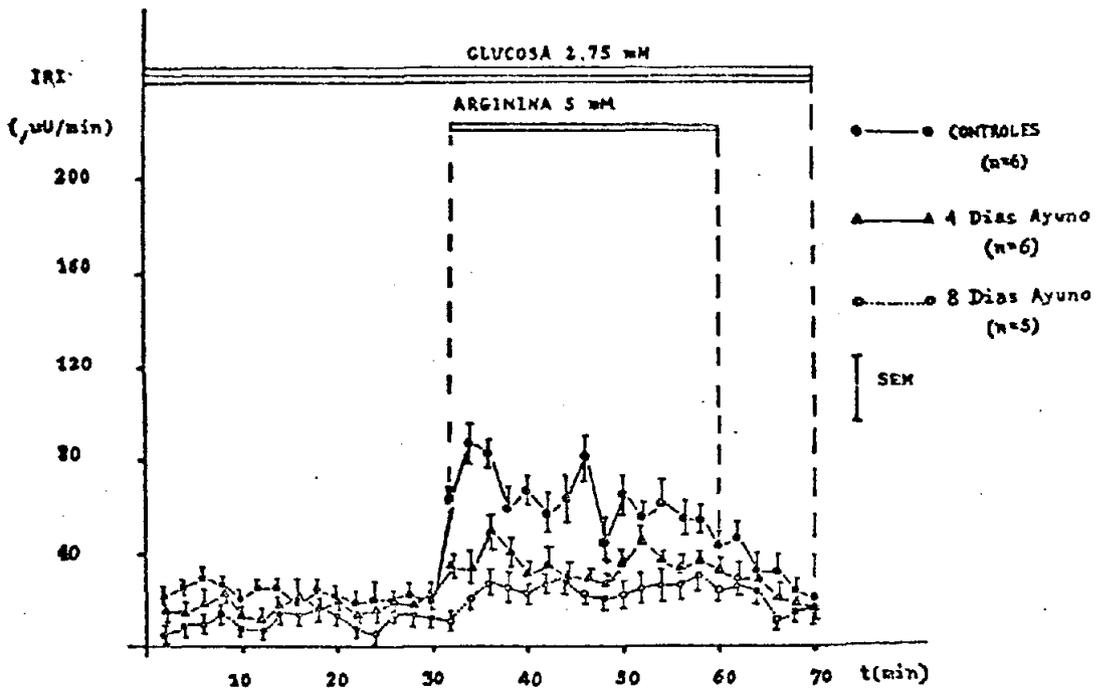


FIG.38 ACCION DE ARGININA 5 mM EN PRESENCIA DE GLUCOSA 2.75 mM EN EL GRUPO CONTROL, A LOS 4 Y 8 DIAS DE AYUNO.

3.4) PERFUSIONES DE AYUNO Y ESTIMULACION CON BETA-OH- -BUTIRATO.

Durante toda la perfusión se utiliza glucosa 5'5mM.

El motivo de la utilización de glucosa se debe al papel permisivo de esta para provocar la secreción de insulina estimulada por otros agentes insulinosecretoras.

En la figura 39 se muestra la dinámica de secreción de insulina en un grupo control (n=6).

La perfusión está dividida en tres periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 5'5mM, un segundo periodo con glucosa 5'5mM y Beta-OH-butirato 7mM y un tercer periodo con glucosa 5'5mM en el cual se administra un pulso de glucosa concentrada (0'2ml al 50%) a los 10 minutos de iniciado este periodo y un pulso de noradrenalina a los 20 minutos de iniciado este tercer periodo.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 5'5mM el pancreas responde con una secreción basal de insulina que oscila entre 40 y 25 μ U/min.

Al pasar de glucosa 5'5mM sola, a glucosa 5'5mM + BetaOH butirato 7mM aumenta rápidamente la secreción de insulina alcanzando en 2 minutos 100 μ U, siendo el máximo de secreción obtenido el de 110 μ U a los 20 minutos despues de iniciada la perfusión con glucosa 5'5mM + Beta OH butirato 7mM, al pasar a glucosa 5'5mM decrece la secreción hasta 60 μ U a los 8 minutos

El pulso de glucosa concentrada (0'2ml al 50%) aumenta rápidamente la secreción de insulina alcanzando en 2 minutos $176 \mu\text{U}$.

La perfusión noradrenalina provoca un descenso rápido de la secreción que llega a $71'5 \mu\text{U}$ en el minuto 90 de la perfusión.

Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla n° 15 pag. 169.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la \bar{x} del periodo de glucosa $5'5\text{mM}$ es de $37'01 \pm 1'002 \mu\text{U}/\text{min}$. La del periodo de glucosa $5'5\text{mM}$ + Beta OH butirato 7mM es de $99'68 \pm 2'547 \mu\text{U}/\text{min}$.

La de glucosa $5'5\text{mM}$ sola, a continuación del periodo anterior es de $81'5 \pm 2'175 \mu\text{U}/\text{min}$ siendo la del periodo con el pulso de glucosa concentrada (0'2ml al 50%) es de $141'7 \pm 2'063 \mu\text{U}/\text{min}$ y la del periodo con infusión de noradrenalina de $90'62 \pm 2'212 \mu\text{U}/\text{min}$.

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

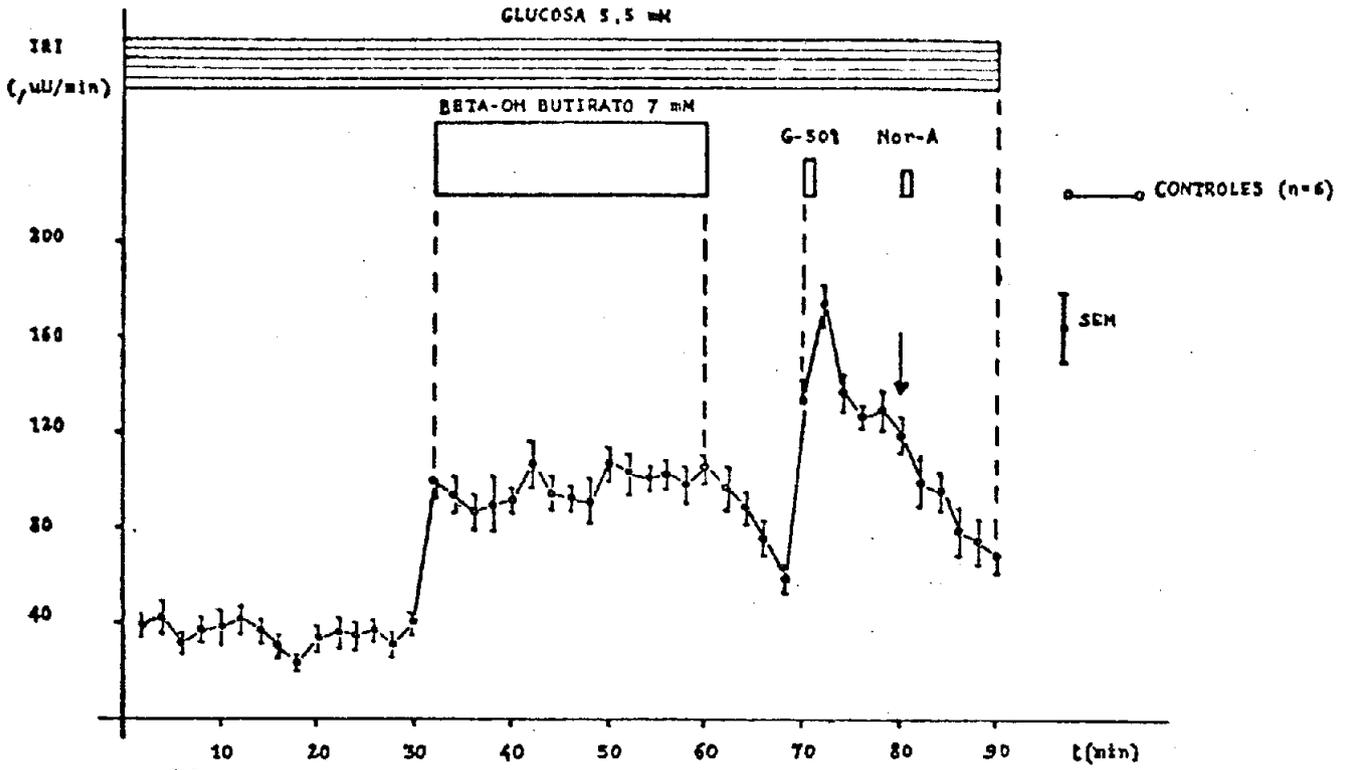


Fig.39 ACCION DEL BETA-OH-BUTIRATO 7 mM EN PRESENCIA DE GLUCOSA 5'5 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO CONTROL.

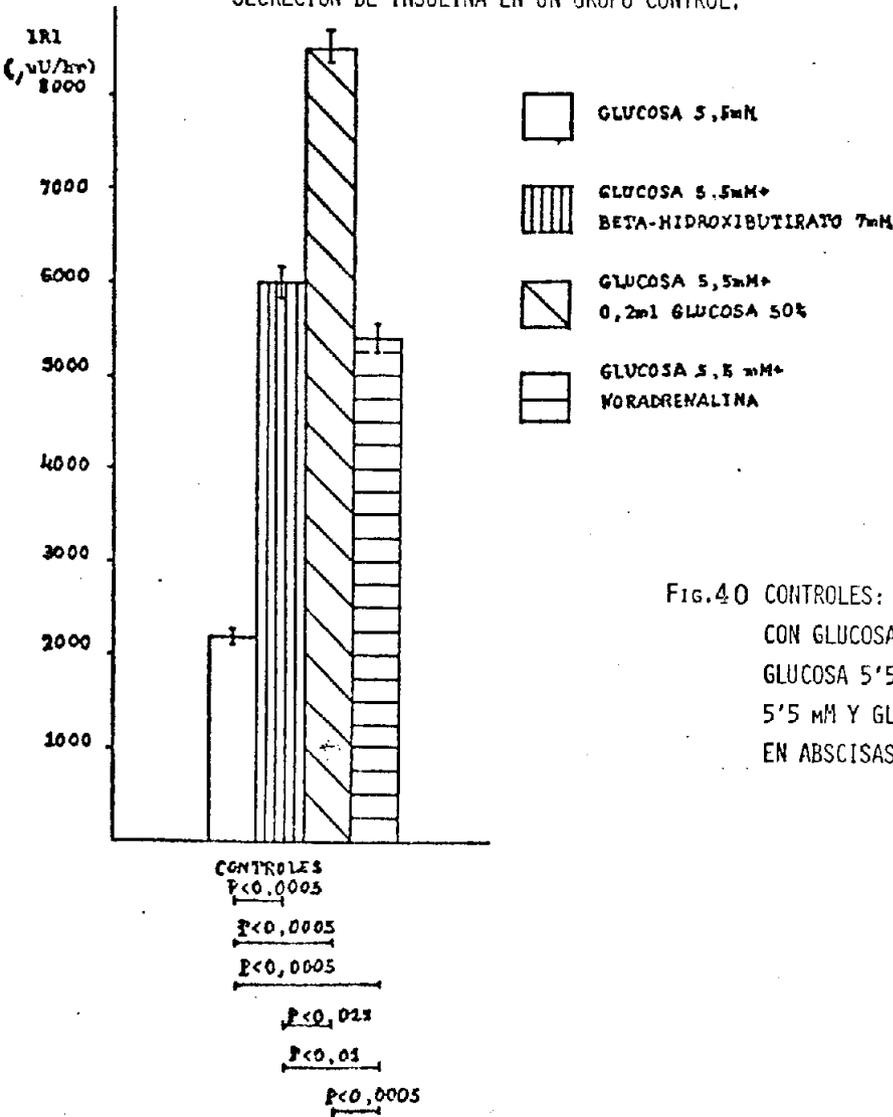


Fig.40 CONTROLES: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 5'5 mM, BETA-OH-BUTIRATO 7 mM MAS GLUCOSA 5'5 mM, 0'2 ML DE GLUCOSA AL 50% MAS GLUCOSA 5'5 mM Y GLUCOSA 5'5 mM MAS NORADRENALINA. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

CONTROLES CON GLUCOSA 5'5mM Y BETA-OH-BUTIRATO 7 mM

Tubo n°	INSULINA (μU/min.)						\bar{X}	SEM
1	34	42	36	52	33	44'9	40'3	3'301
2	35	40	38	51	33	61'2	43'1	4'871
3	36'2	41	29'3	35	20'5	41'6	33'7	3'474
4	35	47	36	39'7	27	44	38'3	3'184
5	33'5	56'5	40	36'5	26'6	45'5	39'7	4'628
6	34	50'5	46'3	35	40	50	42'5	3'282
7	44'3	30	41	34'9	32	47'2	38'2	3'114
8	31	24'5	38	24'3	39'6	35	32'1	2'961
9	30	23	31	23'1	26	20'2	25'5	1'905
10	30	24'9	42	46	33'3	35'1	35'2	3'461
11	31	28	50	40	47'2	29'1	37'5	4'284
12	31'6	32'5	45	39	42'7	27'7	36'4	3'059
13	46	34'3	40	37	45'6	29'7	38'7	2'866
14	28	25	40	37	35	23'9	31'48	3'000
15	38'5	45'3	51	43	40	37'3	42'5	2'276
16	105	90'9	112	86	92	113	100	5'214
17	88	78	95	100	114	103	96'3	5'57
18	82	77	84	94	108	97'5	90'4	5'152
19	97	75	87	101	129	65'6	92'4	9'968
20	89	102	83	104	93	91	93'6	3'573
21	118	90	104	134	120	96	110'3	7'406
22	88	83	90	100	114	103'5	96'4	5'152
23	90	83	91	97	102	105	94'6	3'671
24	101	86	60	105	93	109	92'33	7'996
25	105'2	100'7	104'5	99'4	122'6	127'5	110	5'353
26	124	109	118	92	100	94	106	5'840
27	109	100	96	103	110'7	94	102'1	3'027

28	96'9	107	92	112	98	115	103'4	4'110
29	89'2	100'7	86'5	97'4	104'6	121'5	100	5'590
30	95'9	102	112	124	105	108	107'8	4'302
31	91'1	125	94'8	86'9	115	87	100	7'200
32	74	86	88	92	103	98	90'1	4'525
33	86	74	96	70	62	69	76'1	5'599
34	62	56'3	59	47'5	67'5	68	60	3'434
35	132	150	118	143	122	141	134	5'617
36	181	189	176	157	169	186	176'3	5'304
37	129	152	131	153	128	150'8	140'6	5'559
38	130	131	128	137'2	120	119'1	127'5	3'094
39	137	121'3	132'6	134	143	112'5	130	4'986
40	107	128	109	134	129	115	120	5'116
41	89	114	83	116	93	103	100	6'059
42	86	79	95	109	92	115	96	6'118
43	85'2	62'7	80'5	61'4	84'6	105'5	80	7'330
44	94	88	81	77	51'5	66	76'3	6'909
45	55	64	81	75	70'4	84	71'5	4'847

En la figura 41 se muestra la dinámica de secreción de insulina en un grupo de 4 días de ayuno (n=5). La perfusión está dividida en tres periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 5'5mM, un segundo periodo con glucosa 5'5mM + Beta-OH-butirato 7mM y un tercer periodo con glucosa 5'5mM en el cual se pone un pulso de glucosa concentrada (0'2ml al 50%) en el minuto 70 de la perfusión y un pulso de noradrenalina en el minuto 80 de la perfusión.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 5'5mM el pancreas responde con una secreción basal de insulina que oscila entre 10 y 25 μ U/min. Al pasar de glucosa 5'5mM sola a glucosa 5'5mM + Beta-OH-butirato 7mM aumenta lentamente la secreción de insulina alcanzando en 4 minutos 36 μ U, siendo el máximo de secreción obtenida el de 66 μ U a los 22 minutos después de iniciada la perfusión con glucosa 5'5mM + Beta-OH-butirato 7mM. Al pasar a glucosa 5'5mM sola decrece la secreción hasta 38'2 μ U a los 8 minutos. El pulso de glucosa concentrada (0'2ml al 50%) aumenta rápidamente la secreción de insulina alcanzando en 2 minutos 128 μ U. El pulso de noradrenalina provoca un descenso rápido de la secreción que llega a 42'2 μ U en el minuto 90 de la perfusión.

Los valores individuales de las perfusiones que describitas aparecen en la tabla n° 16 pag.174.

De estos valores individuales se puede obtener la media

para cada uno de los periodos antes citados.

Así la media del periodo de glucosa 5'5mM es de $18'32 \pm 2'209$ μ U/min frente a $37'01 \pm 1'00$ μ U/min en el grupo control(p.166).

Al perfundor con glucosa 5'5mM + Beta-OH-butirato la media fué de $47'29 \pm 1'389$ μ U/min frente a $99'6 \pm 2'54$ μ U/min en el grupo control(p.166).

La del periodo de glucosa 5'5mM + el pulso de glucosa concentrada (0'2ml al 50%) es de $116'78 \pm 3'980$ μ U/min frente a $141'7 \pm 2'06$ μ U/min en el grupo control(p.166) y despues del pulso de noradrenalina la media fué de $52'4 \pm 3'572$ μ U/min frente a $90'6 \pm 2'21$ μ U/min en el grupo control(p.166).

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

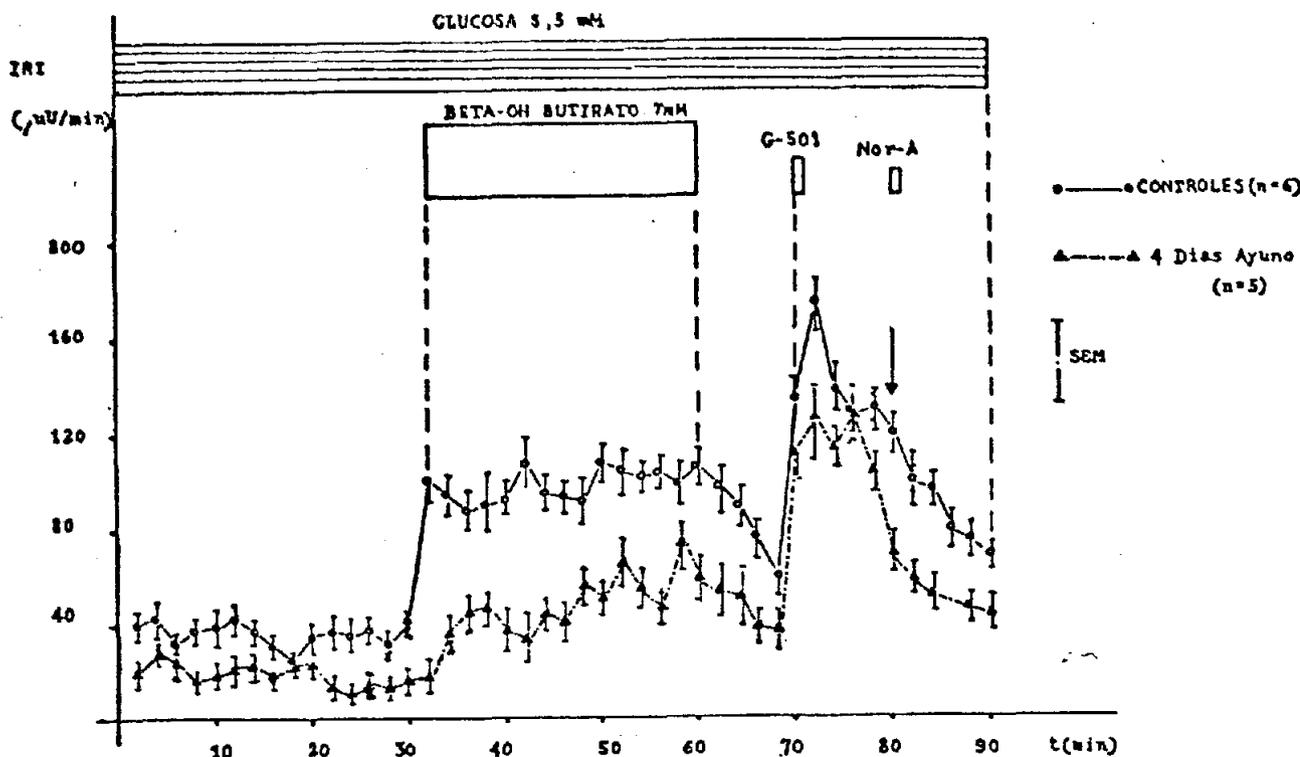


Fig. 41 ACCION DEL BETA-OH-BUTIRATO 7 mM EN PRESENCIA DE GLUCOSA 5'5 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO DE 4 DIAS DE AYUNO.

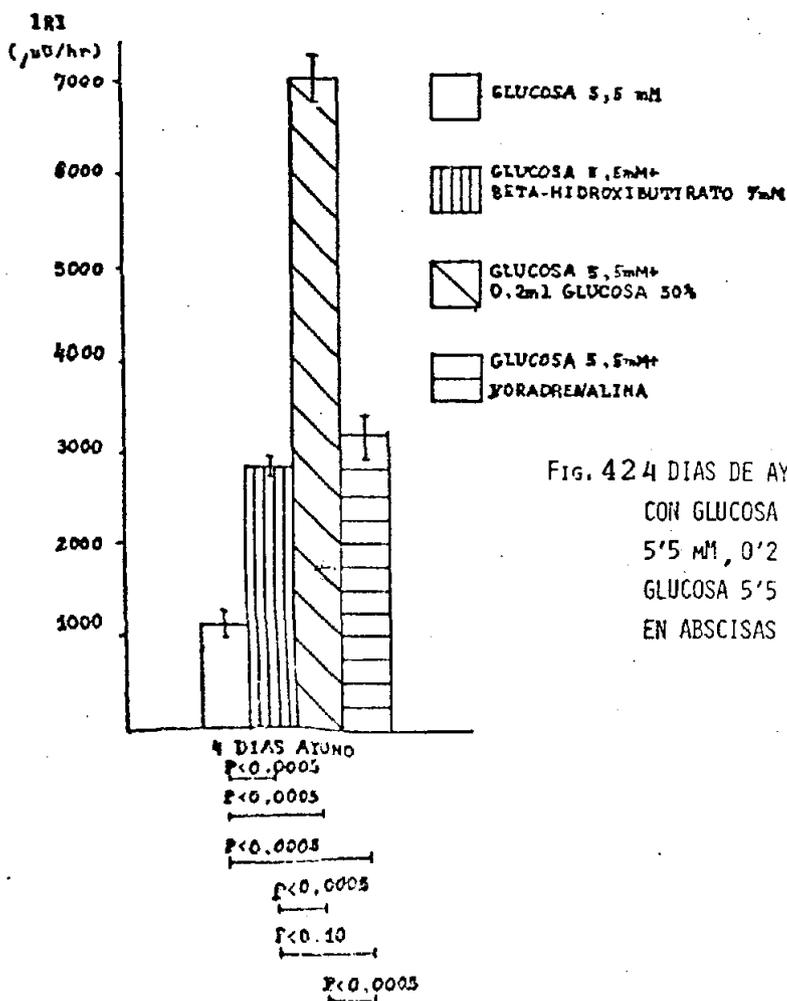


Fig. 42 4 DIAS DE AYUNO: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 5'5 mM, BETA-OH-BUTIRATO 7 mM MAS GLUCOSA 5'5 mM, 0'2 ML DE GLUCOSA AL 50% MAS GLUCOSA 5'5 mM Y GLUCOSA 5'5 mM MAS NORADRENALINA. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

TABLA 16

4 DIAS DE AYUNO CON GLUCOSA 5'5mM Y BETA-OH-BUTIRATO 7mM

Tubo n°	INSULINA (μU/min)					\bar{X}	SEM
1	8'8	27	12'8	29'1	19'8	19	4'386
2	31'2	22	18	33	26	28	2'168
3	21	26	17	37	22	24'6	3'817
4	17	16	12	26	9	16	3'221
5	19	10	17	28'2	16	18	3'298
6	26	20	15	29	10	20	3'889
7	17	12	28	31	22	22	3'889
8	10	18'5	25	28	11	18'5	4'036
9	18	20'5	15'9	30'5	26'6	22'3	3'045
10	25'6	11'4	18'3	30	25	22'06	3'640
11	10	21	15	5	9	12	3'082
12	5	9	10	16	10	10	1'968
13	8	10	15	27	11	14'2	3'798
14	8'5	6'9	12	20'5	13'6	12'3	2'653
15	12	21	9	24	14	16	3'142
16	13	24'5	8'6	30	14	18	4'441
17	34	22	36	47	43	36'4	4'803
18	43	55	36	60	36	46	5'511
19	40	52	48	62	38	48	4'847
20	40	30	58	25	37	38	6'314
21	40	34	55	17	24	34	8'162
22	43'6	37'6	55'3	30	54	44'1	5'389
23	40	30	43	28	59	40	6'194
24	49	65	54	43	69	56	5'431
25	36	48	50	60	58	50'4	4'764
26	59	71	42	85	76	66'6	8'326

27	60	40'4	50'3	69	51	54'1	5'411
28	51	37	40	61	39	45'6	5'094
29	72	98	52'3	68'4	80	74'1	8'359
30	43	61	50	81	67	60'4	7'412
31	46	70	40'3	36'4	68	52'1	7'890
32	51	77	32	57	35	50'4	9'107
33	56	41	26	37	40	40	5'373
34	37	30	43	58	23	38'2	6'684
35	90	115	98	136'3	110'5	110	8'877
36	130	132	134	153	91	128	11'319
37	108	93	117	124	127	113'8	6'868
38	94	131	139	124	152	128	10'834
39	117	88	110	126	100	104'2	5'481
40	68	72'4	50'3	95	65	70'1	8'092
41	50	68'2	49	58	65	58	4'315
42	40	39	50	59	64	50'4	5'574
43	31	59	45	65	40	48	6'946
44	38	56	30	61	45	46	6'354
45	37	45	53	28	48	42'2	4'916

En la fig. 43 se muestra la dinámica de secreción de insulina en grupo de 8 días de ayuno ($n=5$). La perfusión está dividida en 3 periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 5'5 mM, un segundo periodo con glucosa 5'5 mM + beta-OH-butilato 7mM y un tercer periodo con glucosa 5'5 mM en el cual se infunde un pulso de glucosa concentrada (0'2ml al 50%) a los 10 minutos de iniciado este periodo y un pulso de noradrenalina a los 20 minutos.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 5'5 mM el pancreas responde con una secreción basal de insulina que oscila levemente entre 10 y 15 μ U. Al pasar de glucosa 5'5 mM sola a glucosa 5'5 mM+beta-OH-butilato 7 mM aumenta discretamente la secreción de insulina alcanzando a los 4 minutos 36 μ U siendo el máximo de secreción obtenido el de 37,6 μ U a los 6 minutos despues de iniciada la perfusión con glucosa 5'5 mM + beta-OH-butilato 7 mM. Al pasar a glucosa 5'5 mM sola, decrece la secrecion hasta 21 μ U a los 8 minutos.

El pulso de glucosa concentrada (0'2ml al 50 %) aumenta la secreción de insulina alcanzando unas 70 μ U. El pulso de noradrenalina provoca un lento descenso de la secreción que llega a 25'8 μ U en el minuto 90 de la perfusión.

Los valores individuales de las perfusiones aquí

descritas aparecen en la tabla nº17 pag.179.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la media del periodo de glucosa 5'5mM es de $15'25 \pm 1'209$ μ U/min frente a $37'01 \pm 1'00$ μ U/min en el grupo control(p.166).

La del periodo de glucosa 5'5mM + beta-OH-butilato 7mM es de $29'36 \pm 3'163$ μ U/min frente a $99'6 \pm 2'54$ μ U/min en el grupo control(p.166) la del periodo de glucosa 5'5 mM despues del pulso de glucosa concentrada en de $42'84 \pm 3'754$ μ U/min frente a $141'7 \pm 2'06$ μ U/min en el grupo control(p.166) y tras el pulso de noradrenalina fue de $33'18 \pm 4'122$ μ U/min frente a $90'6 \pm 2'2$ μ U/min en el grupo control (p.166).

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

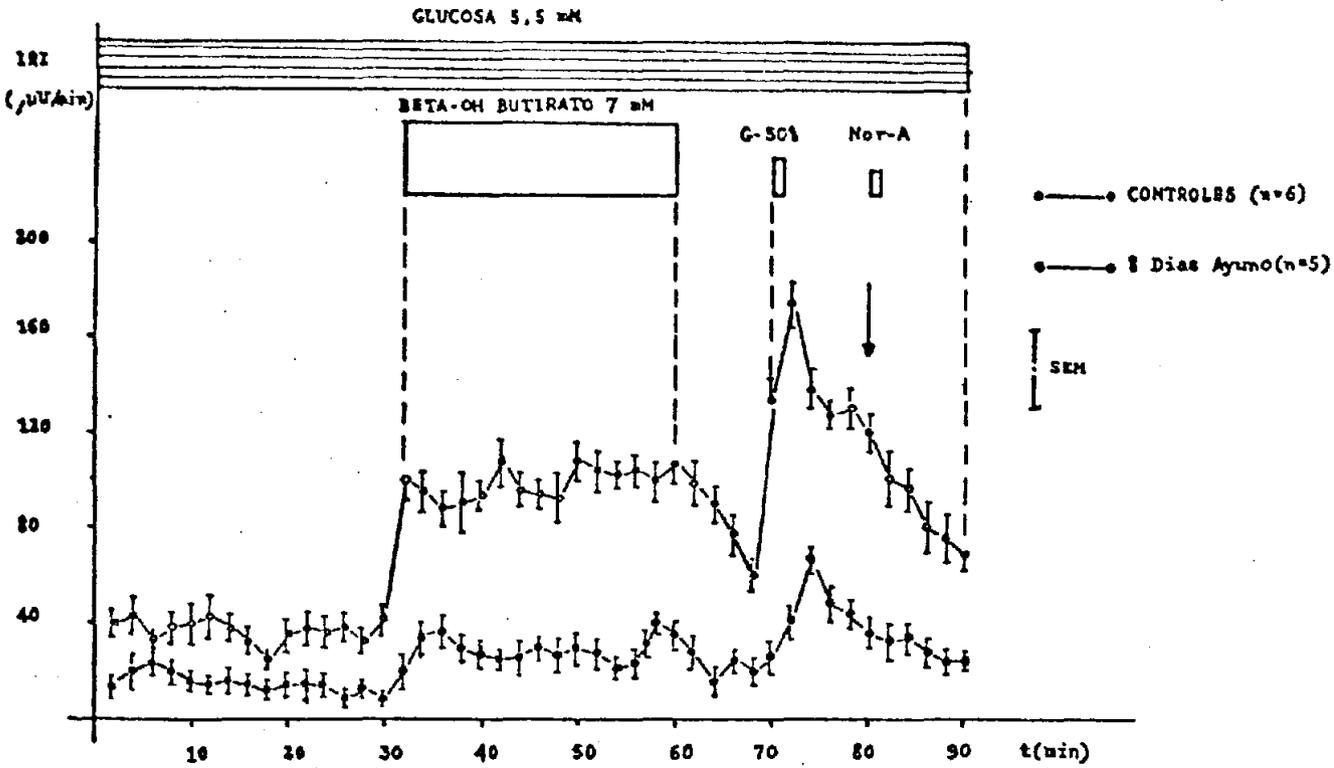


FIG. 43 ACCION DEL BETA-OH-BUTIRATO 7mM EN PRESENCIA DE GLUCOSA 5'5 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO DE 8 DIAS DE AYUNO.

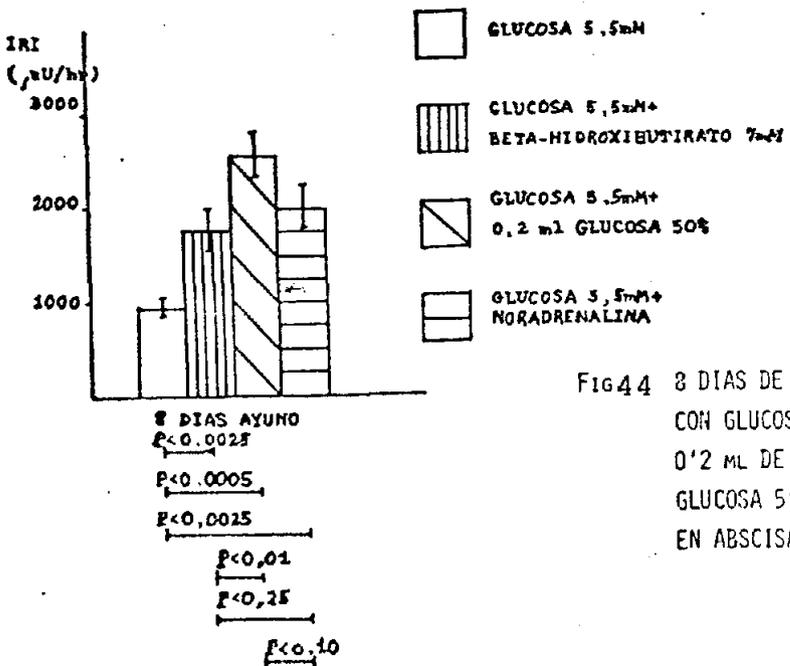


FIG 44 8 DIAS DE AYUNO: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 5'5 mM, BETA-OH-BUTIRATO MAS GLUCOSA 5'5 mM, 0'2 ML DE GLUCOSA AL 50 % MAS GLUCOSA 5'5 mM Y GLUCOSA 5'5 mM MAS NORADRENALINA. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

8 DIAS DE AYUNO CON GLUCOSA 5'5mM Y BETA-OH-BUT RATO 7mM

Tubo n°	INSULINA (/uU/min.)					\bar{X}	SEM
1	12	27	16	11	7	14'6	3'815
2	18	39	13	10	20	20	5'665
3	20'6	16'4	13'3	35	25	22	4'235
4	21	25	10	29	15	20	3'805
5	10	19	12	24	15	16	2'805
6	16	10	22	8	15	14'2	2'745
7	17	26	12	9'5	18	16'5	3'180
8	12'8	20	6'8	24'1	15'8	15'9	3'320
9	7	11	12	10	20	12	2'42
10	27	14	11	10	9	14'2	3'695
11	28'5	16	11	10	8	14'7	4'125
12	23	20	8	17	12	16	3'020
13	16	11	12	5	8	10'4	2'075
14	17'6	10'5	13	8'5	11'9	12'3	1'700
15	15	6	13	7	9	10	1'936
16	38'6	14	20'5	10	17	20	5'54
17	50	42	27	37	24	36	5'35
18	52	31	26	36	43	37'6	5'105
19	40	21	28	24	38	30'2	4'215
20	41	32	27	19	21	28	4'440
21	19	24	30	35	22	26	3'22
22	40'1	20'8	25'8	33'5	14'8	27	5'000
23	41	23	28	33	25	30	3'605
24	44	18	23	32	25	28'4	5'030
25	40	36	30	24	20	30	4'123
26	43	29	26	31	16	29	4'86

27	30'5	25'6	18	20'5	16'9	22'3	2'835
28	40'6	23	29'5	11	16	24	5'805
29	35	41	30	29	25	32	3'080
30	50	45	40	28	37	40	4'165
31	45	28	33	29	55	38	5'830
32	36	47	17	26	24	30	5'840
33	23	9	20	12	16	16	2'850
34	38	33	23	19	20	26'6	4'220
35	35	18	19	26	10	21'6	4'695
36	41'1	26'8	20'8	35'8	15'5	28	5'255
37	57	44	33	37	49	44	4'769
38	84	56	80	70	63	70'6	5'805
39	57	50	38	59	46	50	4'255
40	58	53	48	36	35	46	5'11
41	53	47	21	31	40'5	38'5	6'365
42	48	36	29	31	26	34	4'315
43	40	27	35	18	30	30	4'165
44	38	31	21	16	19	25	4'596
45	36	30	24	17	22	25'8	3'681

En la figura 45 se muestra la dinámica de secreción de insulina en los grupos control (n=6), 4 días de ayuno (n=5) 8 días de ayuno(n=5).

La perfusión está dividida en 3 periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 5'5mM, un segundo periodo de glucosa 5'5mM + Beta-OH-butilato 7mM y un tercer periodo con glucosa 5'5mM en el cual se infunde un pulso de glucosa concentrada (0'2ml al 50%) y otro de noradrenalina al final de la perfusión.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 5'5mM el pancreas responde con una secreción basal de insulina casi idéntica para los grupos de 4 y 8 días de ayuno, siendo superior la del grupo control.

Al pasar de glucosa 5'5mM a glucosa 5'5mM + Beta-OH-butilato hay un ascenso brusco de la secreción de insulina en el grupo control, y mucho más lenta y disminuida a los 4 y 8 días de ayuno, alcanzando a los 2 minutos 100 μ U en el grupo control y 36 μ U a los 4 minutos en los grupos 4 y 8 días de ayuno, al pasar a glucosa 5'5mM y después del pulso de glucosa concentrada hay un aumento en la secreción de insulina en los tres grupos, siendo esta más pequeña a medida que aumenta el periodo de ayuno. El pulso de noradrenalina al final de la perfusión provoca una disminución de la secreción insulina que es más lenta al aumentar los días de ayuno.

Los valores individuales de las perfusiones aquí

descritos aparecen en las tablas n° 15, 16 y 17.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Las medias del periodo con glucosa 5'5mM son de $37'01 \pm 1'002$, $18'3 \pm 2'20$ y $15'2 \pm 1'20$ μ U/min para los grupos control, 4 y 8 días de ayuno, respectivamente.

Las del periodo de glucosa 5'5mM + Beta-OH-butirato son $99'6 \pm 2'54$, $47'2 \pm 1'38$ y $29'3 \pm 3'1$ μ U/min, para los grupos control, 4 y 8 días de ayuno.

Las del periodo de glucosa 5'5mM despues del pulso de glucosa concentrada (0'2ml al 50%) son $141'7 \pm 2'06$, $116'7 \pm 3'9$ y $42'8 \pm 3'75$ μ U/min para los grupos control, 4 y 8 días de ayuno respectivamente y tras el pulso de noradrenalina fueron $90'6 \pm 2'2$, $52'4 \pm 3'5$ y $33'1 \pm 4'12$ μ U/min para los grupos control, 4 y 8 días de ayuno.

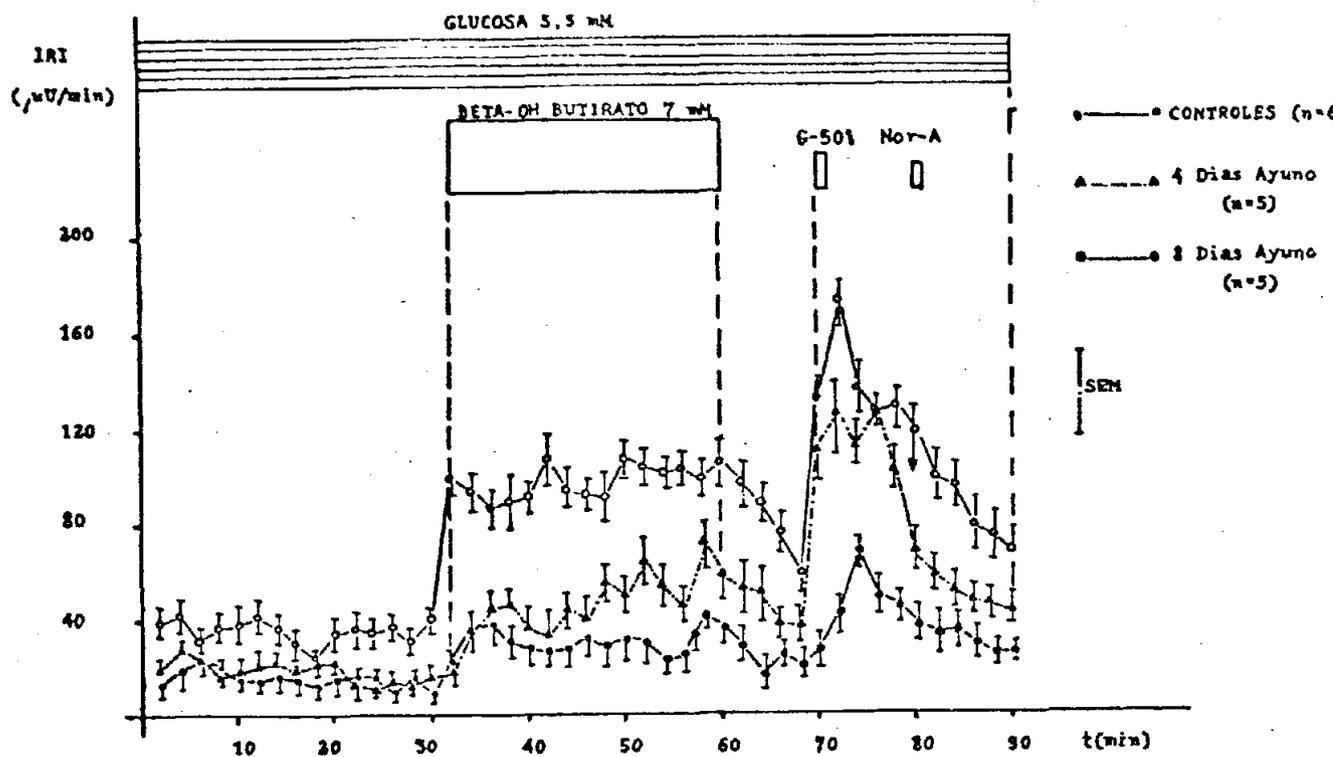


Fig 45 ACCION DEL BETA-OH-BUTIRATO 7 mM EN PRESENCIA DE GLUCOSA 5.5 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN LOS GRUPOS CONTROLES 4 Y 8 DIAS DE AYUNO.

3.5) PERFUSIONES DE AYUNO Y REALIMENTACION.

En las figuras 46 y 48 se muestra la dinámica de secreción de insulina en el grupo de 4 días de ayuno más dos de realimentación (n=4) frente a los grupos de 4 días de ayuno y controles respectivamente.

La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 2'75mM y un segundo periodo con glucosa 16'7mM. Al final de la perfusión se infundió noradrenalina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 2'75mM el pancreas responde con una secreción basal de insulina que oscila levemente entre 10 y 20 μ U/min. Al pasar de glucosa 2'75mM a glucosa 16'7mM aumenta en pocos minutos la secreción de insulina, alcanzando en 8 minutos 73 μ U siendo el máximo de secreción obtenido el de 135 μ U a los 24 minutos después de iniciada la perfusión con altos niveles de glucosa.

La perfusión con noradrenalina provoca un descenso de la secreción que llega a unos 37 μ U en el minuto 100 de la perfusión.

Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla n° 18 pag. 188.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la media del periodo de glucosa 2'75mM es de

14'1[±]3'866, uU/min frente a 13'1[±]3'38, uU/min a los 4 días de ayuno y 34'06[±]5'57, uU/min en el grupo control.

La del periodo de glucosa 16'7mM es de 100'8[±]8'5, uU/min frente a 55'9[±]7'36, uU/min a los 4 días de ayuno y 172'5[±]7'5, uU/min en los controles, y la del periodo con infusión de noredrenalina es de 52'6[±]5'19, uU/min frente a 73'08[±]7'84, uU/min a los 4 días de ayuno y 108'8[±]7'39, uU/min en el grupo control.

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

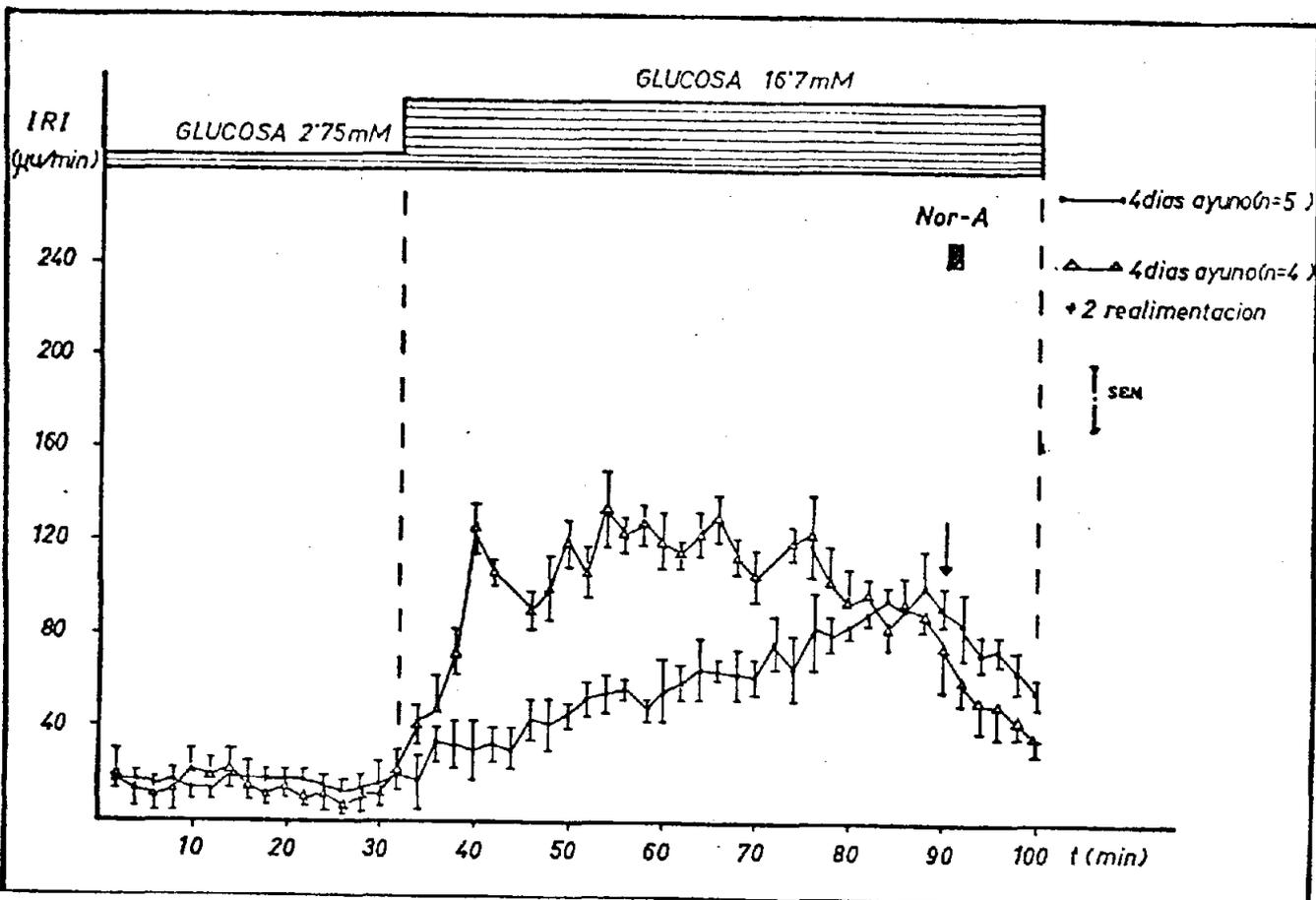


Fig. 46 ACCION DE LA GLUCOSA 2'75 Y 16'7 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO DE 4 DIAS DE AYUNO MAS DOS DE REALIMENTACION FRENTE A UN GRUPO DE 4 DIAS DE AYUNO.

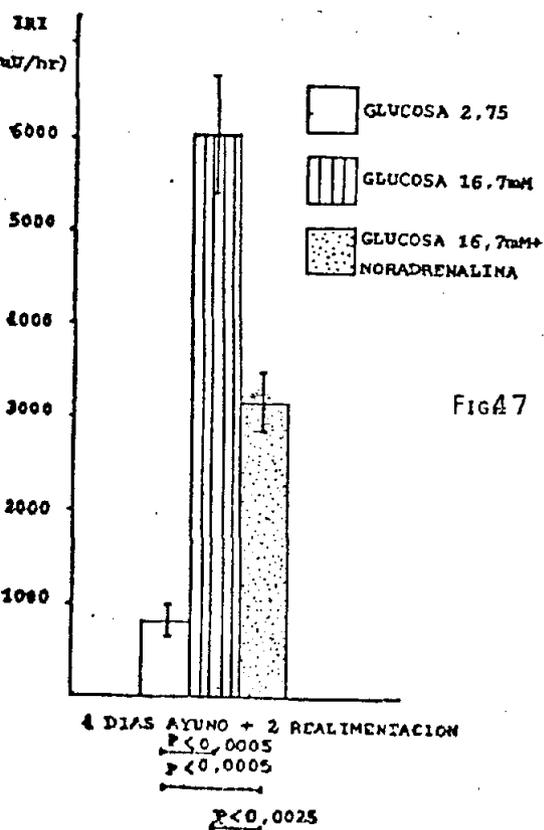


Fig 47 4 DIAS DE AYUNO MAS 2 REALIEMENTACION; SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 2'75, 16'7 Y 16'7 mM MAS NORADRENALINA. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

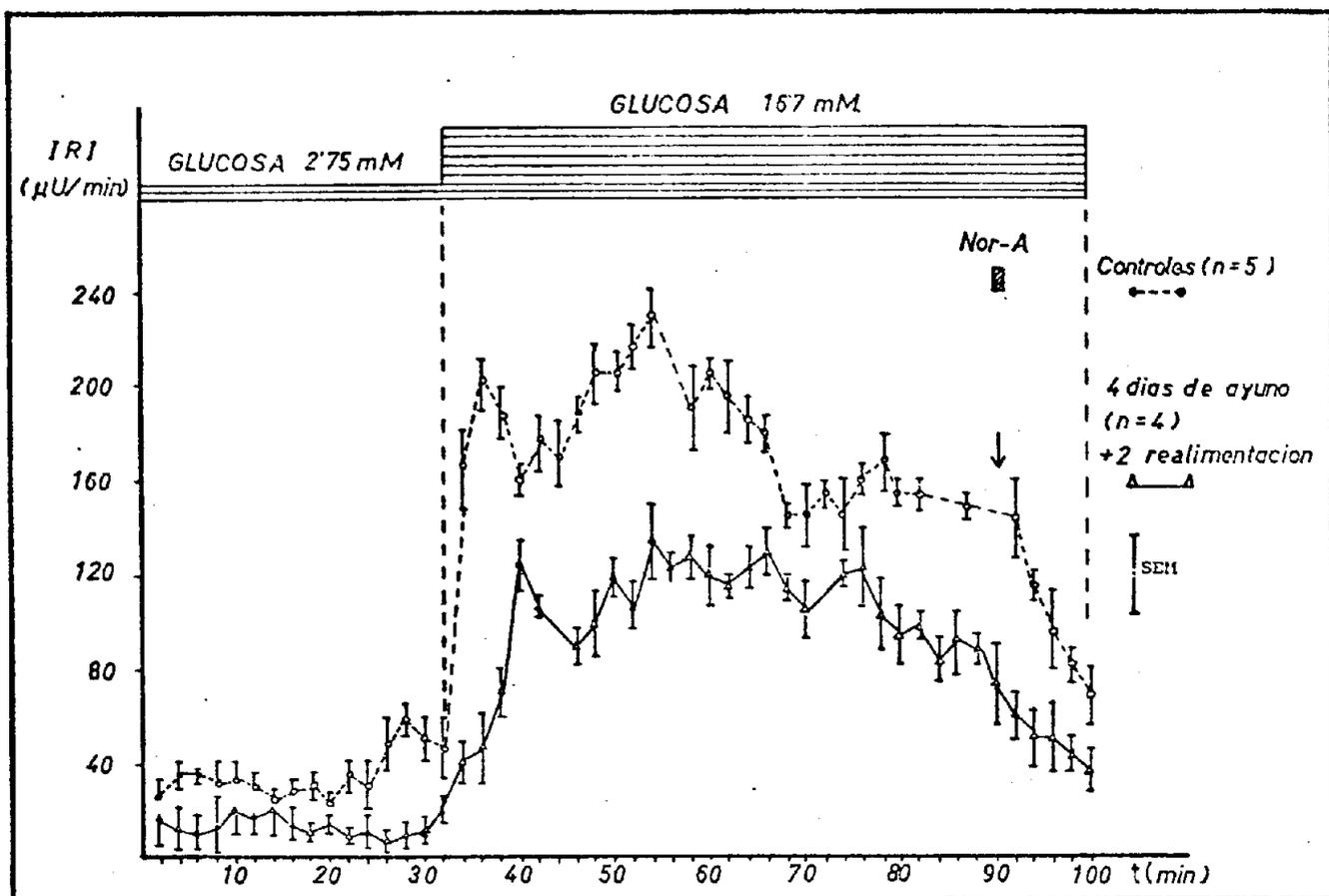


FIG.48 ACCION DE LA GLUCOSA 2'75 Y 16'7 mM SOBRE LA SECCION DE INSULINA EN UN GRUPO DE 4 DIAS DE AYUNO MAS DOS DE REALIMENTACION, FRENTE AL GRUPO CONTROL.

4 DIAS DE AYUNO + 2 REALIMENTACION CON GLUCOSA 2'75 y 16'7mM

Tubo n°	INSULINA (μU/min.)				\bar{X}	SEM
1	30'1	19	6	15	17'5	5'768
2	21'6	8'8	6'8	17'5	13'7	4'061
3	17'2	8	4'5	10'3	10'6	3'090
4	23	9	5	18	13'7	4'746
5	31'2	17	15	23	22	4'201
6	26'8	10	17	19	18'3	3'990
7	33	11	19	27	22'5	5'527
8	25	12'5	5	20	15'8	5'051
9	20	9	7	10'5	11'2	3'328
10	28	7	4	20	14'1	8'516
11	18	7	7	4	9'1	3'559
12	20	7	10	18	13'7	3'601
13	11	3	5	8	6'8	2'020
14	18	9	4	10	10'4	3'570
15	20'6	6	9	16'2	12'9	3'844
16	30	16	8	26	20	5'735
17	60	29	32'1	47'5	42'5	8'247
18	64	35	40'5	57	48'7	7'854
19	85	55	75	80	73'7	7'592
20	152'7	102'6	120	134'6	127'5	12'436
21	139	93	76'9	121	107'5	16'059
22	106	90	87	99	95'5	5'000
23	120'4	88'5	64	91'1	91'2	13'152
24	119	95	80	106'5	100	9'593
25	140	118'5	104'8	121'1	121'2	8'538
26	130	100	95	110	108'7	8'936

27	157	130'5	114	140	135	10'407
28	130'3	126	118'4	125'6	125	2'882
29	142	116'6	119'5	131	128	7'106
30	130'3	106'6	119'3	125	120	5'981
31	138	99	101	118	114	10'467
32	131	119	112	126	122	4'784
33	154	103	125	140	130	12'601
34	139	95	107	115	114	10'729
35	123	90	105	115	107'5	8'211
36	136	94	103	115	112	10'488
37	140	95	112'2	132'5	120'6	11'703
38	156	109	114'5	110'2	122	13'050
39	113	80	107	103	100'7	8'331
40	106	79	93	102	95	6'912
41	120	64	77	99	96	14'244
42	104	63'5	84'2	90	85'4	9'711
43	120	78	80	92	92'6	11'170
44	108	76	77	99	90	9'249
45	80	64	72	81	74	4'579
46	71'3	52'5	53	63'5	60	5'193
47	70	35	42'2	52'5	50	8'773
48	64	39	45	52	50	6'200
49	62	35	39	42	44	6'936
50	50	29	32	40	37'5	5'423

En la figura 49 se muestra la dinámica de secreción de insulina en el grupo de 4 días de ayuno más dos de realimentación (n=4).

La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 5'5mM y un segundo periodo con glucosa 33'4mM. Al final de la perfusión se infundió noradrenalina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 5'5mM el pancreas responde con una secreción basal de insulina que oscila levemente entre 22 y 32 μ U/min. Al pasar de glucosa 5'5mM a glucosa 33'4mM aumenta rápidamente la secreción de insulina alcanzando en 4 minutos unas 254 μ U, siendo el máximo de secreción obtenido el de 288 μ U a los 18 minutos después de iniciada la perfusión con altos niveles de glucosa. La perfusión con noradrenalina provoca un descenso de la secreción que llega a unos 110 μ U en el minuto 100 de la perfusión.

Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla n° 19 pag. 192.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la media del periodo de glucosa 5'5mM es de $6'385 \pm 2'055$ μ U/min. La del periodo de glucosa 33'4mM es de $45'37 \pm 7'948$ μ U/min y la del periodo con infusión de noradrenalina de $23'7 \pm 5'642$ μ U/min. Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

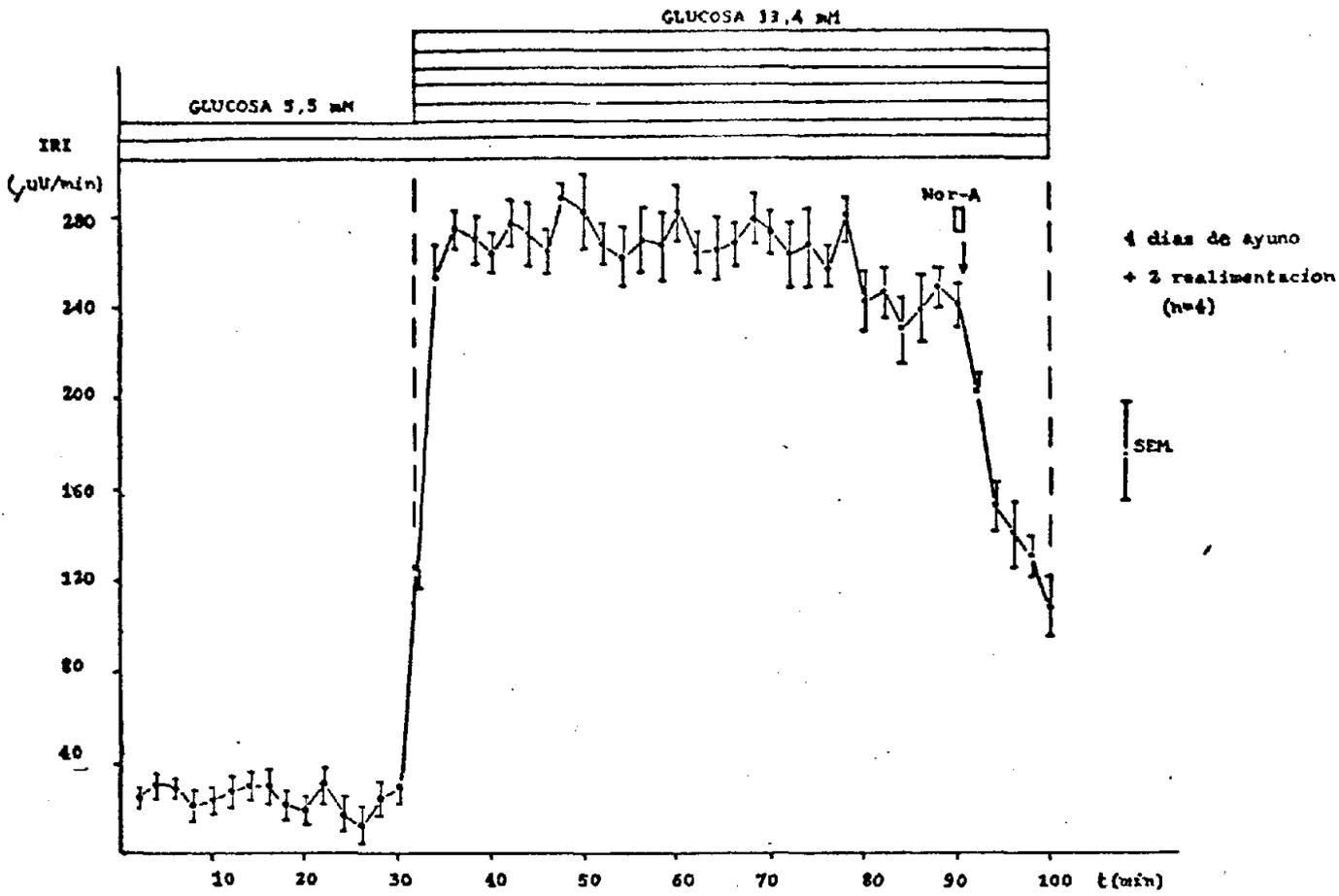


FIG. 49 ACCION DE LA GLUCOSA 5'5 Y 33'4 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO DE 4 DIAS DE AYUNO MAS DOS DE REALIMENTACION.

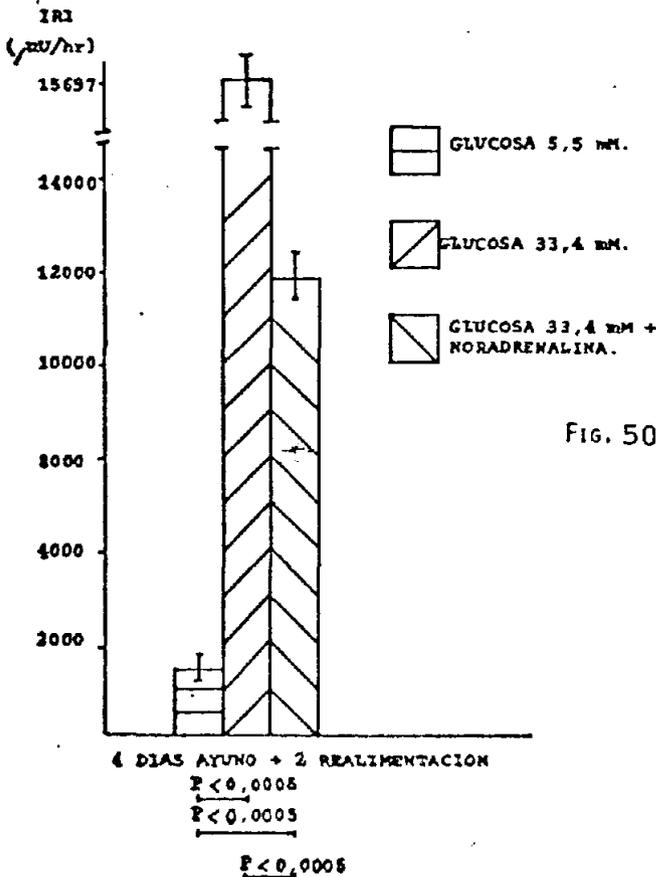


FIG. 50 4 DIAS DE AYUNO MAS 2 REALIMENTACION: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 5'5, 33'4 Y 33'4 mM MAS NORADRENALINA. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

4 DIAS DE AYUNO + 2 REALIMENTACION CON GLUCOSA 5'5 y 33'4mM

Tubo n°	INSULINA (μ U/min.)				\bar{X}	SEM
1	30'3	25'6	18'4	26	25	2'847
2	40'4	24'8	28'5	31'1	31'2	3'842
3	39'3	25	26'6	30'3	30	3'693
4	34'3	14	17'6	23'3	22'3	5'120
5	33	20'7	15'1	26'3	23'7	4'424
6	41	18	26	30'5	28'8	5'539
7	40'3	25'6	24	31'3	30'3	4'252
8	44'5	22'5	21'4	33'5	30'4	6'252
9	31'6	20'5	11'5	25'9	22'4	4'936
10	30'3	14	15'6	21'3	20'3	5'836
11	45'5	21'9	25'5	36'6	32'3	6'210
12	29	15	8	23	18'7	5'299
13	31'5	5	4	10'2	12'6	7'413
14	38'5	20	13'6	29	25	6'261
15	42	26	19	32	29'7	5'624
16	136	126	108	132	125'5	7'141
17	279	249	229	260	254'2	12'069
18	293	272	263	275	275'7	7'262
19	285	272	247	277	270'2	9'467
20	275'2	271	243'5	171	265'4	8'502
21	201	278	253	283	276'2	9'467
22	308	262	256	267	273'2	13'624
23	282	245	267	268	265'5	8'825
24	291'5	289'5	276'5	298	288'8	5'203
25	324'5	258	260'2	287'5	282'5	17'908
26	280	246	271	274	268	8'730

27	285	253	242	270	262'5	10'918
28	305	245	259	272	270'2	14'812
29	292	235	260'2	284	267'9	14'691
30	308	263	265	293	282'2	12'678
31	281	248	256	275	265	8'981
32	300	234	240	267	265'2	14'812
33	285	253	262	276	269	8'232
34	308	265	268	280	280'2	11'317
35	303	263	247	283	274	14'031
36	297'3	231'3	256'3	263'3	262	15'715
37	280	246	271	275	268	8'730
38	275'8	236'8	253'8	265'8	258	9'688
39	318	259	268	284	282'4	15'110
40	283'8	216'2	233'8	242	244	16'441
41	275'5	236	241	245'2	249'4	10'268
42	248	224'5	220'5	237	232'5	7'249
43	312	244	253'5	256'1	241'4	11'707
44	265	244	235	249	248'2	7'262
45	260	233	227	239	239'7	8'291
46	219'5	200'5	181'5	209'5	204	9'303
47	167'5	130	147	175	154'8	11'762
48	170	112	126	162	142'5	16'121
49	145	136	117	129	131'7	6'821
50	133'3	83'3	95'3	119'3	110	12'359

En las figuras 51 y 52 se muestra la dinámica de secreción de insulina en el grupo de 8 días de ayuno más dos de realimentación (n=4) frente a los grupos de 8 días de ayuno y controles respectivamente.

La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 2'75mM y un segundo periodo con glucosa 16'7mM. Al final de la perfusión se infundió un pulso de noradrenalina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 2'75mM el pancreas responde con una secreción basal de insulina que oscila levemente entre 6 y 9, μ U/min. El pasar de glucosa 2'75mM a glucosa 16'7mM aumenta lentamente la secreción de insulina alcanzando en 6 minutos 41 μ U, siendo el máximo de secreción obtenido el de 65 μ U a los 42 minutos despues de iniciada la perfusión con altos niveles de glucosa.

La perfusión con noradrenalina provoca un descenso lento de la secreción que llega a 16'2 μ U en el minuto 100 de la perfusión.

Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla n° 20 pag.198.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la media del periodo de glucosa 2'75mM es de $6'38 \pm 2'055$ μ U/min frente a $9'56 \pm 3'14$ μ U/min a los 8 días de ayuno y $34'06 \pm 5'57$ μ U/min en el grupo control. La del

periodo de glucosa 16'7mM es de $45'3 \pm 7'948$ μ U/min frente a $44'7 \pm 7'88$ μ U/min a los 8 días de ayuno y $172'5 \pm 7'5$ μ U/min en el grupo control, y la del periodo con infusión de noradrenalina es de $23'7 \pm 5'642$ μ U/min frente a $26'2 \pm 5'57$ μ U/min a los 8 días de ayuno y $108'8 \pm 7'398$ μ U/min en el grupo control.

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

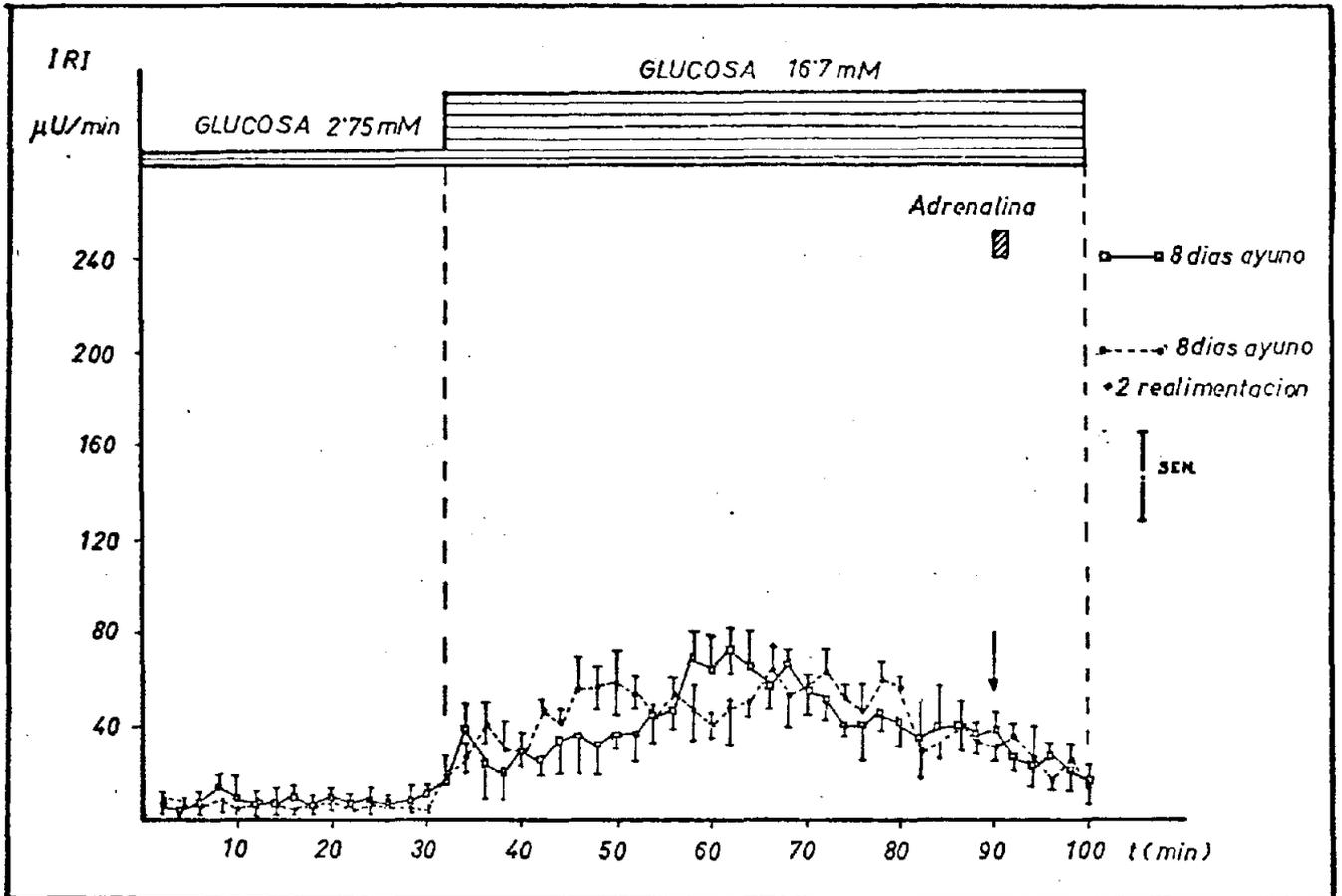


Fig.51 ACCION DE LA GLUCOSA 2.75 Y 16.7 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO DE 8 DIAS DE AYUNO MAS DOS DE REALIMENTACION FRENTE AL GRUPO DE 8 DIAS DE AYUNO.

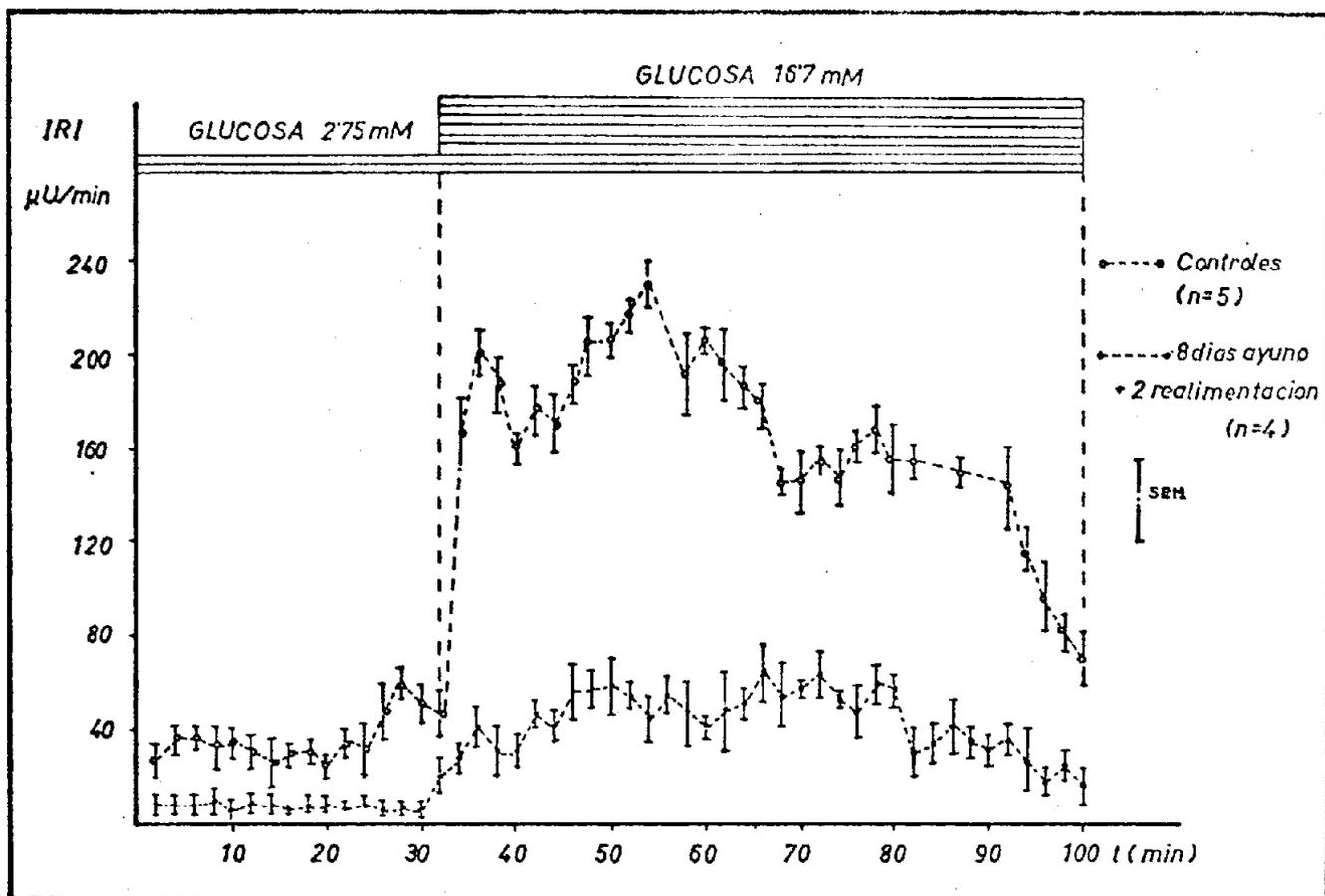


Fig. 52 ACCION DE LA GLUCOSA 2'75 Y 16'7 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO DE 8 DIAS DE AYUNO MAS DOS DE REALIMENTACION FRENTE AL GRUPO CONTROL.

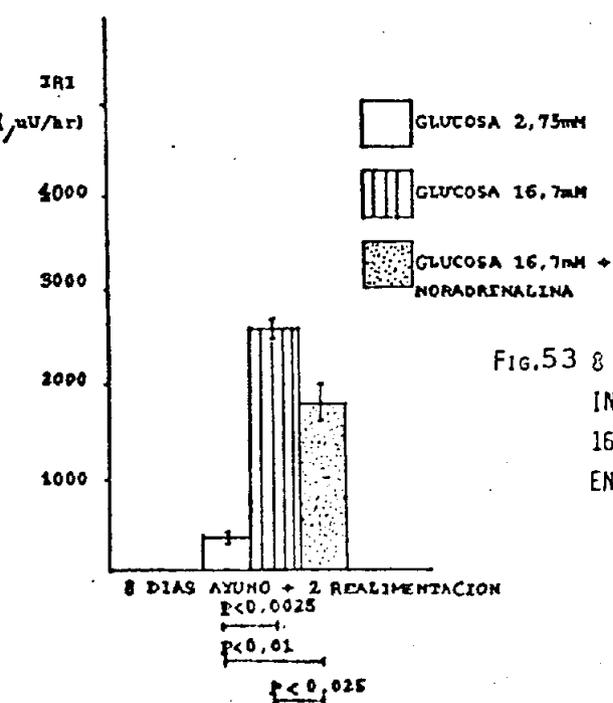


Fig. 53 8 DIAS DE AYUNO MAS 2 REALIMENTACION: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 2'75, 16'7 Y 16'7 mM MAS NORADRENALINA. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

8 DIAS DE AYUNO +2 REALIMENTACION CON GLUCOSA 2'75 y 16'7mM

Tubo n°	INSULINA (/uU/min.)				\bar{X}	SEM
1	9'5	7	3'6	5	6'3	3'622
2	10'2	7'5	3'5	3'5	6'2	1'893
3	10'4	9	4	7	7'6	1'499
4	17	11	3'5	5	9'1	3'562
5	10'3	6	2'5	4'5	5'8	1'911
6	15'9	9'2	3'8	5'8	8'7	3'064
7	11'5	6'4	3'5	4'5	6'5	2'055
8	9	6'6	2'4	3	5'2	1'797
9	13'5	5	2'6	3'7	6'2	2'866
10	12'7	9'6	2'6	5	7'5	2'618
11	7'3	6	1'4	5'6	5	1'479
12	10	8	3	6	6'7	1'724
13	10'6	4'3	2'4	3	5	2'058
14	10'5	7	2'6	3'4	5'8	2'095
15	7	5	2	2	4	1'414
16	31'2	23	15	17	21'8	4'201
17	37	28	18	23	26'2	4'678
18	68	43'1	22'4	33	41'6	11'263
19	47	28	17	21	28'3	7'719
20	55	31	15	26	31'7	9'745
21	70	55	28	42'2	48'8	10'350
22	54	32	17	25	32	9'177
23	77	60	41	51	57'2	8'824
24	71	57'5	52	44'6	56'2	6'437
25	86	50'9	44	51	57'9	10'951
26	75	62	35'2	47	54'8	10'027

27	69	40	29	39	44'2	9'948
28	74	64	38	44	55	9'729
29	64	50'2	31'2	45	47'6	7'827
30	60'5	44	24	32	40	9'166
31	64'5	54	35	47	50'4	7'150
32	61'3	56'3	37'6	48	50'8	5'987
33	87'8	66	41	60	63'7	11'131
34	68'2	59	38	45	52'5	7'854
35	51	38	19	22	32'5	8'596
36	83	70	53'3	55	65	8'234
37	67	49	41	44	50'2	6'722
38	61	47'5	34'6	44	46'7	6'314
39	79	53	49	60	60'2	7'679
40	72'8	60	46	58	59'2	6'375
41	49	36	15	20	30	8'956
42	46'5	39'6	22'9	28'5	34'3	6'151
43	58'6	44'3	26'9	40'5	42'5	7'526
44	50'8	35'7	21'9	20'7	32'2	7'797
45	41	37	19	24	30'2	6'025
46	40	26'5	17'6	21	36	5'691
47	41'5	24'6	18	20'7	26	6'093
48	32	20	9	10	18	6'189
49	36'4	29	16	21	25'6	5'180
50	30	15	9	12	16'2	5'385

Los resultados obtenidos entre el lote de 8 días de ayuno, frente al de 8 días de ayuno más 2 de realimentación son curvas idénticas.

Este hecho se podría explicar de dos formas:

a) No habría diferencias entre ambos grupos por llegar a una situación metabólica, en la cual no es posible la recuperación, ó bien,

b) que tras 8 días de ayuno, las ratas no comiesen.

Pensando en esta segunda posibilidad, se procedió a la realimentación con sonda gástrica, apareciendo un desbloqueo en la secreción de insulina.

En las figuras 54 y 55 se muestra la dinámica de secreción de insulina en el grupo de 8 días de ayuno más 2 de realimentación con sonda (n=4) frente a los grupos de 8 días de ayuno y controles respectivamente.

La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 2'75mM y un segundo periodo con glucosa 16'7mM. Al final de la perfusión se infundió un pulso de noradrenalina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 2'75mM el pancreas responde con una secreción basal de insulina que oscila levemente entre 10 y 20 μ U/min. Al pasar de glucosa 2'75mM a glucosa 16'7mM aumenta lentamente la secreción de insulina alcanzando a los 8 minutos 50 μ U, siendo el máximo de secreción obtenido el de 112 μ U a los 56 minutos después de iniciada la perfusión con altos niveles de glucosa.

La perfusión con noradrenalina provoca un descenso brusco al principio de la secreción, que llega a 58 μ U en el minuto 100 de la perfusión.

Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla n° 21 pag. 205.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la media del periodo de glucosa 2'75mM es de $12'9 \pm 3'281$ μ U/min frente a $9'56 \pm 3'14$ μ U/min a los 8 días de ayuno y $34'06 \pm 5'57$ μ U/min en el grupo control. La del

periodo de glucosa 16.7mM es de 76.28 ± 7.884 $\mu\text{U}/\text{min}$ frente a 44.7 ± 7.88 $\mu\text{U}/\text{min}$ a los 8 días de ayuno y 172.5 ± 7.5 $\mu\text{U}/\text{min}$ en el grupo control y la del periodo con infusión de noradrenalina es de 71.2 ± 7.899 $\mu\text{U}/\text{min}$ frente a 26.2 ± 5.57 $\mu\text{U}/\text{min}$ a los 8 días de ayuno y 108.8 ± 7.39 $\mu\text{U}/\text{min}$ en el grupo control.

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

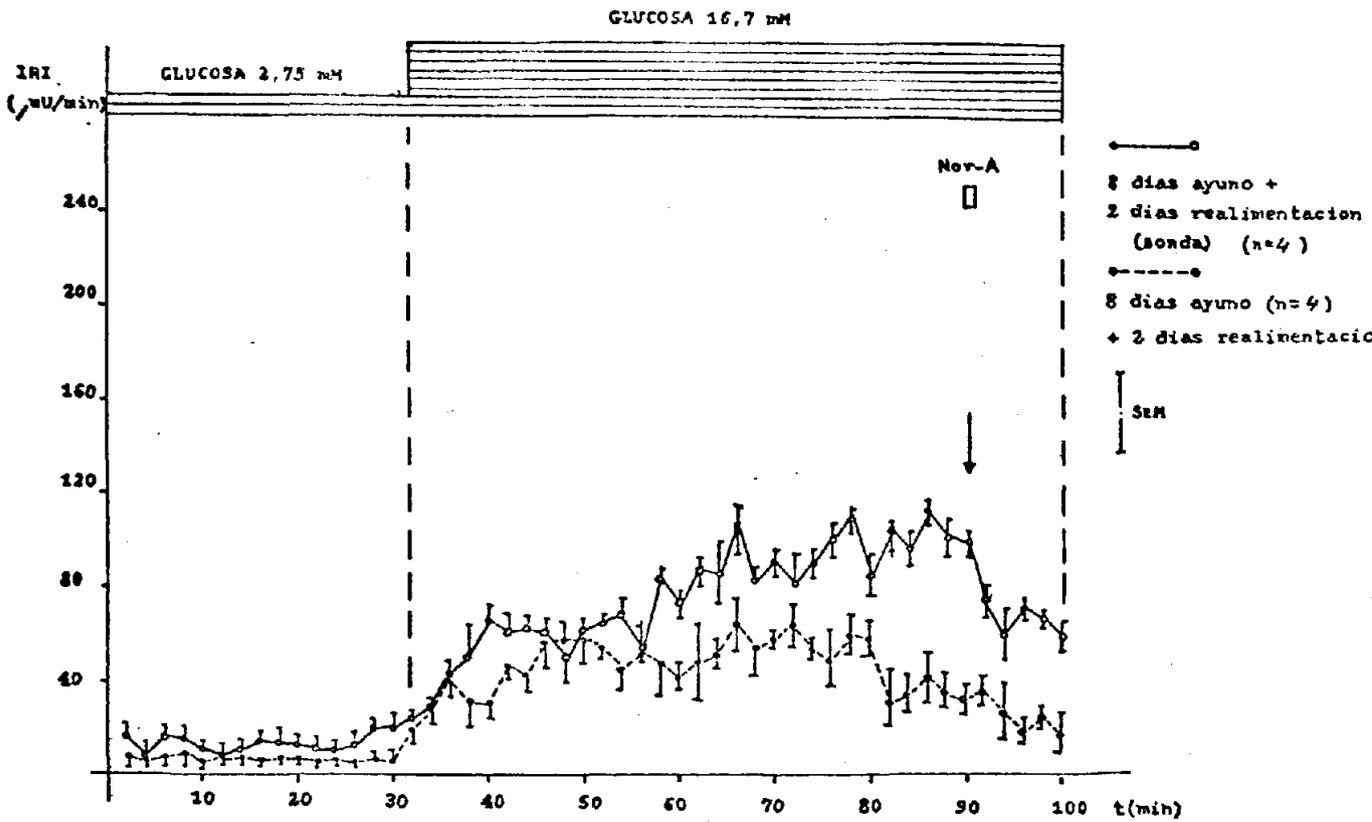


FIG. 54 ACCION DE LA GLUCOSA 2'75 Y 16'7 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN EL GRUPO DE 8 DIAS DE AYUNO MAS DOS DE REALIMENTACION CON SONDA FRENTE AL GRUPO DE 8 DIAS DE AYUNO MAS DOS DE REALIMENTACION LIBRE.

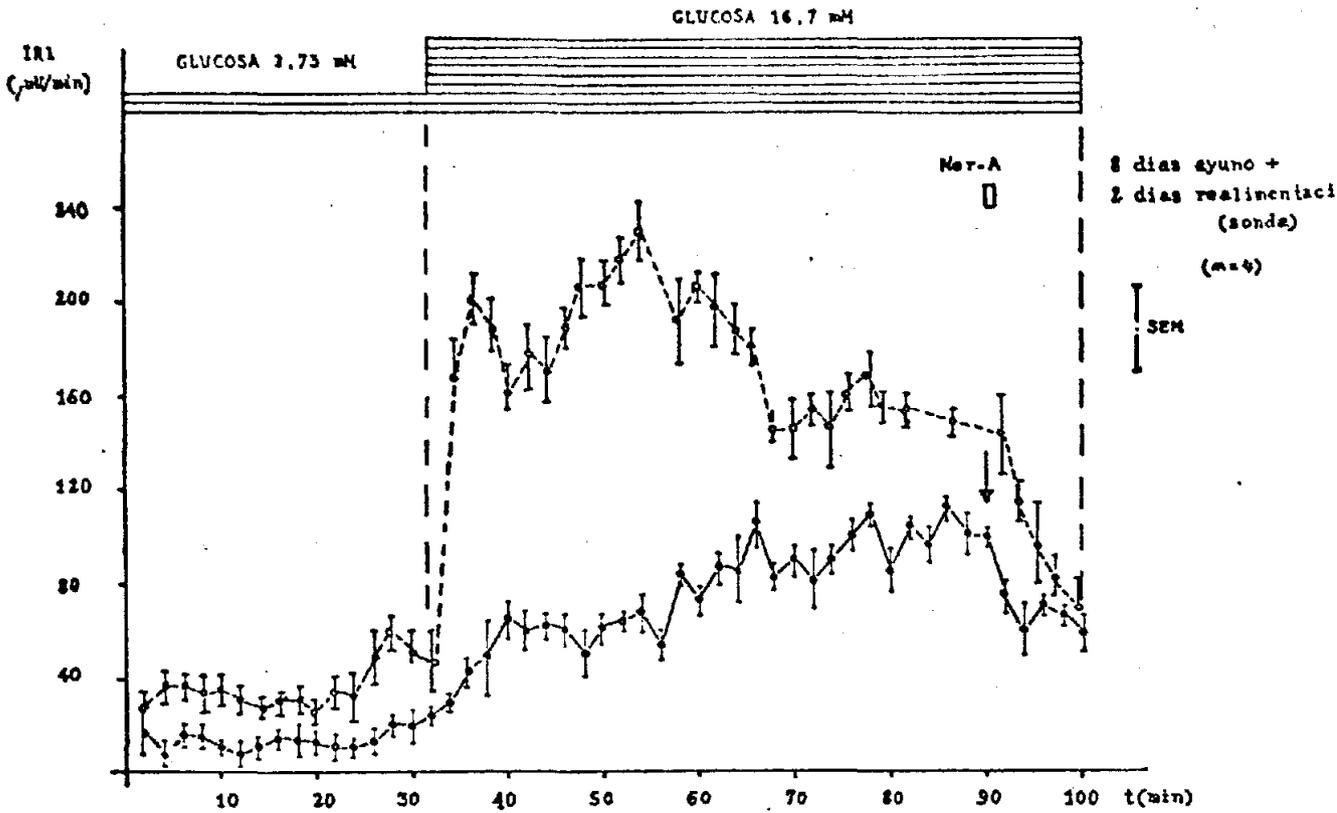


Fig 55 ACCION DE LA GLUCOSA 2'75 Y 16'7 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO DE 8 DIAS DE AYUNO MAS DOS DE REALIMENTACION CON SONDA.

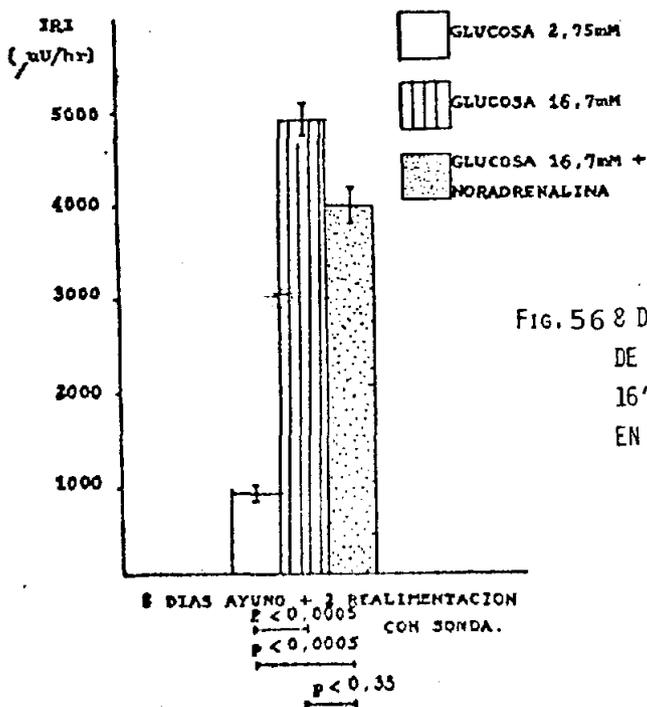


Fig. 56 8 DIAS DE AYUNO MAS 2 REALIMENTACION CON SONDA: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 2'75, 16'7 Y 16'7 mM MAS NORADRENALINA. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

DIAS DE AYUNO + 2 REALIMENTACION CON Sonda Y GLUCOSA 2'75, 16'7mM

Tubo n°	INSULINA (μ U/min.)				\bar{X}	SEM
1	21	23	10'3	9'4	16	4'082
2	16	8	3'3	4'4	79	3'317
3	20	28	7	9'2	16	5'648
4	11'2	26'6	10'2	8	14	4'910
5	17	10	9	4	10	3'091
6	13	8	6'2	5	8	2'033
7	19	10	7'5	5'5	10'5	5'958
8	20'2	16'3	10'5	5'3	13	3'774
9	21'5	13	6	10'2	12'5	3'780
10	18	13'5	9'5	7	12	2'778
11	19'3	10	6'6	5	10	3'694
12	14'3	11'7	7	6'1	9'5	2'245
13	21	15'7	7'8	11'8	14	3'251
14	29	24	10'5	16'5	20	4'707
15	33	22'5	10	18	20'8	5'539
16	29'6	30	16'4	20'3	24	3'926
17	40'6	33	20	27	30'1	5'058
18	60'4	52	23	41	44	9'326
19	80	66	31	23	50	15'797
20	85	70'3	52'2	57	66'1	8'504
21	74'5	72	44'5	49	60	8'916
22	80	67'5	49	52'1	62'1	8'307
23	90	58	42	56	60'2	11'714
24	70	60	30	45	51'2	10'103
25	78'6	60'6	50	53'2	60'3	7'386
26	77'2	68'6	48'8	60'5	63'7	6'979

27	82'5	72	53	65	68'1	7'152
28	68'5	58	39	51	54'1	7'150
29	100	86'5	73	76'5	84	6'988
30	91	73	67'5	65'5	74'2	6'702
31	100	96'5	71'5	84	88	6'087
32	120	89'5	60	75'5	86'2	14'734
33	122	110	88	107	106	8'129
34	112	91	71'5	64'5	84'7	12'325
35	110	99	80'5	70'5	90	10'277
36	96	90	71	63	80	8'978
37	108	97'5	65'5	89	90	10'438
38	117'5	100'5	88'8	93'4	100	7'263
39	123	116	95'5	105	109'2	6'991
40	103	94	67	81	86	8'856
41	114	113	81	108	104	8'978
42	109	102'8	82	90'4	96	7'009
43	126	115'5	97	109'5	112	6'986
44	116'1	100'3	88	96'6	100	6'784
45	109	103	85'2	95	98	5'946
46	97	70	68'5	61'5	74	9'012
47	82	70'5	47	40'5	60	11'272
48	83	77	68'5	51'5	70	6'939
49	87	62	60'5	57'5	66'7	7'868
50	78'5	61'5	40'6	52'5	58'2	9'221

3.6) AYUNO Y ESTIMULACION CON NIVELES ELEVADOS DE CALCIO(A)
TEOFILINA(B) Y db-AMPC(C).

A) AYUNO Y ESTIMULACION CON NIVELES ELEVADOS DE CALCIO²⁺

Durante toda la perfusión se ha utilizado Calcio²⁺ 7mM concentración doble de la habitual. Este aumento del calcio podría incrementar la descarga de insulina al medio extracelular, a través de una contracción de los microfilamentos (ó microtúbulos) que conectan los granulos de insulina con la membrana de la célula Beta (Lacy 1970).

En la figura 58 se muestra la dinámica de secreción de insulina en un grupo control de 4 días de ayuno (n=4).

La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 2'75mM + calcio²⁺ 7'4mM, y un segundo periodo con glucosa 16'7mM + calcio²⁺ 7'4mM. Al final de la perfusión se infundió un pulso de noradrenalina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 2'75mM el páncreas responde con una secreción basal de insulina que oscila entre 12 y 20 μ U/min.

Al pasar de glucosa 2'75mM + calcio²⁺ 7mM a glucosa 16'7mM + calcio²⁺ 7mM aumenta lentamente la secreción de insulina alcanzando a los 12 minutos 62 μ U, siendo el máximo de secreción obtenido el de 126 μ U a los 42 minutos después de iniciada la perfusión con altos niveles de glucosa.

El pulso de noradrenalina provoca un descenso de la

secreción que llega a $42 \mu\text{U}$ en el minuto 100 de la perfusión.

Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla n° 22 pag. 210

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la media del periodo de glucosa 2.75mM + calcio²⁺ 7.4mM es de 17.43 ± 5.136 , siendo $13.1 \pm 3.38 \mu\text{U}$ en el grupo de 4 días de ayuno (calcio habitual 3.5mM) y de la del periodo de glucosa 16.7mM + calcio²⁺ (7.4mM) es de $95.2 \pm 12.77 \mu\text{U}/\text{min}$ frente a $55.9 \pm 7.3 \mu\text{U}/\text{min}$ en el grupo de 4 días de ayuno y la del periodo con infusión de noradrenalina es de $70.3 \pm 11.124 \mu\text{U}/\text{min}$ frente a $73.08 \pm 7.848 \mu\text{U}/\text{min}$ en el grupo de 4 días de ayuno.

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

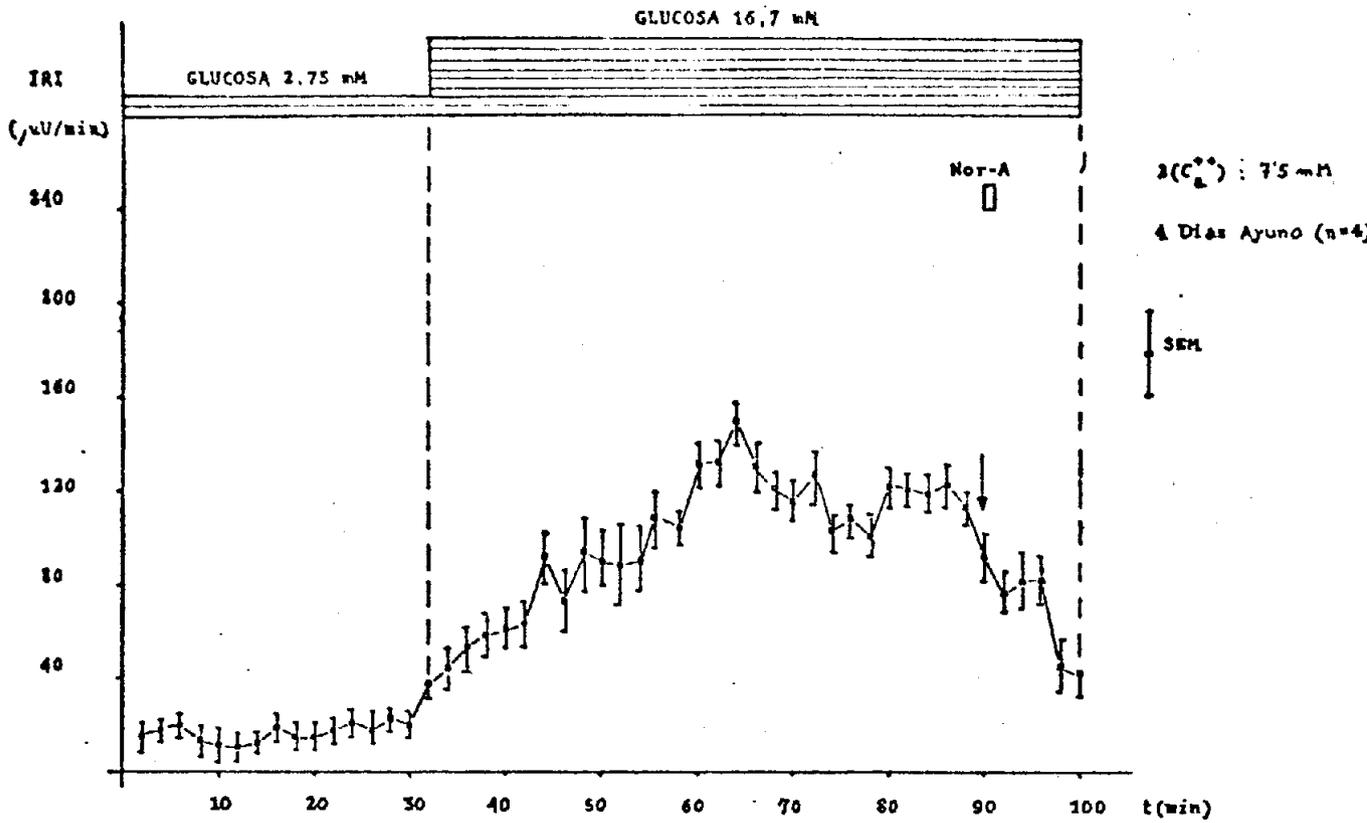


Fig. 58 ACCION DEL Ca^{2+} 7'5 mM EN PRESENCIA DE GLUCOSA 2'75 Y 16'7 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO DE 4 DIAS DE AYUNO.

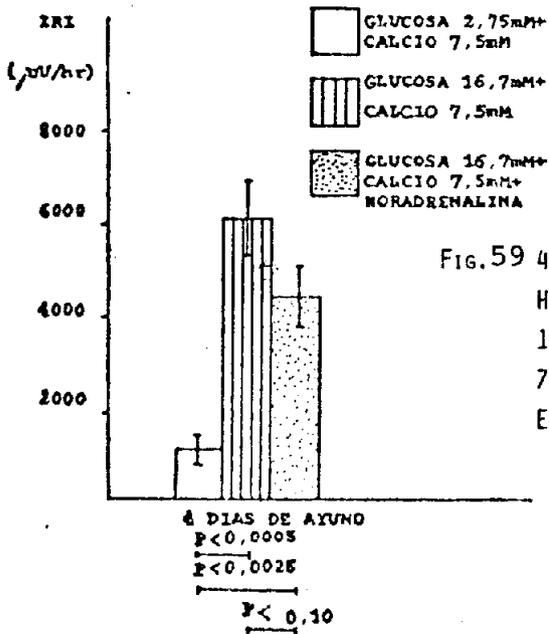


Fig. 59 4 DIAS DE AYUNO: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 2'75 mM MAS CALCIO 7'5 mM, GLUCOSA 16'7 mM MAS CALCIO 7'5 mM Y GLUCOSA 16'7 mM MAS CALCIO 7'5 mM MAS NORADRENALINA. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

TABLA 22

4 DIAS DE AYUNO CON GLUCOSA 2'75 Y 16'7mM y CALCIO 7'5mM

Tubo n°	INSULINA (μU/min.)				\bar{X}	SEM
1	35'3	10'6	8'4	16	17'5	7'067
2	29'2	10'8	8'8	25'9	18'6	5'986
3	32'3	12	15'6	21'3	20'3	5'120
4	23'9	4'8	9'8	20'2	14'6	5'130
5	31'5	5	4	10'2	12'6	7'413
6	27	8'2	6	9'2	12'6	5'596
7	23	5'1	10'7	16'3	13'7	4'424
8	30'3	10'1	17'7	21	19'7	4'832
9	22'6	9'3	8'4	20	15'07	4'200
10	26	5	10	18	14'7	5'320
11	26'9	8'8	19'2	19'2	18'5	4'289
12	33	10	18	22'5	20'8	5'539
13	30	9	14	20'9	18'5	5'254
14	33	15'1	20'7	26'3	23'7	4'424
15	33	11	14	22	20	5'676
16	48'6	25'8	31'8	43'7	37'5	6'064
17	61'3	26'4	31'6	57	44'07	10'17
18	78	44	36	60	54'6	10'72
19	75	43	52	66	59	8'232
20	76	43	51	70	60	8'981
21	81	42'2	53	72'3	62'1	10'220
22	115'5	81'9	75'5	96'6	92'4	10'258
23	104	47	55	90	74	15'979
24	127	71'5	82'9	95'6	94'2	13'827
25	120'5	70'9	81'6	92'5	91'3	12'312
26	126	60	75	99	90	16'673

27	113	53	89	105	90	15'362
28	130'5	95	94	117	109'1	10'258
29	125	96	100	103	106	7'498
30	151	113	128	141	133'2	9'502
31	153	117	120	145	133'7	10'364
32	165'5	147	135	155	150'6	7'436
33	159'3	116	125	121	130'3	11'353
34	121	103	127	131	120'5	7'141
35	130	101	113	120	116	7'039
36	149	107	121	129	126'5	10'127
37	116	83	106	110	103'7	8'331
38	123	95	100	115	108'2	7'503
39	110	106	109	75	100	9'672
40	143	115	110	126'3	123'5	8'449
41	135	108	112	129	121	7'527
42	133	104	116	123	119	7'039
43	142	109	116'9	120	121'9	8'158
44	130	101	110	113	113'5	7'000
45	118'5	76'8	80'4	92'5	92	10'893
46	95	60	70	84	77'2	8'886
47	108	63	65	93	82'2	12'678
48	102	56	70	104	83'1	10'309
49	65	30	25'4	59'6	45	11'653
50	71	25	33	41	42'5	11'599

En la figura 60 se muestra la dinámica de secreción de insulina en un grupo de 4 días de ayuno ($n=4$).

La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 5'5mM y calcio²⁺ 7'4mM y un segundo periodo con glucosa 33'4mM y calcio²⁺ 7'4mM. Al final de la perfusión se infundió un pulso de noradrenalina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 5'5mM el páncreas responde con una secreción basal de insulina que oscila entre 20 y 35 μ U/min. Al pasar de glucosa 5'5mM + calcio²⁺ 7mM a glucosa 33'4mM + calcio²⁺ 7mM hay un aumento rápido en la secreción de insulina, alcanzando a los 4 minutos 134 μ U y siendo el máximo de secreción obtenido el de 230 μ U a los 34 minutos después de iniciada la perfusión con altos niveles de glucosa.

El pulso de noradrenalina provoca un descenso rápido en la secreción, que llega a 85 μ U en el minuto 100 de la perfusión.

Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla n° 23 pag. 215.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la media del periodo de glucosa 5'5mM + calcio²⁺ 7'4mM es de 25'96⁺4'993 μ U/min frente a 17'9⁺4'4 μ U/min en 4 días de ayuno.

La del periodo de glucosa 33'4mM + calcio²⁺ 7'4mM es de

197'3[±]8'842 μ U/min frente a 181'5[±]8'3 μ U/min en el grupo (p.119) y la del periodo con infusión de noradrenalina es de 120'7[±]8'311 μ U/min.

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

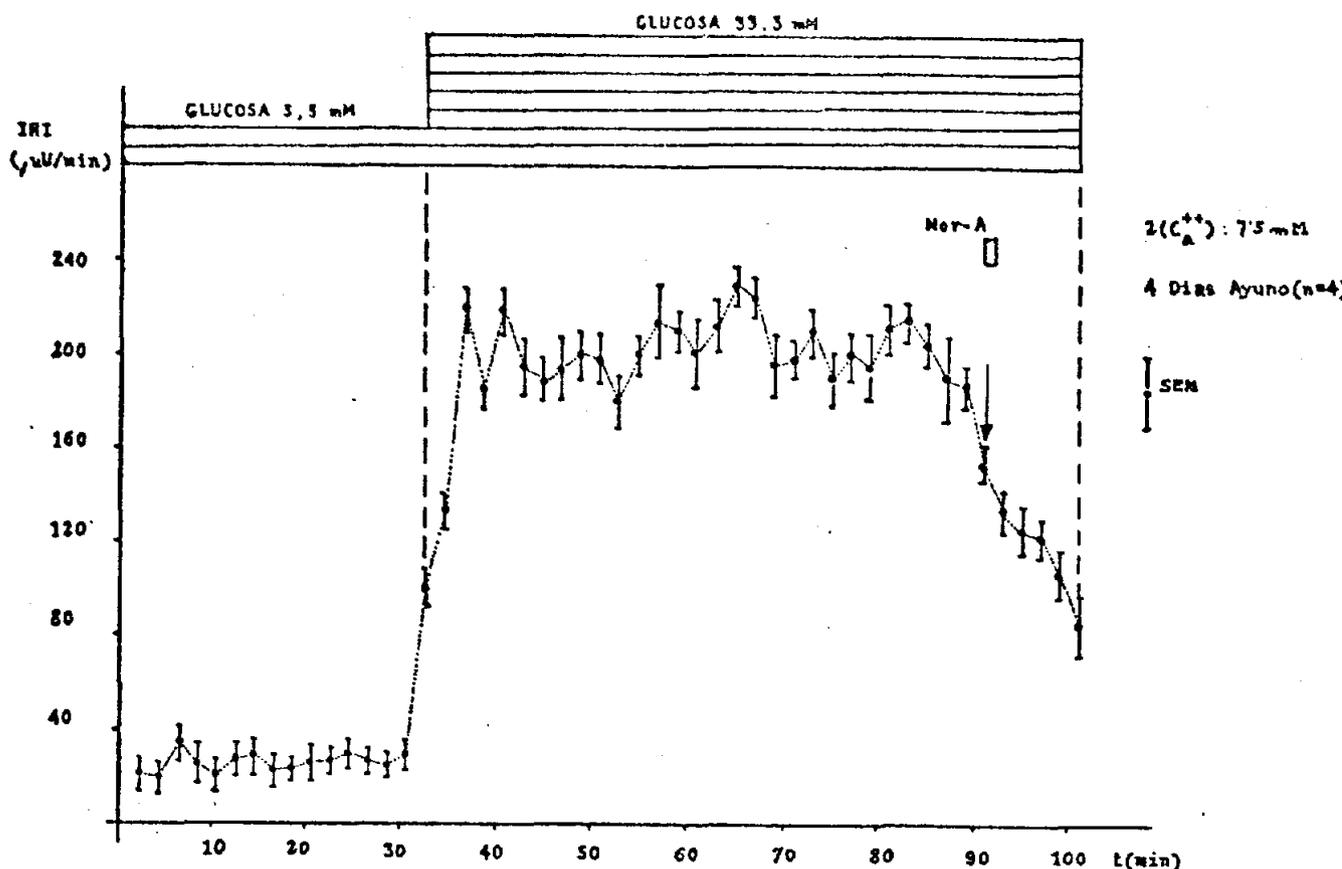


FIG. 60 ACCION DEL CA²⁺ 7.5 mM EN PRESENCIA DE GLUCOSA 5.5 Y 33.4 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO DE 4 DIAS DE AYUNO.

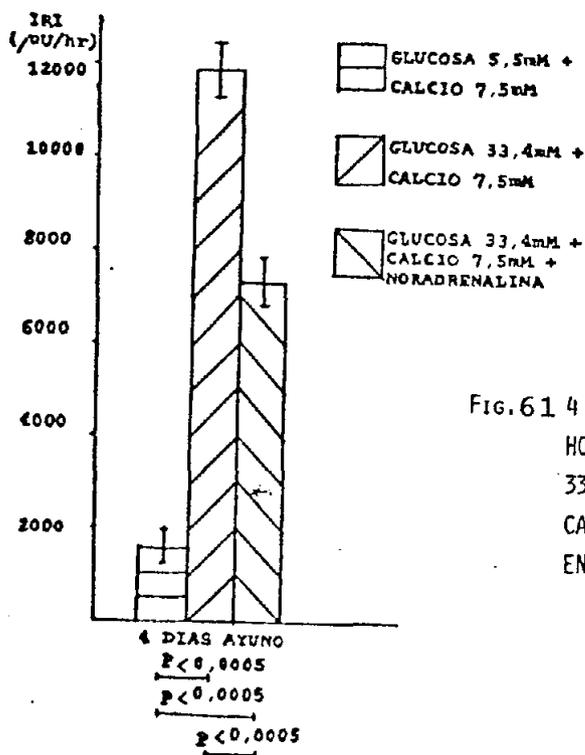


FIG. 61 4 DIAS DE AYUNO: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 5.5 mM MAS CALCIO 7.5 mM, GLUCOSA 33.4 mM MAS CALCIO 7.5 mM Y GLUCOSA 33.4 mM MAS CALCIO 7.5 mM MAS NORADRENALINA. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

4 DIAS DE AYUNO CON GLUCOSA 5'5 Y 33'4mM Y CALCIO 7'5 mM

Tubo n°	INAULINA (μ U/min.)				\bar{X}	SEM
1	36'6	14'3	30'5	6'9	22	7'977
2	37	19	12'1	12'1	20	6'788
3	48	22'6	37'4	32'3	35	6'108
4	38'5	20	29	13'6	25'2	6'261
5	32	16	22	10'5	20'1	5'314
6	38'6	21'8	33'7	15'8	27'5	6'064
7	43'5	20'4	32'5	21'5	29'4	6'252
8	31'6	20'5	25'9	11'5	22'4	4'936
9	34'1	18'1	30	10'7	23'2	6'212
10	32'6	20'3	33	14'4	25	5'335
11	37'7	20	17'6	34'6	27'5	5'856
12	40'3	24	31'3	25'6	30'3	4'252
13	34'2	25	32'7	18	27'5	4'326
14	32	12	23	30	24'2	5'214
15	42	26	32	19	29'7	5'624
16	114	104	112	85	103'7	7'635
17	139	132	148	120	134'7	6'821
18	242	213	222	208	221'2	8'658
19	200	168	189'5	192'1	187'4	7'899
20	239	205	226	210	220	8'956
21	211'1	188	208'3	170	194'3	11'097
22	210	182	192'5	171'2	188'9	9'539
23	206	193	213	165	194'2	12'232
24	188	200	228	185	200'2	11'317
25	222	182	204	188	199	10'349
26	200'3	175	191'5	153'3	180	11'936

27	219	182	205	204	202'5	8'825
28	245	205	227	185	215	15'066
29	231	215	202	193	210'2	9'537
30	226	175	218	181	200	14'854
31	234	207	184	223	212	12'534
32	253	228	219	222	230'5	8'925
33	243	218	230	212	225'7	7'921
34	223	185	210	167	196'2	14'478
35	214	185	204	190	198'2	7'635
36	236'5	202	206'2	197	210'4	10'268
37	200	170	216	174	190	12'613
38	228	185	195	196	201	10'780
39	224	180	211	165	195	15'712
40	235	203	220	192	212'5	10'918
41	228	199	215	218	215	6'944
42	218	208	212	185	205'7	8'331
43	228	170	208	156	190'5	19'215
44	203	195	182	168	187	8'856
45	167	147	155	141	152'5	6'489
46	144	108	158	129	134'7	12'359
47	140	117	134	109	125	8'340
48	134	115	120	109	119'5	6'155
49	114	91	130	95	107'5	10'419
50	115	65	85	75	85	12'472

B) AYUNO Y ESTIMULACION CON TEOFILINA.

Los derivados de las metilxantinas son capaces de potenciar la acción insulina secretora de la glucosa puesto que al anibir a la fosfodiesterasa aumentarían los niveles de AMPc en la célula Beta pancreática.

Aunque el AMPc no es capaz de desencadenar la secreción de insulina por sí misma, potencia la secreción producida por la glucosa.

Creimos interesante comprobar si la teofilina era capaz de desbloquear el efecto bloqueante del ayuno sobre la secreción de insulina.

Durante toda la perfusión se ha utilizado teofilina 5mM.

En la figura 62 se muestra la dinámica de secreción de insulina en un grupo control (n=4).

La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 2'75mM + teofilina 5mM y un segundo periodo con glucosa 16'7mM y teofilina 5mM. Al final de la perfusión se infundió un pulso de noradrenalina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 2'75mM + teofilina 5mM el páncreas responde con una secreción de insulina que oscila entre 25 y 35 μ U. Al pasar de glucosa 2'75mM + teofilina 5mM a glucosa 16'7mM + teofilina 5mM hay un aumento rapidísimo en la secreción de insulina alcanzando a los 4 minutos 287 μ U y siendo el máximo de secreción obtenido el de 340 μ U a los 6 minutos después de iniciada la

perfusión con altos niveles de glucosa.

El pulso de noradrenalina provoca un descenso de la secreción que llega a 105 μ U en el minuto 100 de la perfusión.

Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla n° 24 pag. 220.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la media del periodo de glucosa 2'75mM +teofilina 5mM es de 30'17 \pm 2'154 μ U/min frente a 34'06 \pm 5'5 μ U/min en el grupo control sin teofilina.

La del periodo de glucosa 16'7mM +teofilina 5mM es de 294'26 \pm 6'788 μ U/min frente a 172'5 \pm 7'5 μ U/min en el grupo control (p.94) y la del periodo con infusión de noradrenalina es de 149'48 \pm 5'836 μ U/min frente a 108'80 \pm 7'39 μ U/min en el grupo control (p.94).

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

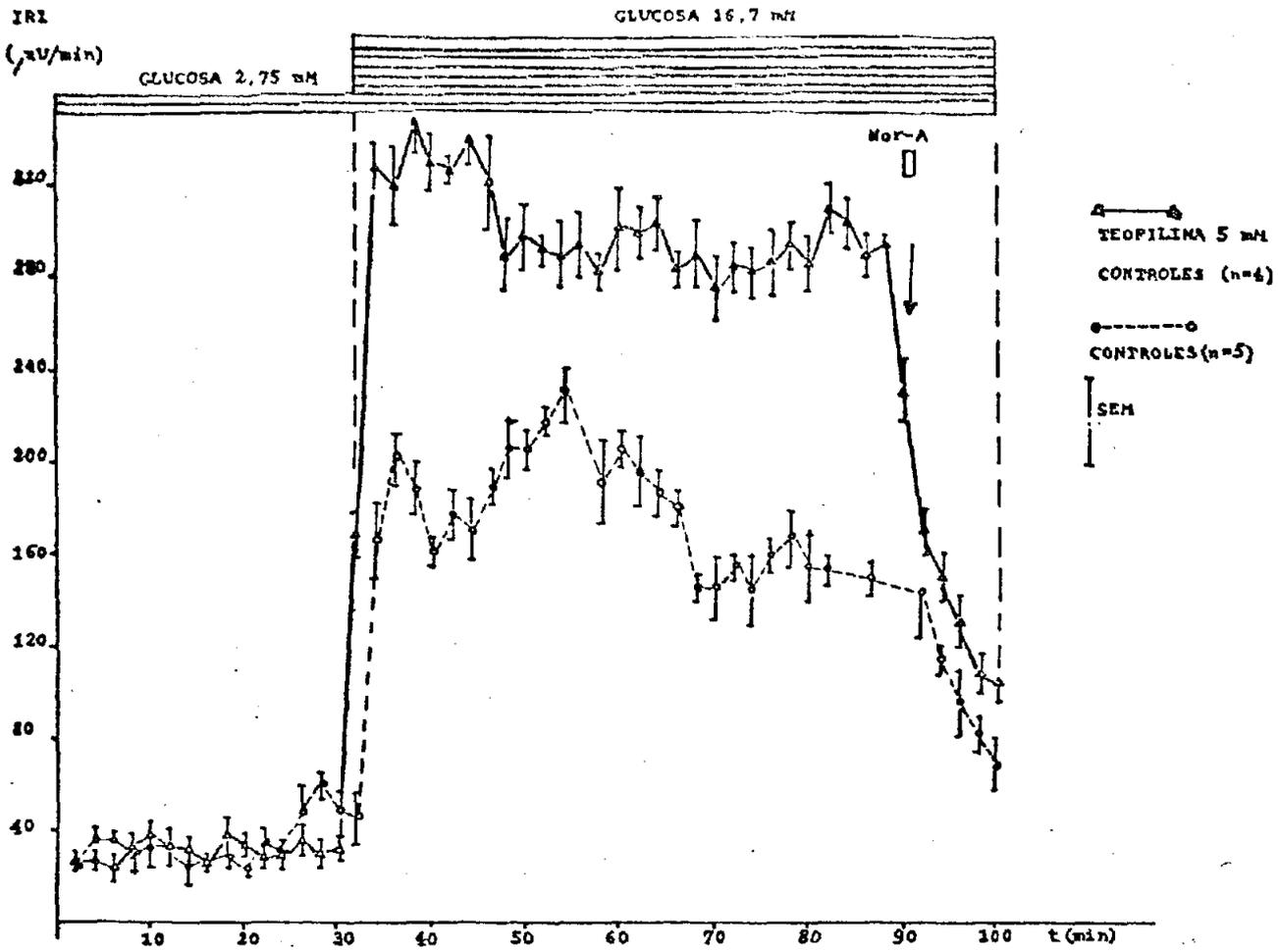


Fig.62 ACCION DE LA TEOFILINA 5 mM EN PRESENCIA DE GLUCOSA 2'75 Y 16'7 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO CONTROL.

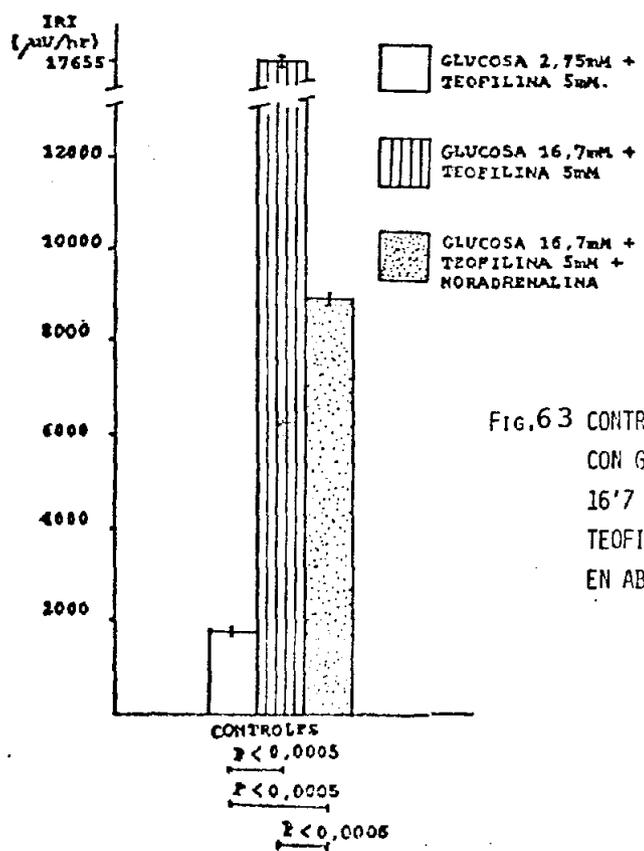


Fig.63 CONTROLES: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 2'75 mM MAS TEOFILINA 5mM, GLUCOSA 16'7 mM MAS TEOFILINA 5 mM Y GLUCOSA 16'7 mM MAS TEOFILINA 5 mM MAS NORADRENALINA. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

CONTROLES CON GLUCOSA 2'75 y 16'7mM Y CON TEOFILINA 5mM

Tubo n°	INSULINA (μ U/min.)				\bar{X}	SEM
1	30'3	26	18'4	25'6	25	2'847
2	29'5	31	24'6	20	26'2	2'885
3	20'7	15'1	33	26'3	23'7	4'424
4	31'6	40'5	26'9	30'5	32'4	3'335
5	40'9	48'8	34	31	38'7	4'573
6	36'6	45'5	21'9	25'5	32'3	6'210
7	31'1	40'4	24'8	28'5	31'2	3'842
8	27'3	26	21'4	25'6	25	1'475
9	43'7	48'6	25'8	31'8	37'5	6'064
10	32'6	39'5	26'9	30'5	32'4	3'060
11	29'6	22'6	25	32'7	27'5	2'618
12	37'5	22'5	19'4	23'5	26'5	4'489
13	30	45'7	28	36'6	35'07	4'607
14	18'8	29'8	36'9	29'2	28'7	4'303
15	25	39'3	26'6	30'3	30'3	3'693
16	160	196	179	170	176'2	8'823
17	263	265	291	329	287	17'769
18	338	325	378	320	340'2	15'175
19	300	348	345	348	335'2	13'592
20	311	320	318	330	319'7	4'530
21	289	318	325	328	315	10'295
22	270	253	298	340	290'2	21'941
23	265	314	290'2	322	297'9	14'691
24	264	320	299	277	290	14'243
25	298'7	298'8	307'9	290'6	298'5	4'132
26	271	285	327	287	292'6	14'010

27	268	281'2	296'5	317'5	290'8	12'280
28	279	302	306	293	295	6'912
29	258	260'2	287'5	324'5	282'5	17'908
30	278	309	295	327	302'2	12'012
31	296	279	308	318	300'2	9'688
32	310	293	301	317	305'2	6'043
33	270	261	286	320	284'4	15'110
34	264	290	280	326	290	15'173
35	253	291	283	278	276'2	9'467
36	291	263'5	295'2	292	285'4	8'502
37	276	263	276'4	319	383'6	14'091
38	265	280	306'5	298	287'3	10'717
39	277	281	310	312	395	10'718
40	358	290	299'5	302'1	287'4	11'707
41	297	310'5	304'6	328'3	310'3	7'548
42	302	311	307	301	305'2	2'682
43	270	267	317	306	290	14'583
44	303	296	295	286	295	4'0277
45	235	246	222'5	218'5	230'5	7'249
46	173'5	191'3	163	152'5	170	9'613
47	162'5	170	125	142'2	150	11'645
48	155	141	105	126	131'7	12'359
49	123	95	115	100	108'2	7'503
50	118	85	112	108	105'7	8'331

En la figura 64 se muestra la dinámica de secreción de insulina en un grupo control (n=4).

La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 5'5mM + teofilina 5mM y un segundo periodo con glucosa 33'4mM y teofilina 5mM. Al final de la perfusión se infundió un pulso de noradrenalina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 5'5mM + teofilina 5mM el pancreas responde con una secreción de insulina que oscila entre 40 y 57, μ U/min. Al pasar de glucosa 5'5mM + teofilina 5mM a glucosa 33'4mM + teofilina 5mM hay un aumento rapidísimo en la secreción de insulina alcanzando a los 4 minutos 348, μ U, siendo el máximo de secreción obtenido el de 381, μ U a los 6 minutos después de iniciada la perfusión con altos niveles de glucosa.

El pulso de noradrenalina provoca un descenso de la secreción que llega a 120, μ U en el minuto 100 de la perfusión.

Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla n° 25 pag. 225.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la media del periodo de glucosa 5'5mM + teofilina 5mM es de $48'21 \pm 0'41$, μ U/min frente a $29'4 \pm 4'14$, μ U/min en el grupo control sin teofilina (p.99).

La del periodo de glucosa 33'4mM +teofilina 5mM es de $350'21 \pm 2'993$ uU/min frente a $314'6 \pm 2'8$ uU/min en el grupo control sin teofilina (p.99) y la del periodo con infusión de noradrenalina es de $162'6 \pm 2'907$ uU/min frente a $147'1 \pm 1'97$ uU/min en el control (p.99).

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

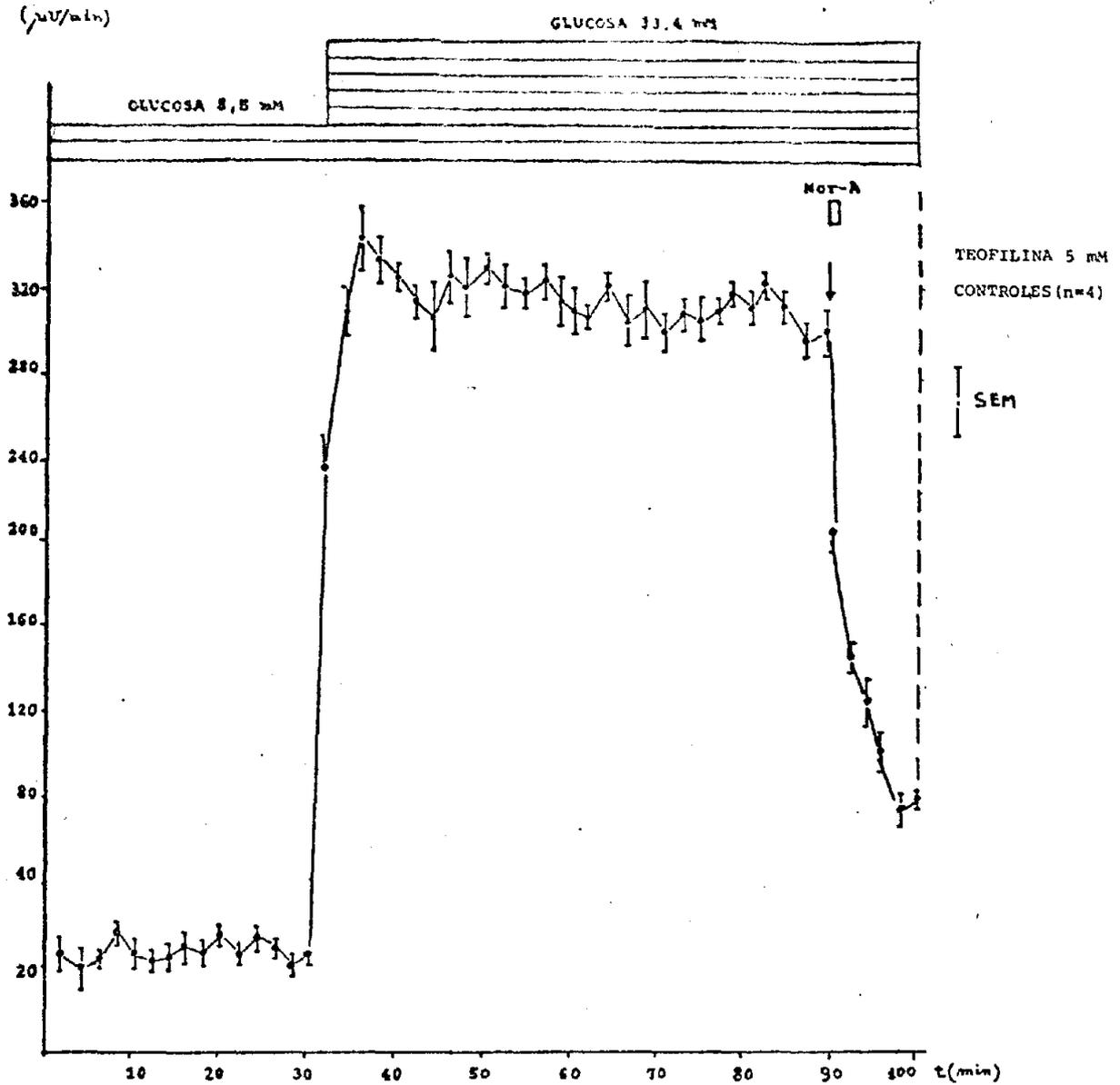


Fig.6.4 ACCION DE LA TEOFILINA 5 mM EN PRESENCIA DE GLUCOSA 5'5 Y 33'4 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO CONTROL.

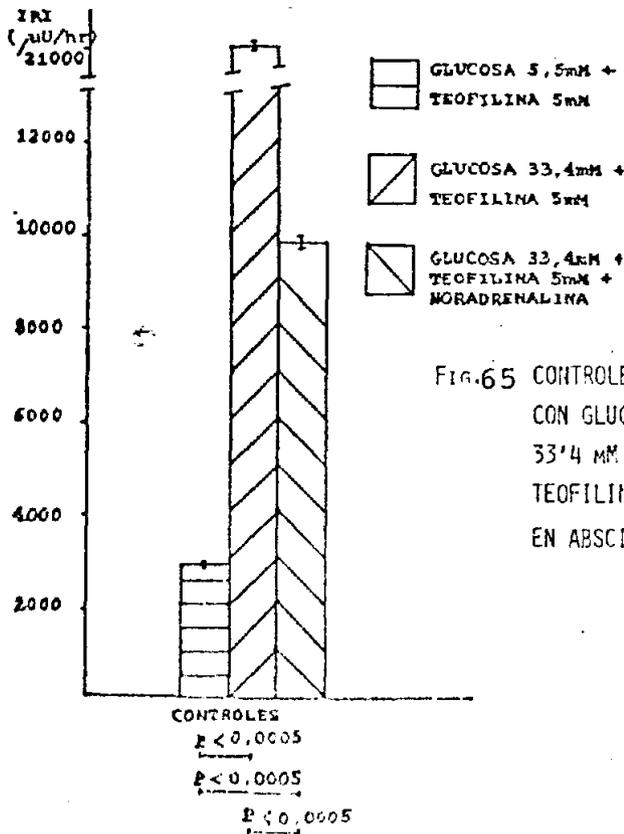


Fig.6.5 CONTOLES: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 5'5 mM MAS TEOFILINA 5 mM, GLUCOSA 33'4 mM MAS TEOFILINA 5 mM Y GLUCOSA 33'4 mM MAS TEOFILINA 5 mM MAS NORADRENALINA. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

CONTROLES CON GLUCOSA 5'5 Y 33'4mM CON TEOFILINA 5mM

Tubo n°	INSULINA (μU/min.)				\bar{X}	SEM
1	44	42	66	38'2	47'5	7'235
2	67	32	29	32'1	40	10'415
3	52'3	48	37'4	42'6	45	3'738
4	60	52	49'8	68	57'5	4'784
5	45'2	58	35'2	52	47'6	5'647
6	35	50	45	45	43'7	3'632
7	55	40	35'4	49'6	45	5'145
8	35	64'5	54	47	50'1	7'150
9	40'5	57	54	45	49'1	4'437
10	53	57	54'8	65	57'4	3'055
11	45	43'7	53'5	42'6	46'2	2'866
12	47	55	61	57'1	55	3'406
13	54	44	50'5	52	50'1	2'498
14	49	40'1	26'5	39	41'2	3'144
15	54	28'2	48	50'2	47'6	3'890
16	250	310	264	277	275'2	14'812
17	334	336	342	380	348	12'472
18	389'8	376'6	409'5	352	381'8	14'226
19	347	395	372	375	372'2	11'366
20	365	374	352	364	363'7	5'214
21	336	365	355	352	352	6'944
22	333'8	316'2	342	383'8	344	16'441
23	341'7	390'1	346'3	378'1	364	13'705
24	322	378	377	355	358	15'151
25	378	367	349	376	367'5	7'637
26	346'4	360	382	342'4	357'7	10'314

27	372'6	343'1	351	356'9	355'9	7'209
28	356	379	363	350	362	7'226
29	337'5	339'7	347	384	352	12'519
30	333'7	364'7	330'5	362'9	347'9	10'602
31	349'8	332'5	342'2	351'8	344	5'054
32	365'5	355'5	364'8	346'8	358'1	5'100
33	337'8	328'6	333'6	368'1	342	10'268
34	332	258	328	374	248	12'613
35	324'8	362'8	334'5	330'6	338	9'813
36	361'6	334'1	345'8	342'6	346	6'638
37	344'3	331'3	324'7	367'3	341'9	10'848
38	335'5	350'5	357	348'5	347'8	5'203
39	348	352	361	363	356	4'136
40	328'6	360	350	352	347'6	7'745
41	347'5	370'2	364'3	358	360	5'605
42	356'8	365'8	341'5	336'5	350'1	7'819
43	324	321	351	340	334	8'124
44	356	349	328	319	338	10'033
45	241	262	232	246	145'2	7'262
46	183	199	186	180	187	4'830
47	158	163	191	153	166'2	9'813
48	131	137	145	157	142'5	6'489
49	112	119	129	100	115	7'039
50	129	122	119	110	120	4'546

En la figura 66 se muestra la dinámica de secreción de insulina en un grupo de 4 días de ayuno (n=4).

La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 2'75mM + teofilina 5mM y un segundo periodo con glucosa 16'7mM + teofilina 5mM. Al final de la perfusión se infundió un pulso de noradrenalina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 2'75mM + teofilina 5mM el páncreas responde con una secreción de insulina que oscila entre 20 y 30 μ U/min. Al pasar de glucosa 2'75mM + teofilina 5mM a glucosa 16'7mM + teofilina 5mM hay un aumento rápido en la secreción de insulina alcanzando a los 4 minutos 148'8 μ U siendo el máximo de secreción obtenido el de 247 μ U a los 6 minutos después de iniciada la perfusión con altos niveles de glucosa.

El pulso de noradrenalina provoca un descenso de la secreción que llega a 136 μ U en el minuto 100 de la perfusión.

Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla n° 26 pag. 230.

De estos valores individuales se pueden obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la media del periodo de glucosa 2'75mM + teofilina 5mM es de 24'07 \pm 2'142 μ U/min frente a 30'17 \pm 2'154 μ U/min en el grupo control (p. 217) con teofilina y de 13'1 \pm 3'3 μ U/min a los 4 días de ayuno sin teofilina. La

del periodo de glucosa 16'7mM +teofilina 5mM es de $211'07 \pm 2'11$ μ U/min frente a $294'2 \pm 6'7$ μ U/min en el grupo control de teofilina y de $55'9 \pm 7'3$ μ U/min en el grupo de 4 días de ayuno sin teofilina, y la del periodo con infusión de noradrenalina es de $167'4 \pm 2'3$ μ U/min frente a $149'48 \pm 5'836$ μ U/min en el grupo control (p.217) de teofilina y $73'08 \pm 7'848$ μ U/min en el grupo 4 días de ayuno sin teofilina.

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descritos a continuación.

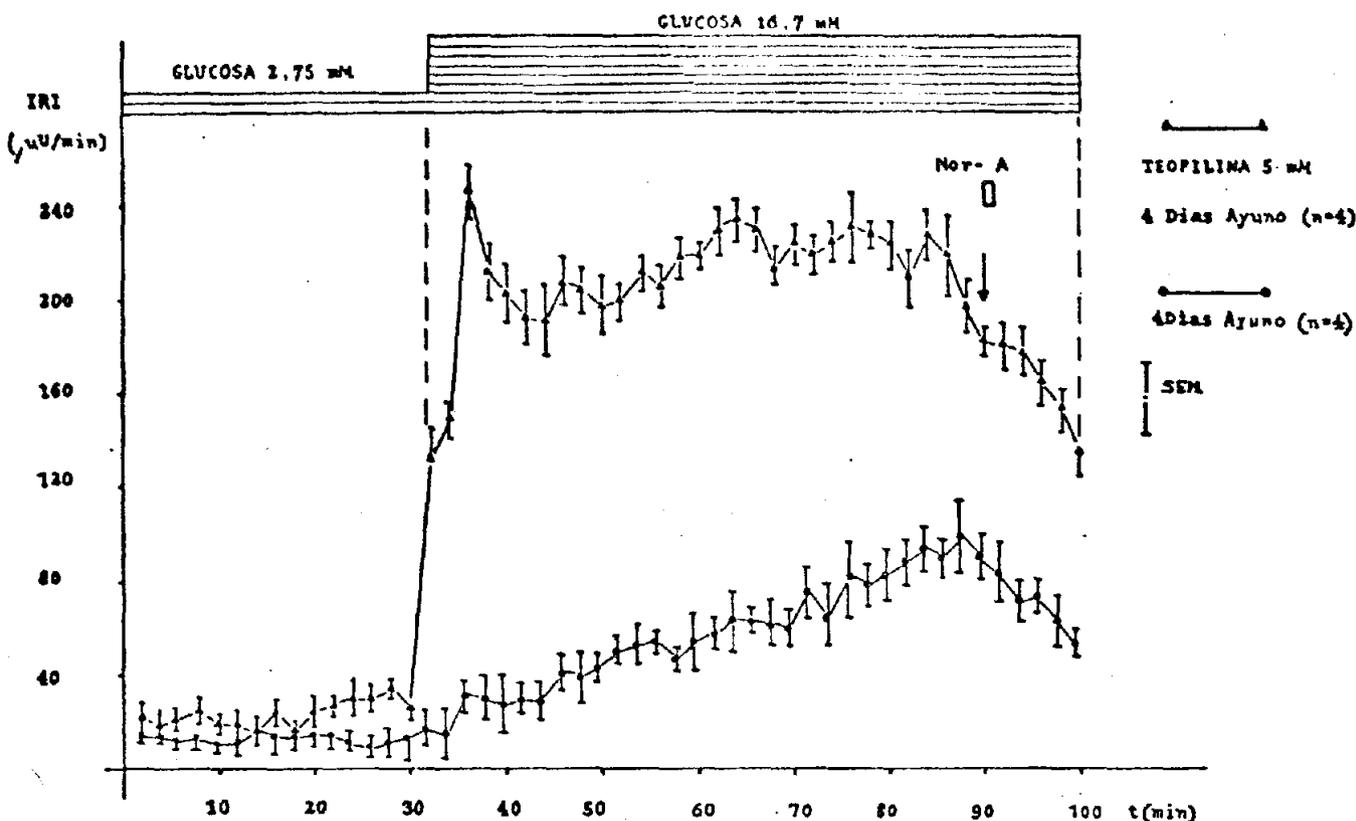


Fig. 66 ACCION DE LA TEOFILINA 5 mM EN PRESENCIA DE GLUCOSA 2'75 Y 16'7 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO DE 4 DIAS DE AYUNO.

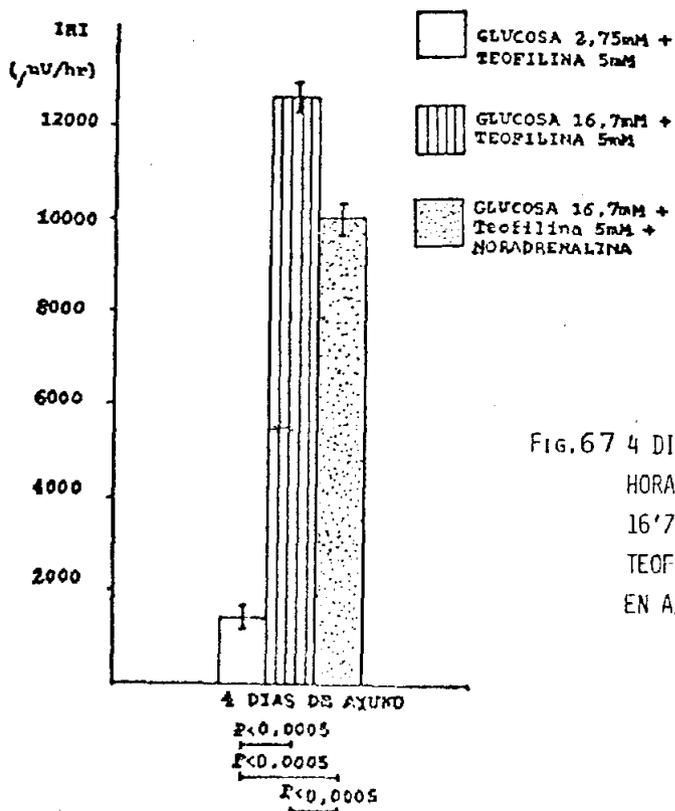


Fig.67 4 DIAS DE AYUNO: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 2'75 mM MAS TEOFILINA 5 mM, GLUCOSA 16'7 mM MAS TEOFILINA 5 mM Y GLUCOSA 16'7 mM MAS TEOFILINA 5 mM MAS NORADRENALINA. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

4 DIAS DE AYUNO CON TEOFILINA 5mM Y GLUCOSA 2'75 Y 16'7mM

Tubo n°	INSULINA (μ U/min.)				\bar{X}	SEM
1	20	35'2	6	27	22	7'143
2	29	23	15	8	18'7	5'299
3	31'2	23	17	15	21'5	4'200
4	17	36	27	22	25'5	4'678
5	27'8	18	16	15	19'2	3'387
6	29	23	15	8	18'7	5'299
7	7'5	15	15	31	17'12	5'717
8	15	22'5	35	30	25'6	5'051
9	18	25	10	16	17'2	3'570
10	28	43	20	16	26'7	6'886
11	25	32'7	23	29'2	27'5	2'618
12	21	47	29	24	30'2	6'722
13	28	23	46'7	25	30'6	5'989
14	31	41	34'1	33	34'7	2'511
15	17	36	27	22	25'5	4'678
16	155	141	105	126	131'7	12'359
17	142'2	138	155	160	148'8	6'000
18	224	246	255	264	247'2	9'903
19	203	215	236	194	212	10'488
20	190	202	230	187	202'2	11'317
21	175	215	197	181	192	10'349
22	222	168	208	170	192	15'691
23	192'2	234'3	204'5	200	207'7	10'631
24	208	185	222	207	205'5	9'825
25	217	185	215	175	198	12'238
26	207	178	203	212	200	8'130

27	229	205	213	208	213'8	6'171
28	198	229	204	195	206'5	8'925
29	205	238	217	211	217'7	8'291
30	222	232	213	218	221'2	4'651
31	253	210	223'2	241'5	231'8	10'971
32	221	254	234	227	234	8'286
33	215	248	232	223	229'5	8'171
34	199	219	228	211	214'2	7'108
35	243	222	225	213	225'7	7'262
36	227	198	223	232	220	8'730
37	207	240	220	235	225'5	8'647
38	241	215	258	210	231	13'021
39	235	239	217	226	229'2	5'664
40	215	223	247	222	226'7	8'060
41	182	205	221	232	210	12'534
42	214'8	211'6	240'9	246'7	228'5	10'318
43	178	210	233	259	220	19'871
44	215'1	212'3	192	174	198'3	11'093
45	179	195	182	176	183	4'830
46	183'5	201'3	173	162'2	180	9'593
47	190	171	162	202	179'2	10'449
48	164	159	192	154	167'5	9'813
49	167'5	175	130	147	154'8	11'762
50	160	146	110	131	136'7	12'359

En la figura 68 se muestra la dinámica de secreción de insulina en un grupo de 4 días de ayuno (n=4).

La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 5'5mM + teofilina 5mM y un segundo periodo con glucosa 33'4mM + teofilina 5mM. Al final de la perfusión se infundió un pulso de noradrenalina.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 5'5mM +teofilina 5mM el pancreas responde con una secreción de insulina que oscila entre 24 y 37 μ U/min . Al pasar de glucosa 5'5mM +teofilina 5mM a glucosa 33'4mM +teofilina 5mM hay un aumento rápido en la secreción de insulina alcanzando a los 4 minutos 270 μ U y siendo el máximo de secreción obtenido este valor.

El pulso de noradrenalina provoca un descenso de la secreción que llega a 139 μ U en el minuto 100 de la perfusión.

Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla n° 27 pag. 234.

De estos valores individuales se pueden obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la media del periodo de glucosa 5'5mM + teofilina 5mM es de $30'24 \pm 1'096$ μ U/min , así la \bar{X} del periodo de glucosa 33'4mM + teofilina 5mM es de $237'79 \pm 3'443$ μ U/min, y la del periodo con infusión de noradrenalina es de $169'3 \pm 2'3$ μ U/min. Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

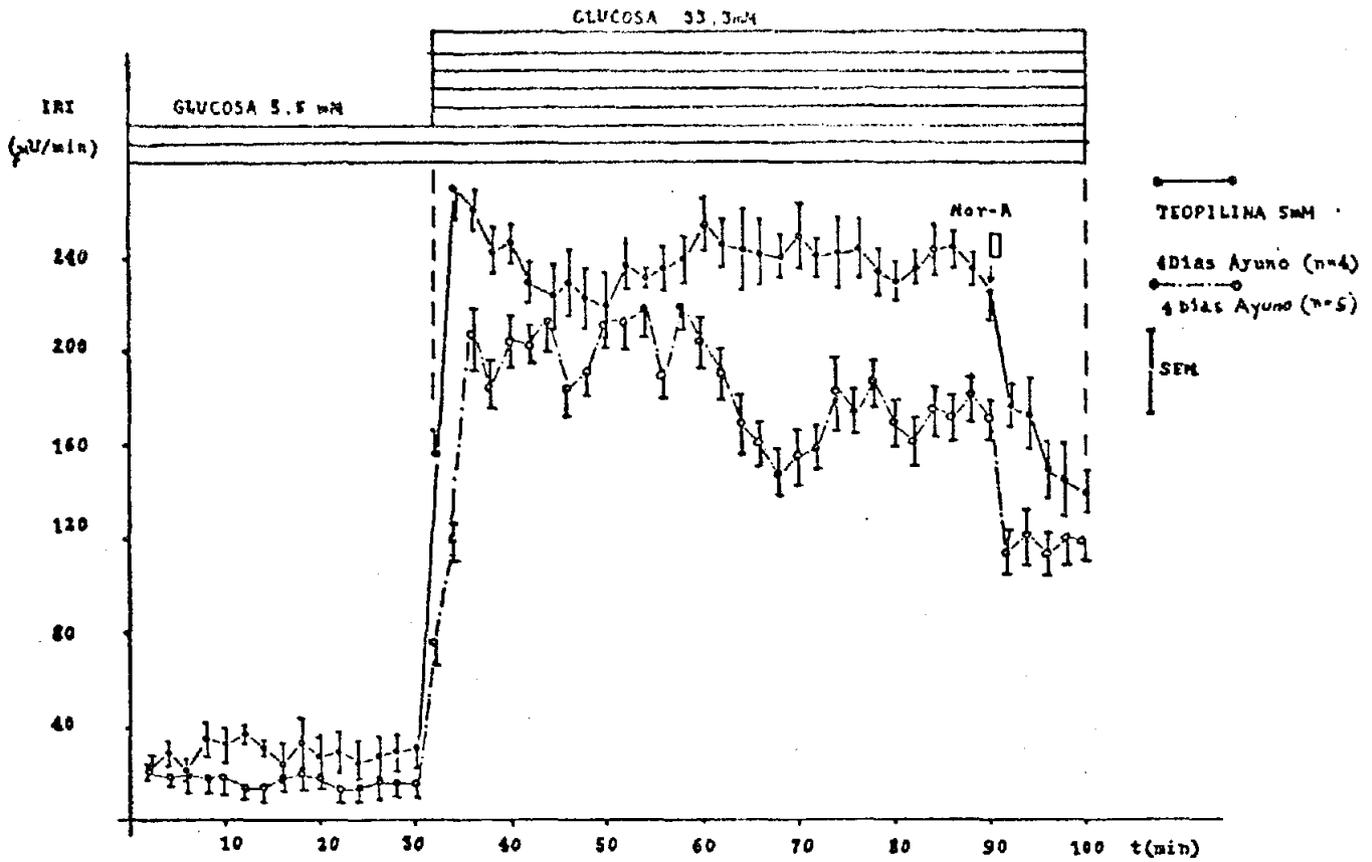


FIG.68 ACCION DE LA TEOFILINA 5 mM EN PRESENCIA DE GLUCOSA 5'5 Y 33'4 mM SOBRE LA SECRECION DE LA INSULINA EN UN GRUPO DE 4 DIAS DE AYUNO.

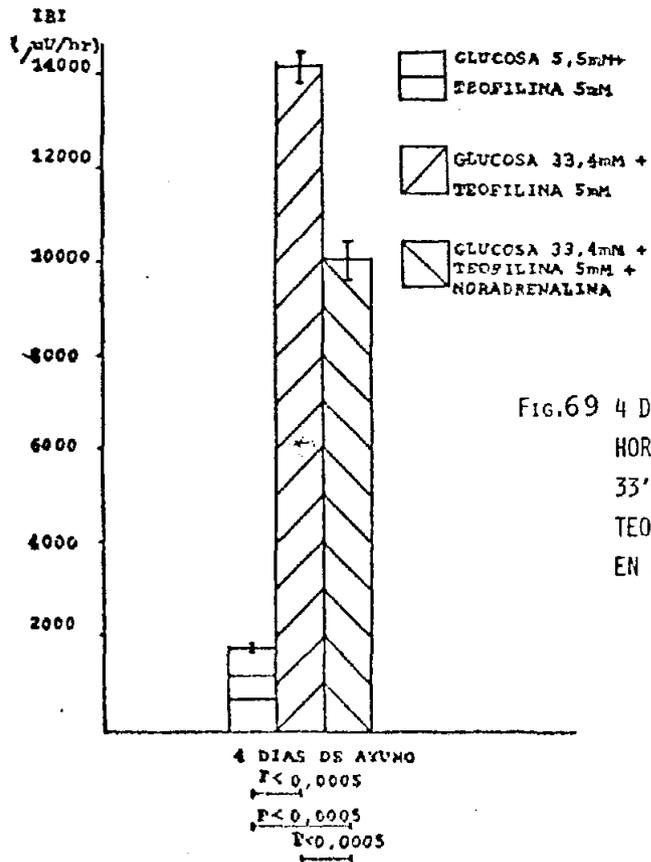


FIG.69 4 DIAS DE AYUNO: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 5'5 mM MAS TEOFILINA 5 mM, GLUCOSA 33'4 mM MAS TEOFILINA 5 mM Y GLUCOSA 33'4 mM MAS TEOFILINA 5 mM MAS NORADRENALINA. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

4 DIAS DE AYUNO CON TEOFILINA 5mM Y GLUCOSA 5'5 y 33'4mM

Tubo n°	INSULINA (uU/min.)				\bar{X}	SEM
1	22	25	19	30	24	2'708
2	32	40	30	23	31'2	4'038
3	15	33	20	28	24	4'642
4	25	31	48'6	45'2	37'4	6'506
5	47'5	23'9	38'6	27'5	34'3	6'210
6	46	34	40'9	31	37'9	3'907
7	36'6	34'3	26'9	30'5	32	2'465
8	15	12'3	43	30	25	8'234
9	21	57	29	30	34'2	9'060
10	19'8	35'9	18'2	40'8	28'6	6'563
11	15	49	20	36	30	8'956
12	22	41	14'6	27'5	26'2	6'436
13	24'8	12'8	28'6	43'7	27'5	7'356
14	30	23	49	19	30'2	7'679
15	40	20	44	18	30'5	7'739
16	140	176	159	150	156'2	8'823
17	264	159	305	253	270'2	13'624
18	267	238	263	272	260	8'730
19	220	245	255	249	242'2	8'886
20	254	235	258	243	247'5	6'046
21	242	233	205	240	230	9'877
22	213'2	259	217'5	212	225'4	12'994
23	270	215	223	212	230	15'627
24	255	221	206	215	224'2	12'359
25	253	200	202	234	222'5	14'865
26	225	230	261	237	238'2	9'206

27	234	225	244	230	233'2	4'651
28	258	237	231	225	237'5	8'291
29	242	225	264	229	240	10'143
30	252	247	281	239'2	254'8	10'532
31	232'2	240	274'3	244'5	247'7	10'631
32	259	212	284	223	244'5	19'116
33	278	244	212	237	242'7	15'715
34	227	260	239	233	239'7	8'291
35	240	260	280	224	251	14'031
36	232	263	229	288	240	8'925
37	268	238	255	210	141'7	14'463
38	219	269	250	239	244'2	12'068
39	249	211	229	252	235'2	11'039
40	237	209	233	247	231'5	9'303
41	243	247	232	224	236'5	6'046
42	246	250	222	260	144'5	9'303
43	235	245	263	239	245'5	7'141
44	255	234	237	225	237'7	7'269
45	214	207	255	235	227'7	12'538
46	170	180'5	159'2	198'3	177	9'613
47	216	178	158	147	174'7	17'520
48	172	124	130	173	149'7	13'193
49	174	166	116	130	146'5	16'121
50	133	161'3	143	122'2	139'8	9'594

C) AYUNO Y ESTIMULACION CON db-AMPC.

El db-AMPC es capaz de atravesar la membrana celular y de este modo incrementar los niveles intracelulares de éste nucleotido ciclico.

Potencia la secreción producida por la glucosa.

En la figura 70 se muestra la dinámica de secreción de insulina en un grupo de 4 días de ayuno (n=3).

La perfusión está dividida en dos periodos: un primer periodo de 30 minutos de duración con glucosa 2'75mM un segundo periodo de 20 minutos de duración con glucosa 16'7mM los 10 minutos siguientes con glucosa 16'7mM más dibutiril AMP ciclico 2mM y el resto hasta el final con glucosa 16'7mM sola.

De los datos obtenidos se puede afirmar que con glucosa 2'75mM el pancreas responde con una secreción de insulina que oscila entre 7 y 14 μ U. Al pasar a glucosa 16'7mM hay un aumento en la secreción de insulina alcanzando 33'7 μ U a los 16 minutos despues de iniciada la perfusión con altos niveles de glucosa.

Con db-AMPC 2mM y glucosa 16'7mM hay un aumento rapidísimo de la secreción de insulina alcanzandose a los 10 minutos de su infusión 160 μ U de insulina y 2 minutos despues de su infusión 237'6 μ U y cayendo a continuación bruscamente la secreción de insulina.

Los valores individuales de las perfusiones aquí descritas aparecen en la tabla n° 28 pag: 239.

De estos valores individuales se puede obtener la media para cada uno de los periodos antes citados.

Así la media del periodo de glucosa 2'75mM es de $9'45 \pm 3'775$ μ U/min.

La del periodo de glucosa 16'7mM es de $25'92 \pm 7'459$ μ U/min y la de db-AMPC 2mM más glucosa 16'7mM es de $124'10 \pm 10'715$ μ U/min.

Estos datos pueden observarse en el esquema en barras descrito a continuación.

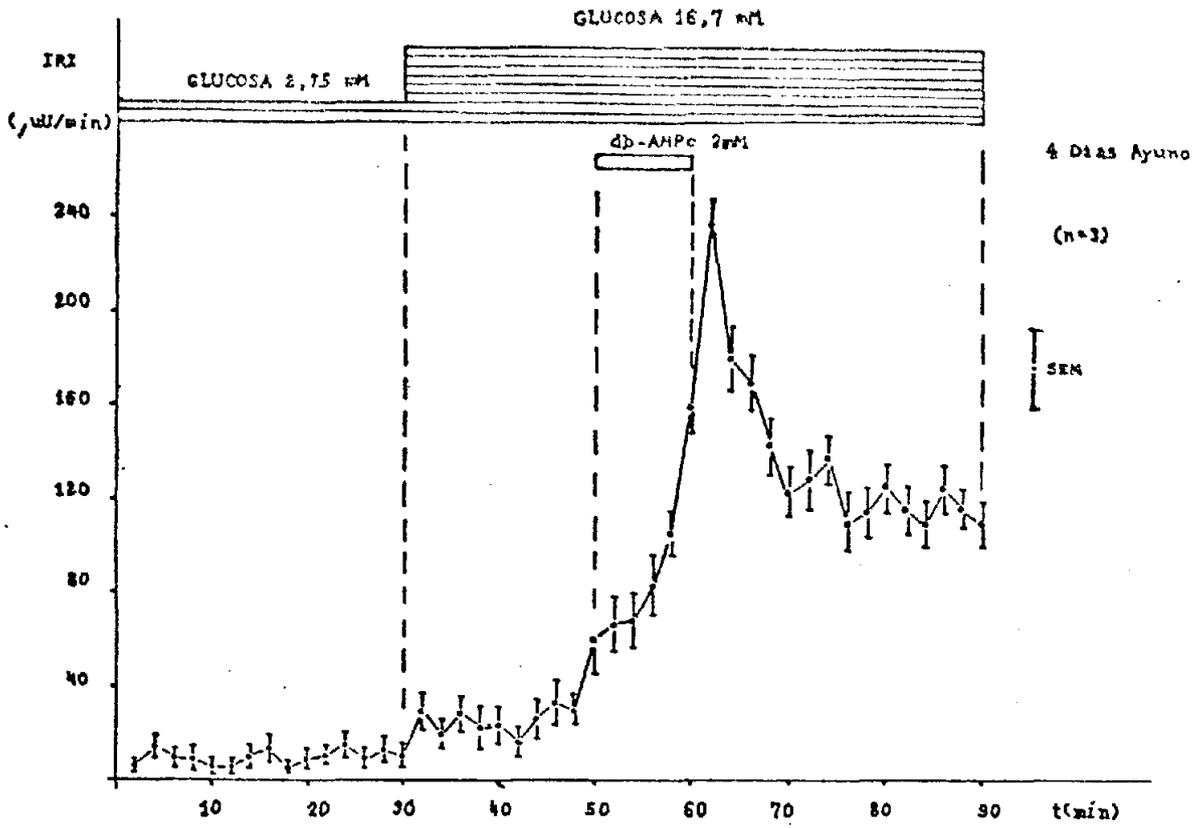


Fig.70 ACCION DEL db-AMPc 2 mM EN PRESENCIA DE GLUCOSA 16'7 mM SOBRE LA SECRECION DE INSULINA EN UN GRUPO DE 4 DIAS DE AYUNO.

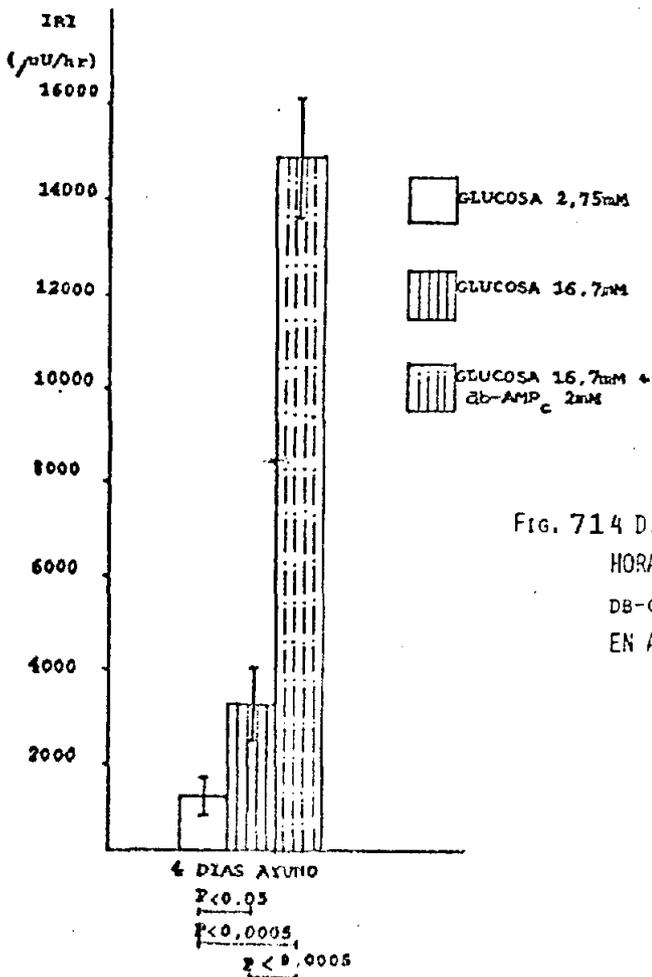


Fig. 71 4 DIAS DE AYUNO: SECRECION DE INSULINA LIBERADA POR HORA CON GLUCOSA 2'75, 16'7 Y 16'7 mM MAS db-c'AMP 2 mM. EN ABCISAS SE INDICA EL GRADO DE SIGNIFICANCIA.

4 DIAS DE AYUNO CON GLUCOSA 2'75 y 16'7mM Y db-cAMP 2 mM

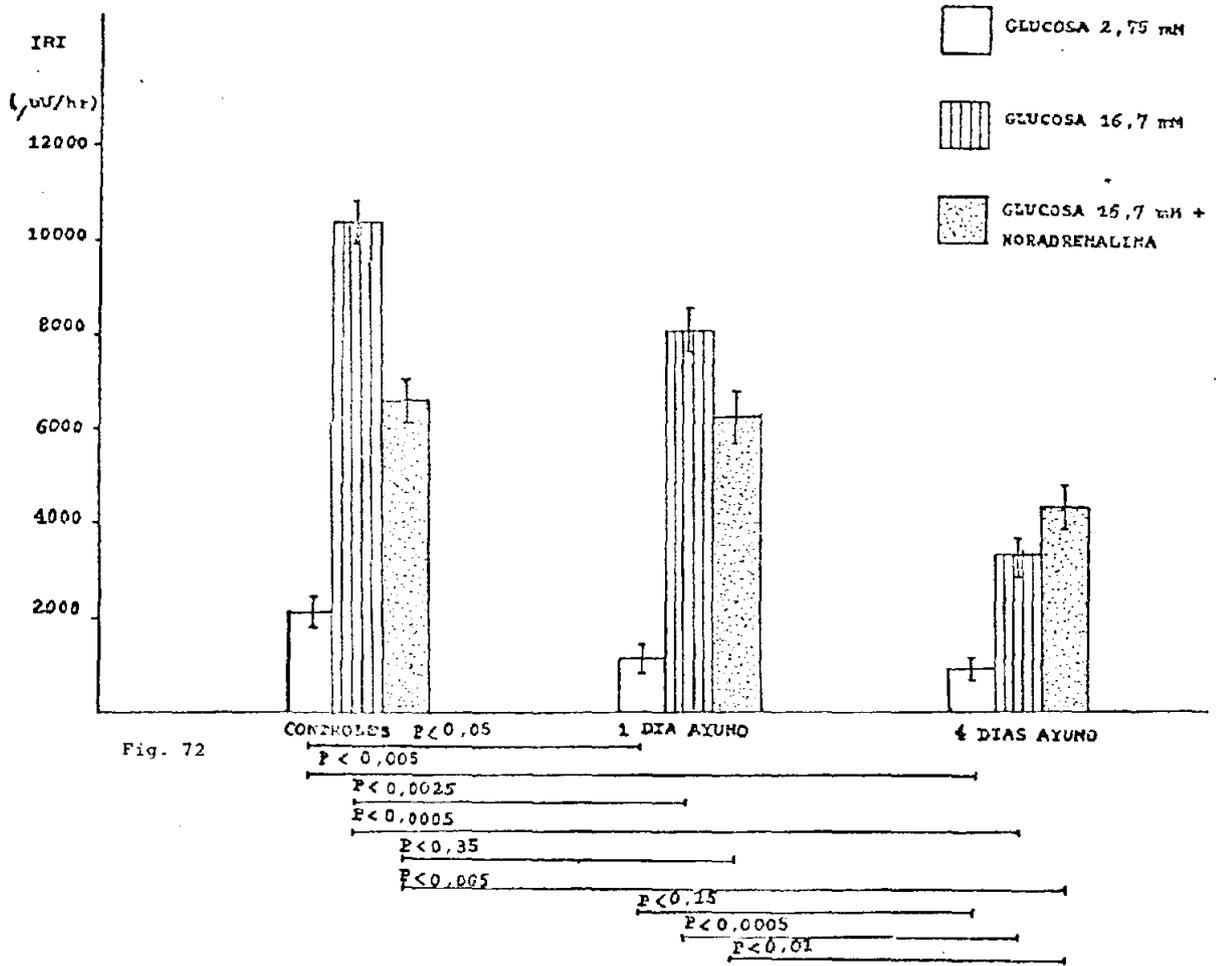
Tubo n°	INSULINA (μU/min.)			\bar{X}	SEM
1	8'7	2'5	6	5'9	2'198
2	22'3	9'5	11	14'2	4'947
3	16	5'5	9	10'1	3'780
4	16	3'1	7	8'7	4'678
5	8'4	2'5	5'6	5'5	2'086
6	8	1'4	5'6	5	2'362
7	18	5	8	10'33	4'813
8	21'5	6	10	12'5	5'689
9	7	2'8	3	4'26	1'675
10	15'2	4	7	8'73	4'099
11	15	6	9	10	3'240
12	22	8	15	15	4'949
13	14'6	5	6'6	8'73	3'636
14	20'6	8	9	12'53	4'952
15	17	5	9	10'33	4'320
16	40	22	29	30'3	6'416
17	28	11'2	17	18'73	6'033
18	41	17	28	28'7	8'495
19	38	11'2	20	23'06	9'659
20	36'2	14	21	23'73	8'025
21	25'6	10	17	17'53	5'525
22	37'4	16'2	29	27'53	7'548
23	48'1	23	30	33'7	9'158
24	40	21'2	29	30	6'678
25	83'3	41'5	55'1	60	15'07
26	86	51	60	65'6	12'851

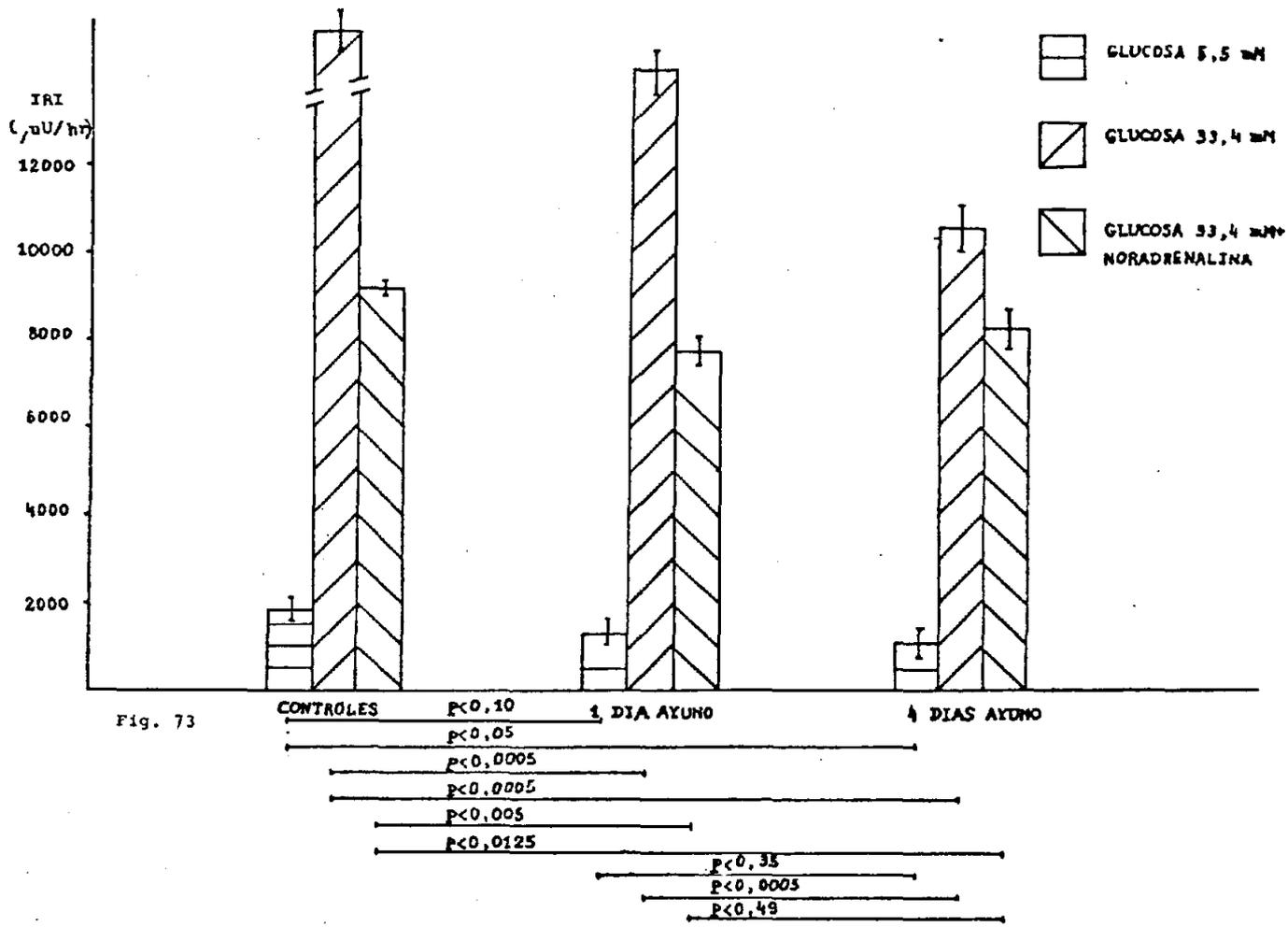
27	85'3	49	68'3	67'53	12'842
28	100'8	63'5	83'2	82'5	13'194
29	118	95'9	102	105'3	8'070
30	173'1	149	158	160	8'611
31	253	227	233	237'6	9'626
32	218	177'1	186	193'7	15'237
33	186	151	160	165'66	12'851
34	161	122	144	142'33	13'826
35	137	110	124	123'7	9'549
36	149	116'2	121	128'7	12'526
37	156	124'5	131'6	137'86	11'683
38	131	94	105	110	13'435
39	131	100	115	115'3	10'962
40	139'4	112'8	123	125	9'489
41	129	117	106	117'33	8'134
42	125	96	109	110	10'2713
43	140'5	121	113'5	125	9'855
44	131	106'9	114'8	117'5	8'687

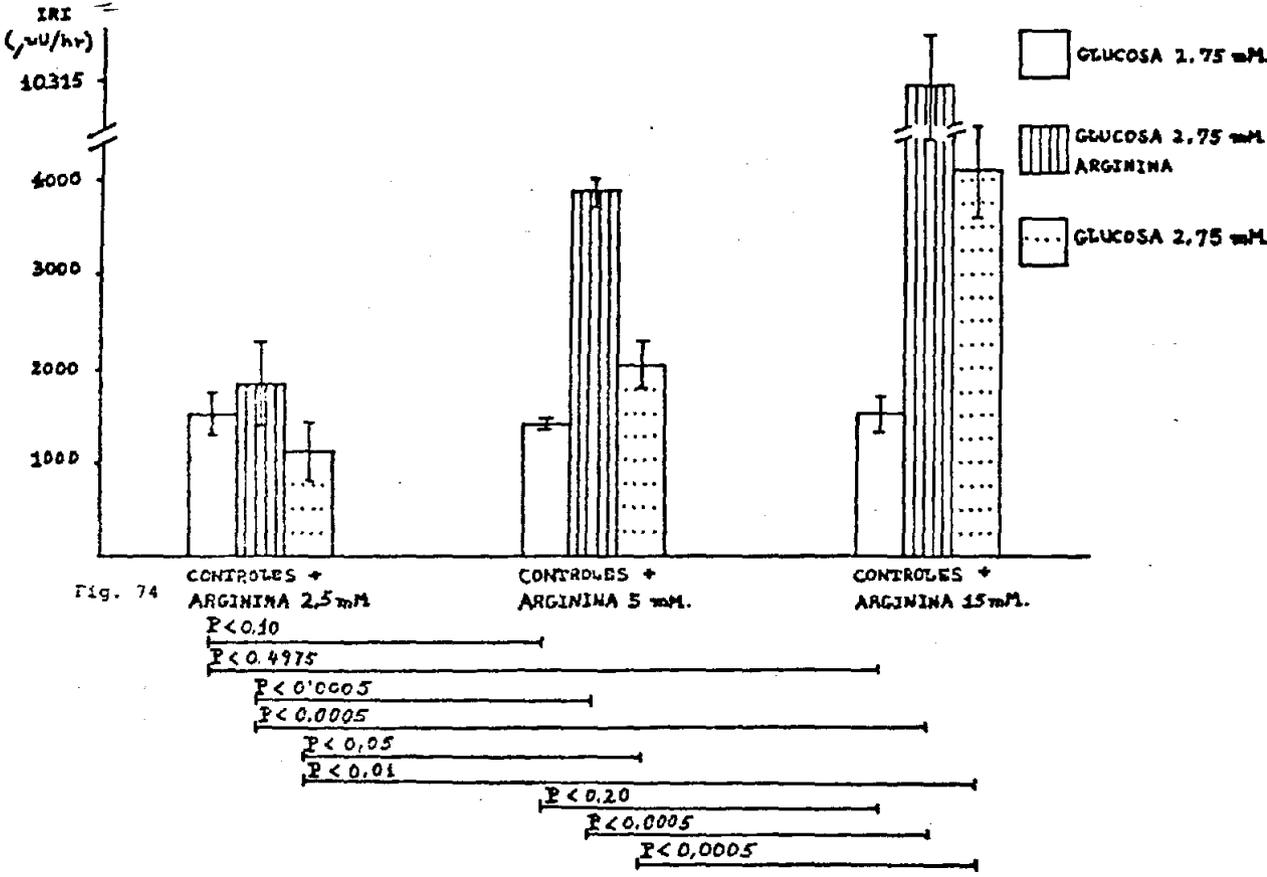
3.7) CALCULOS ESTADISTICOS ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS.

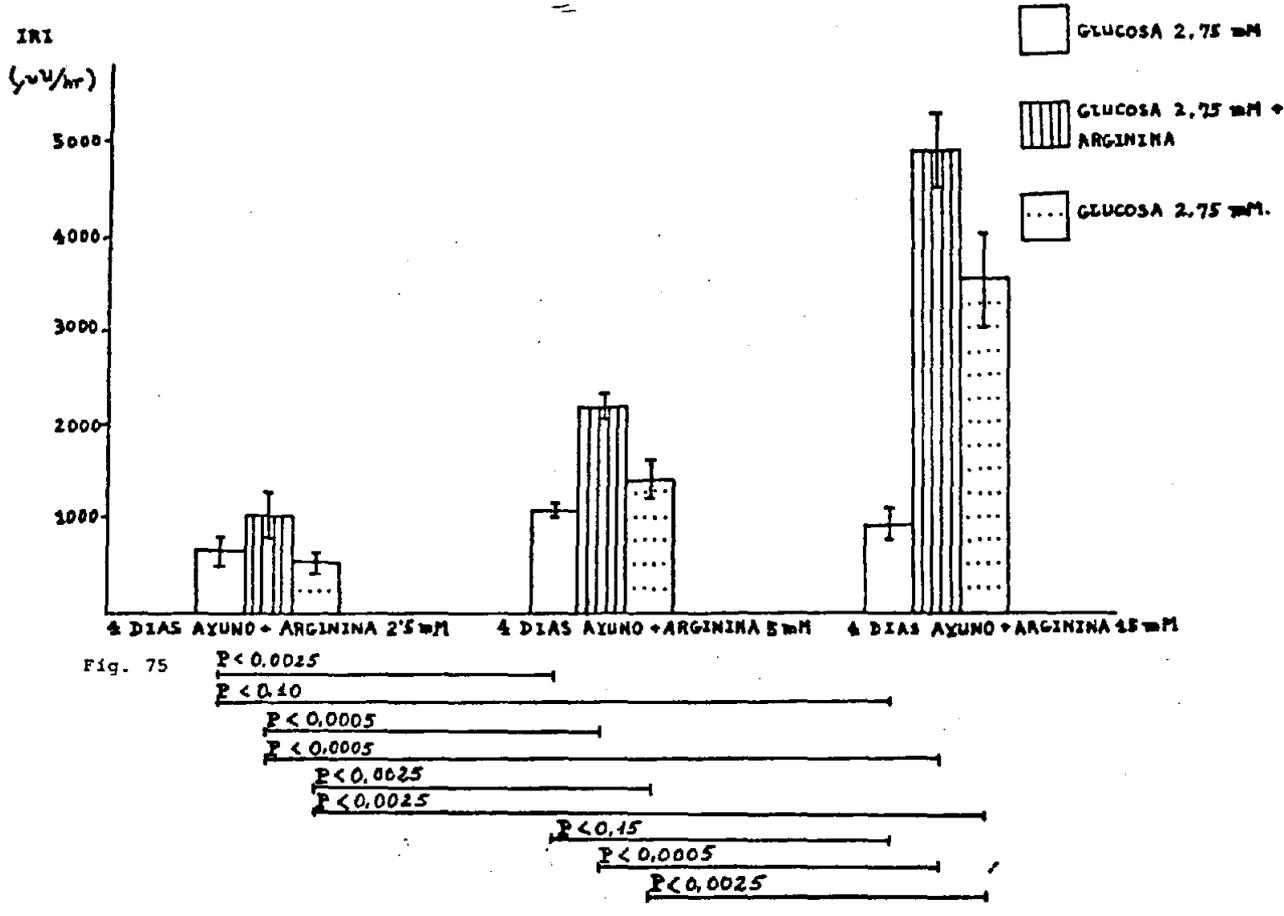
Las siguientes figuras resumen el grado de significancia tras la comparación estadística de diferentes grupos de perfusiones.

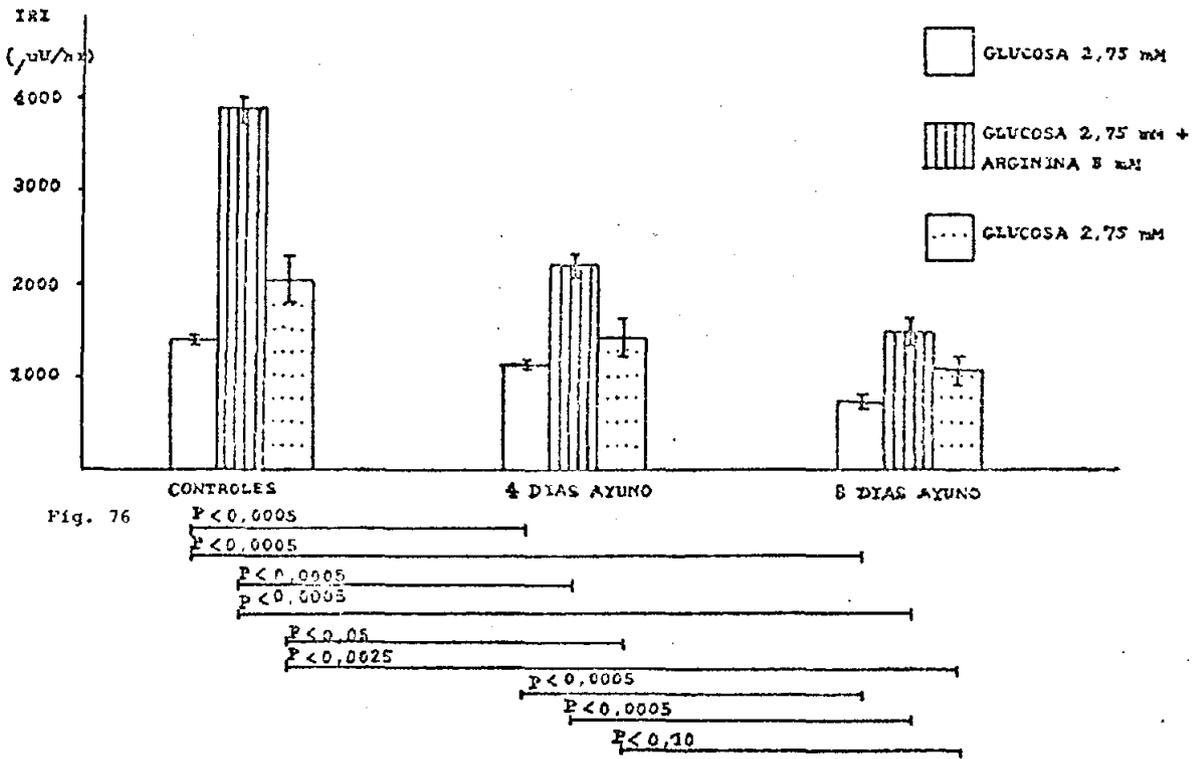
En ordenadas se representa la secreción de insulina en $\mu\text{U/hr.}$ y en abscisas las condiciones específicas de cada grupo de perfusiones y el valor de la integral de probabilidad de error.











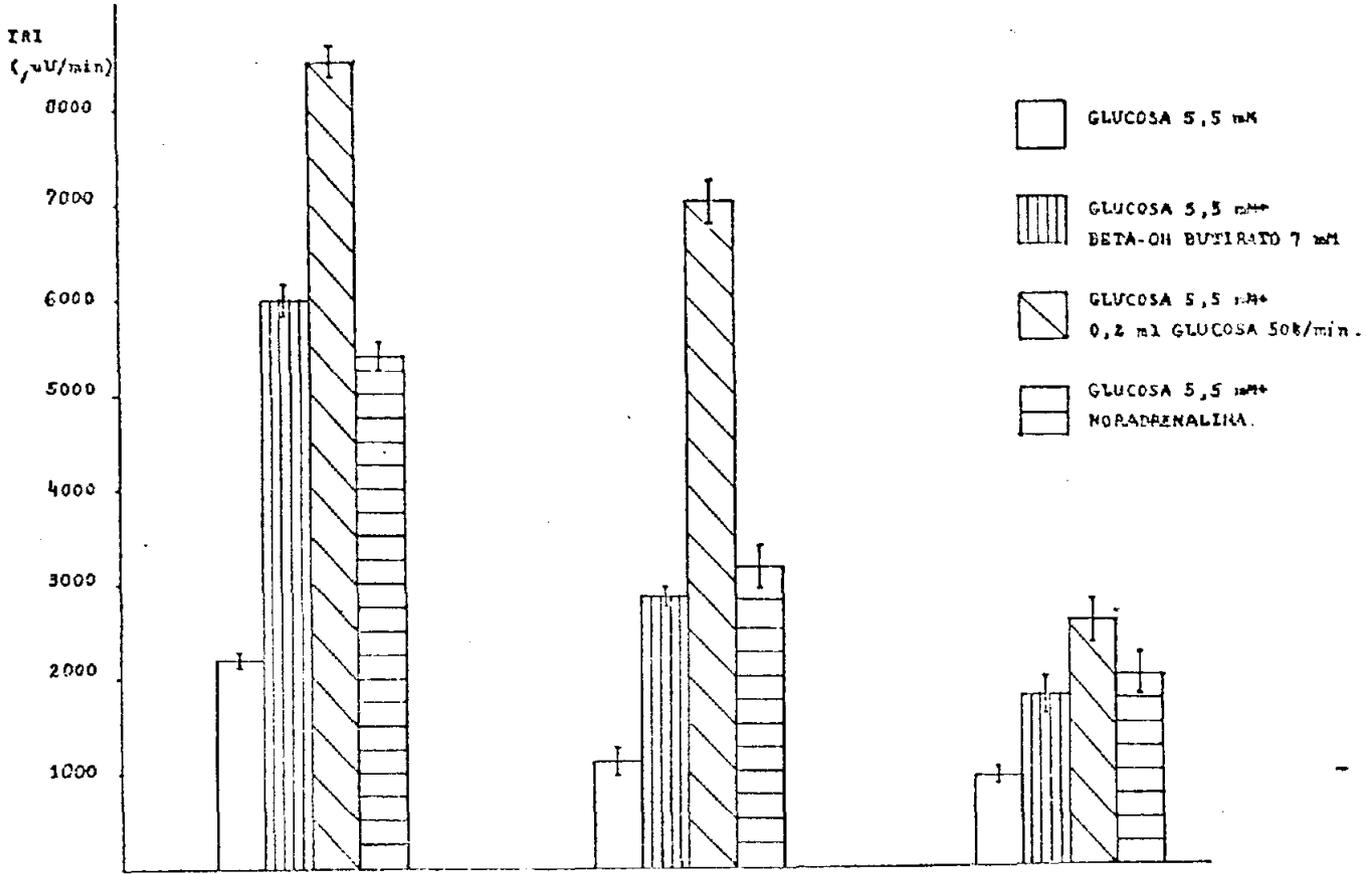
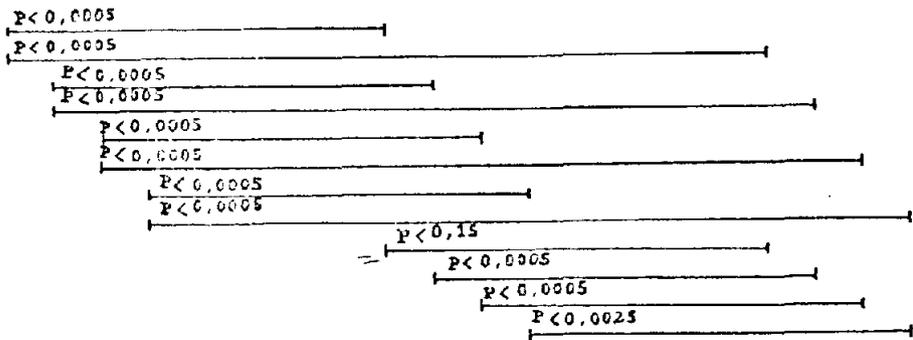
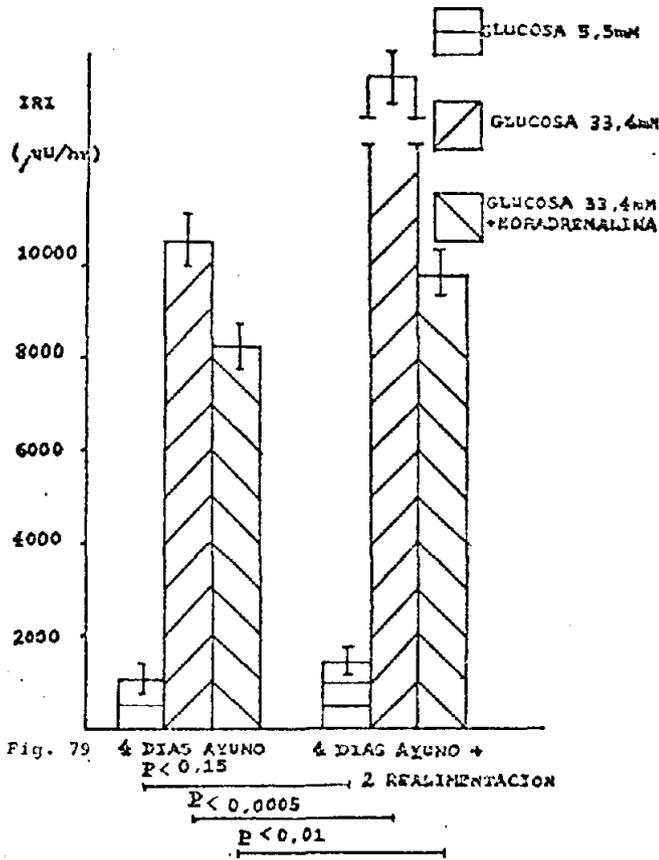
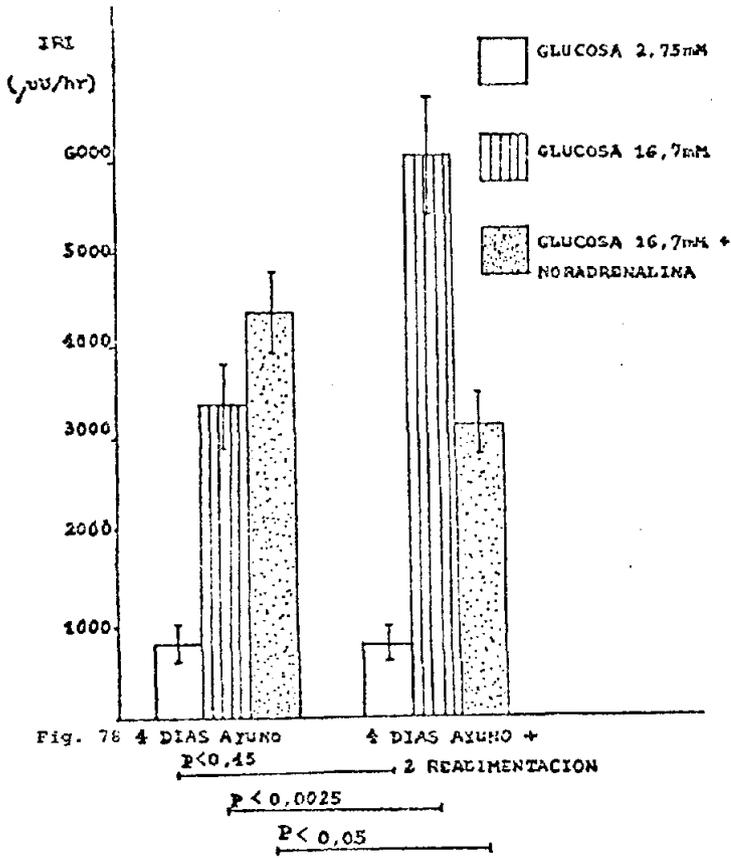


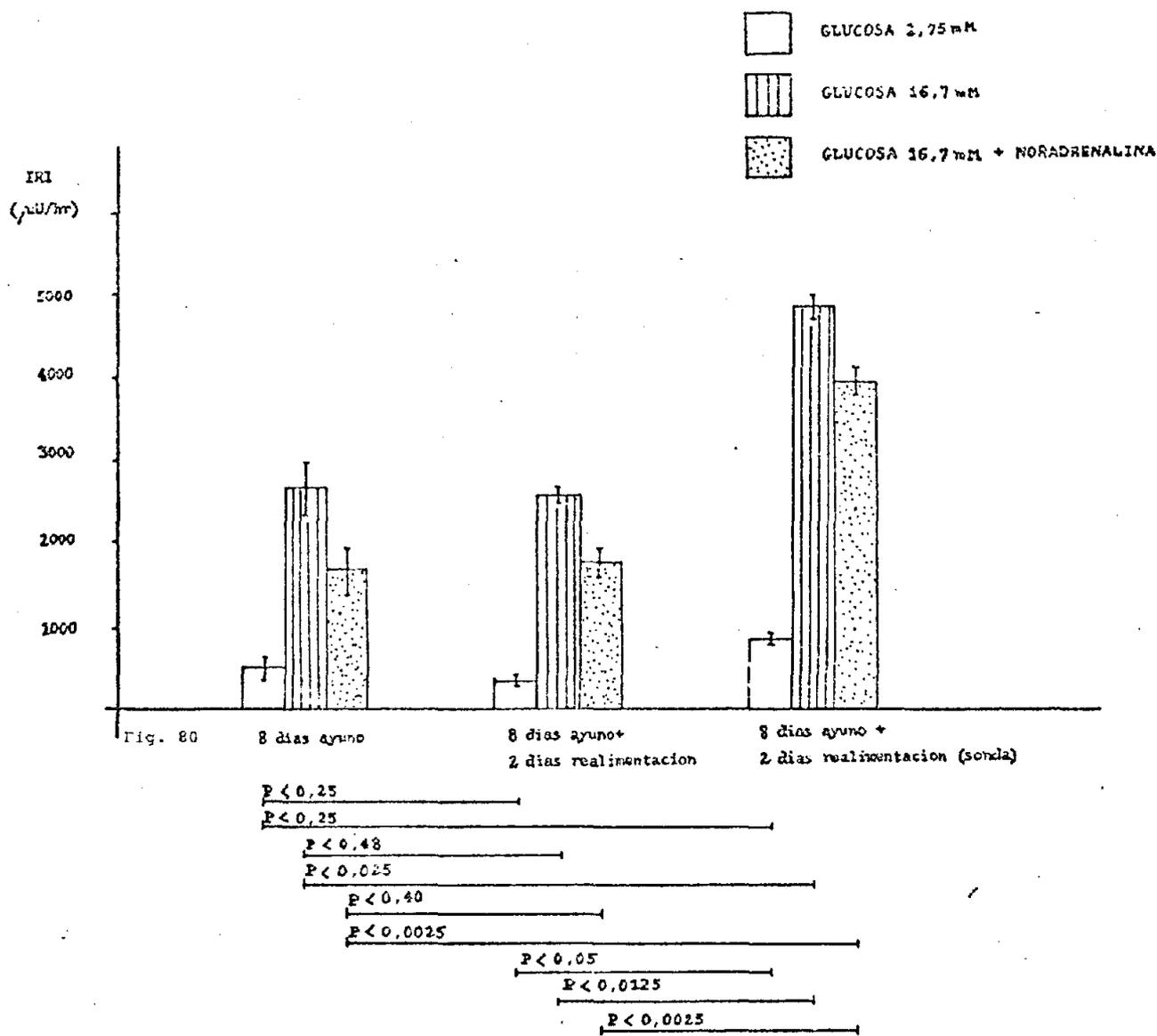
Fig. 77 CONTROLES

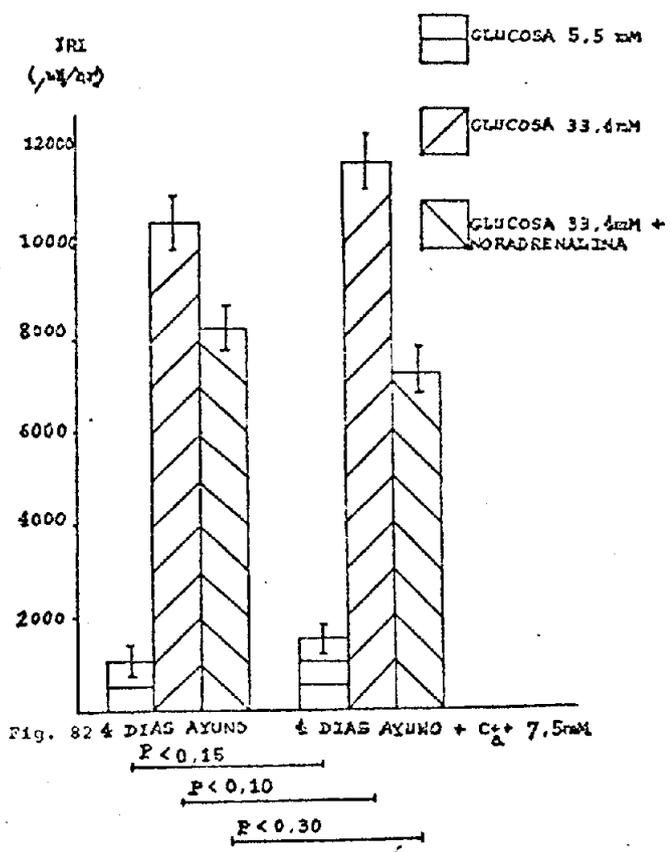
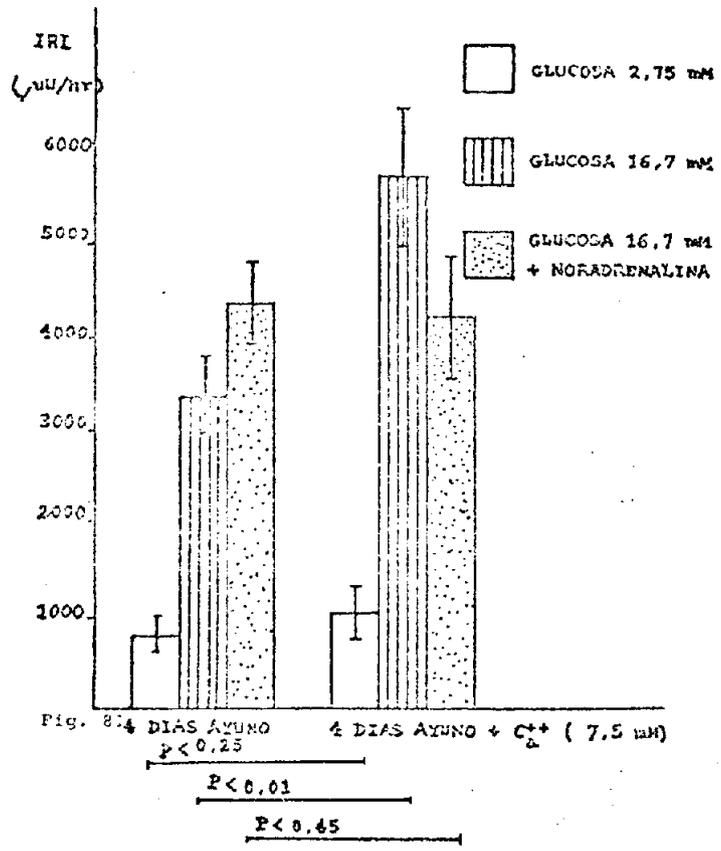
4 Dias Ayuno

8 Dias Ayuno









IRI
($\mu\text{u/lit}$)

14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000

GLUCOSA 2,75 mM
GLUCOSA 16,7 mM
GLUCOSA 16,7 mM
NORADRENALINA

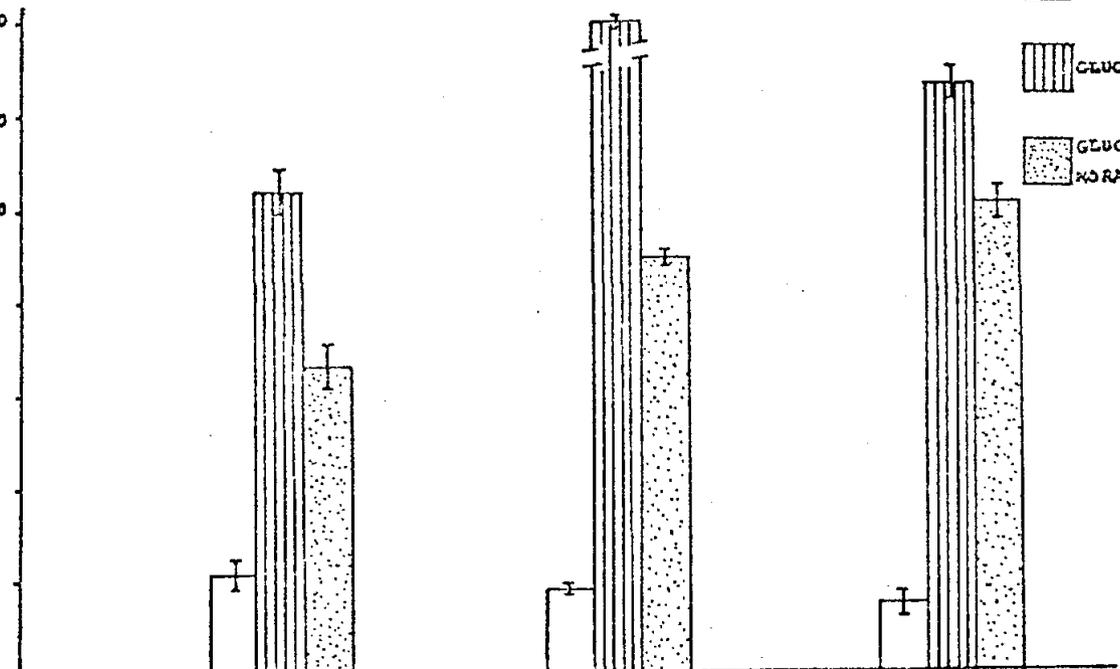
Fig. 83

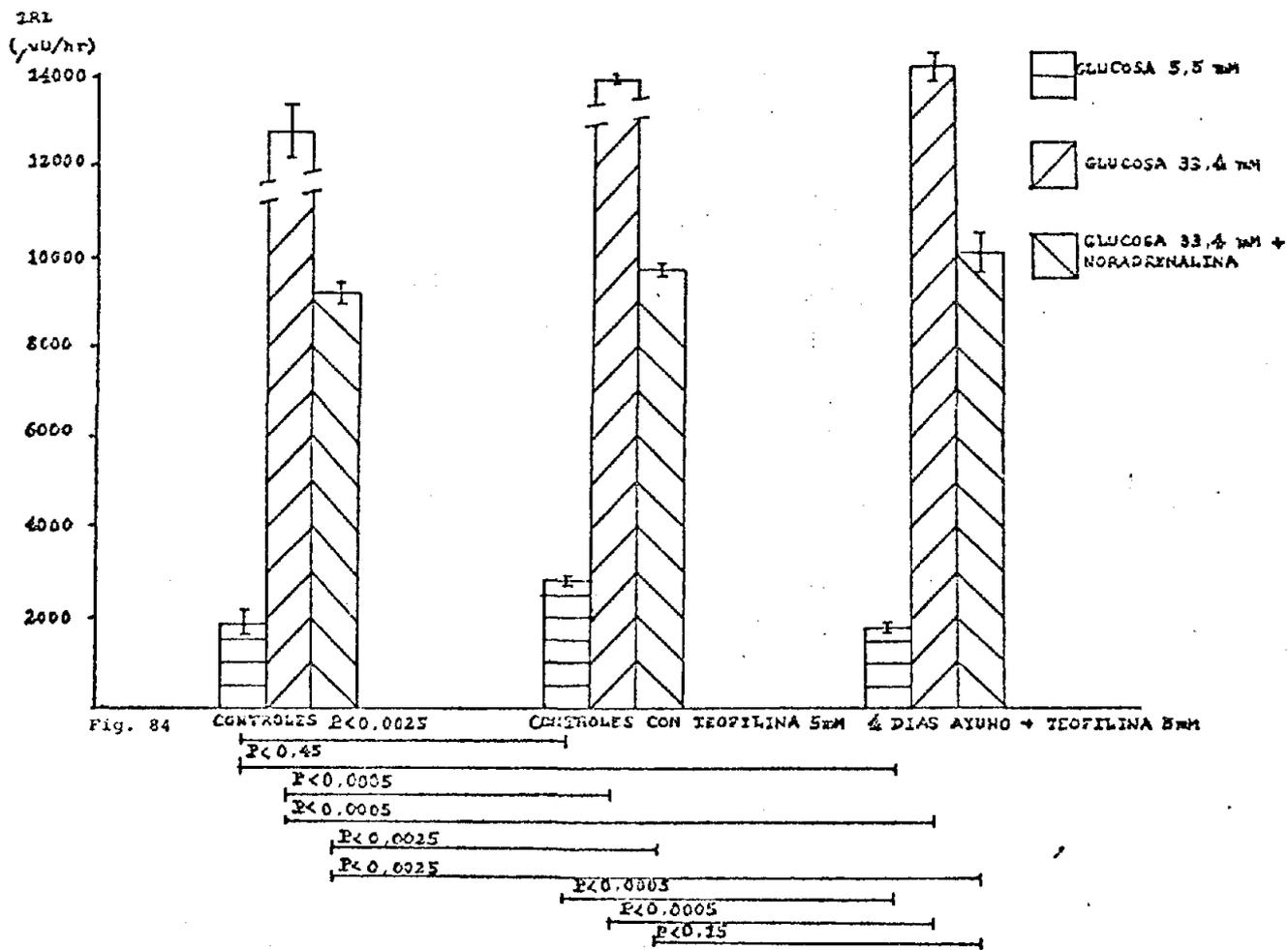
CONTROLES

CONTROL + TEOFILINA 5 mM

4 DIAS AYUNO + TEOFILINA 5 mM

$P < 0,30$
 $P < 0,10$
 $P < 0,0005$
 $P < 0,0025$
 $P < 0,0025$
 $P < 0,0005$
 $P < 0,05$
 $P < 0,0005$
 $P < 0,025$





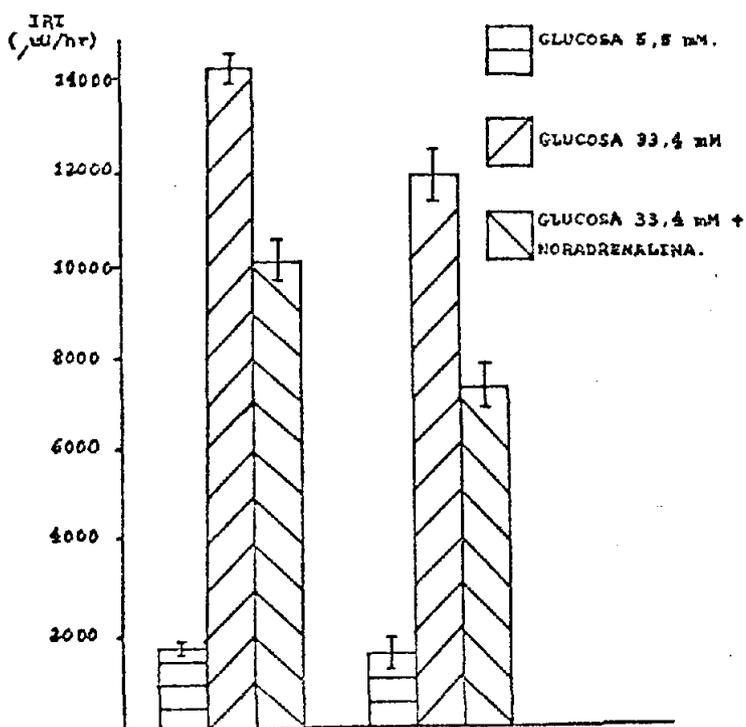


Fig. 85 4 DIAS AYUNO + TEOFILINA 5 mM. $P < 0.0025$ (comparing theophylline groups). $P < 0.20$ (comparing glucose 33.4 mM groups). $P < 0.0025$ (comparing theophylline groups within each glucose level).

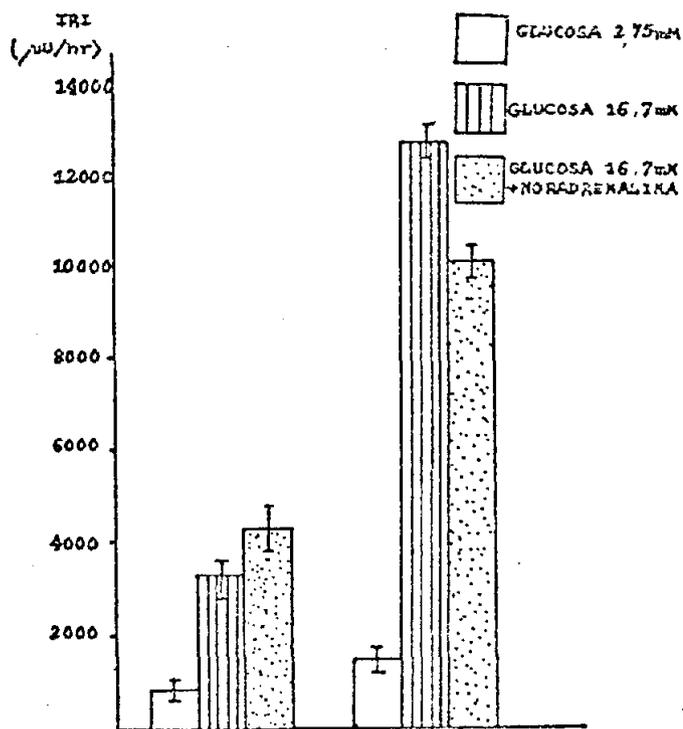
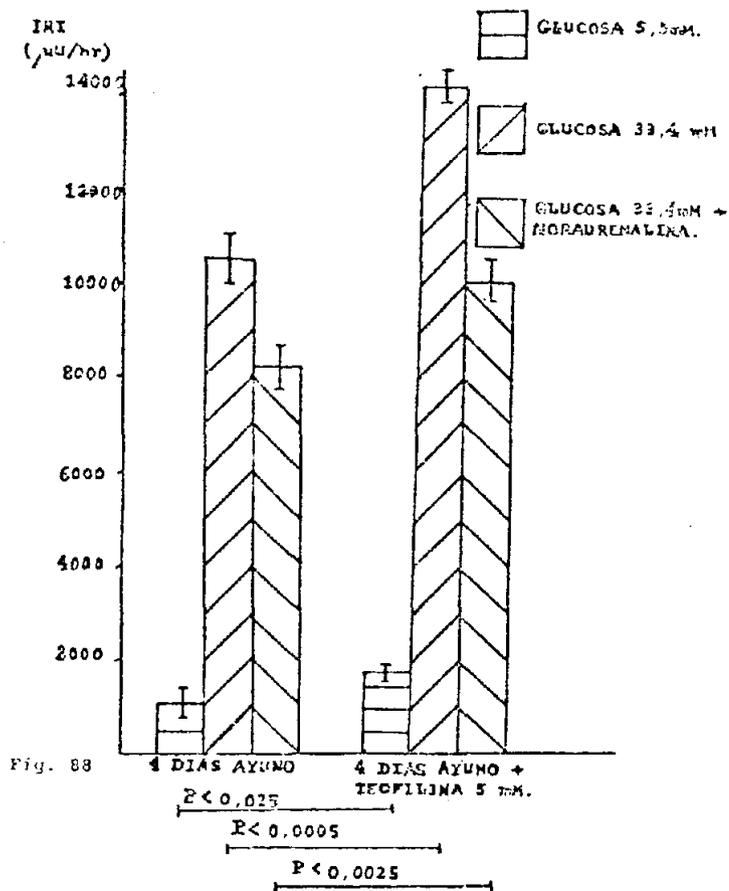
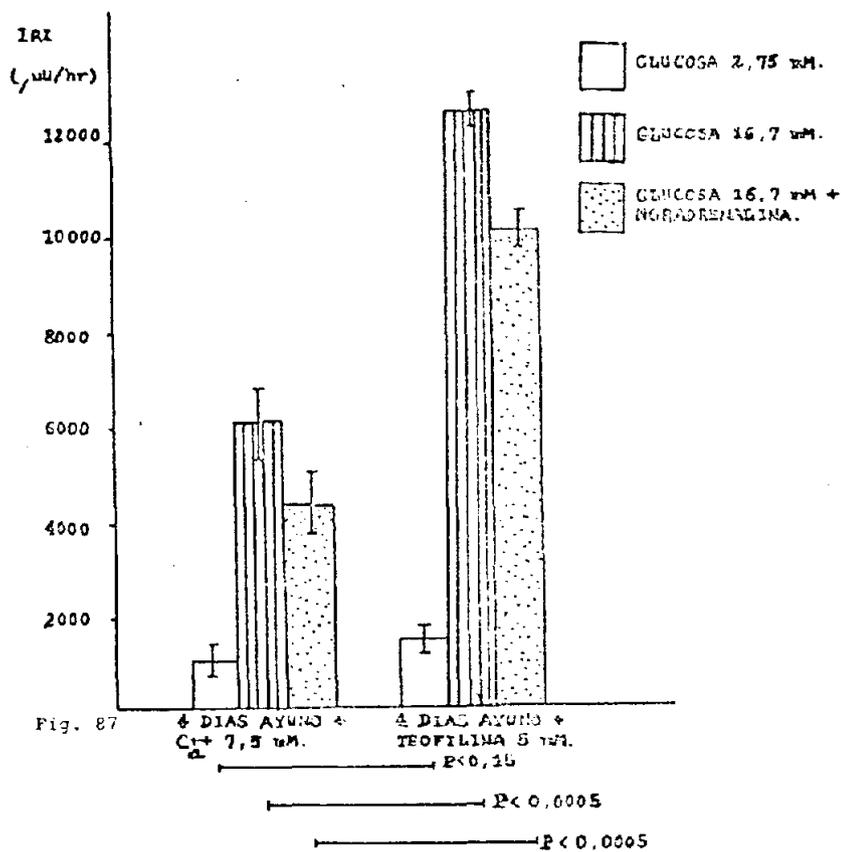


Fig. 86 4 DIAS AYUNO + TEOFILINA 5 mM. $P < 0.0125$ (comparing theophylline groups). $P < 0.0005$ (comparing theophylline groups within each glucose level). $P < 0.0005$ (comparing theophylline groups within each glucose level).



4 INTEGRACION DE RESULTADOS Y DISCUSION.

4°) INTEGRACION DE RESULTADOS Y DISCUSION.

Hoy no es posible todavía contestar a la pregunta si es la glucosa misma o alguno de sus metabolitos, el disparador que pone en marcha el mecanismo de secreción de la insulina.

Como todos sabemos, la célula beta está preparada para responder, de un modo inmediato, aumentando o inhibiendo la secreción de insulina, según los niveles de glucosa circulante.

La dificultad para contestar a la pregunta que nos planteábamos estriba en que la glucosa es a la vez la señal que pone en marcha el mecanismo (semejante en todo a un verdadero efector hormonal), y metabolito fisiológico para la obtención de la energía necesaria en las funciones propias de esta célula. Por lo tanto cuando estudiamos el proceso de secreción además, /o al mismo tiempo que se desencadena (la secreción) la glucosa es metabolizada por la vía glicolítica exactamente del mismo modo que en cualquier otra célula. De aquí surge el problema de desentrañar el mecanismo de la secreción.

Podemos disponer de un modelo experimental capaz de inhibir la secreción. Se trata del ayuno. En efecto es conocido que durante el ayuno se inhibe la secreción de insulina, y nos basamos en este fenómeno para aportar algunos datos que pensamos son de interés para comprender el mecanismo de secreción.

¿ Qué sabemos hasta ahora del mecanismo de secreción y biosíntesis de insulina?.

Está bien demostrado que cuando aumenta los niveles de glucosa en el medio se produce la secreción de unos gránulos (gránulos beta) que contienen insulina y que previamente habían sido sintetizados en el ribosoma.

Sabemos también que antes de producirse la secreción se modifican los niveles de nucleótidos cíclicos intracelulares, así como disminuye la salida del calcio desde el interior al exterior de la célula.

Matthews ha demostrado (ver fig 89) que existe una correlación entre la secreción de insulina y la actividad eléctrica celular medida como diferencia de potencial entre el exterior y el interior celular. Los trabajos han sido realizados utilizando microelectrodos.

Es por lo tanto indiscutible la existencia de fenómenos bioeléctricos y de permeabilidad durante la secreción.

Desconocemos en primer lugar, como se unen todos estos procesos y sobre todo como se relacionan con el metabolismo de la glucosa y a que nivel del mismo. Parece ser que intervienen una serie de factores que exponemos en la figura (90).

En efecto, la glucosa sería la señal que al unirse a un receptor específico, transmitiría una información al interior de la célula, que sería capaz de estimular la

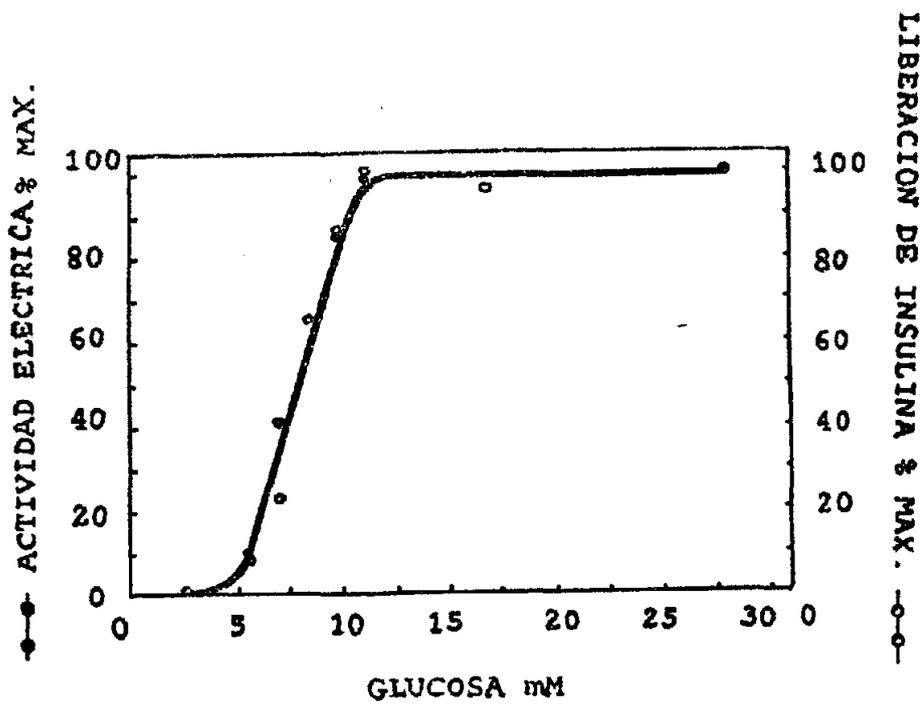


FIG.89 CORRELACION ENTRE LA SECRECION DE INSULINA Y LA ACTIVIDAD ELECTRICA EN LA CELULA BETA. (MATTEWS, 1977).

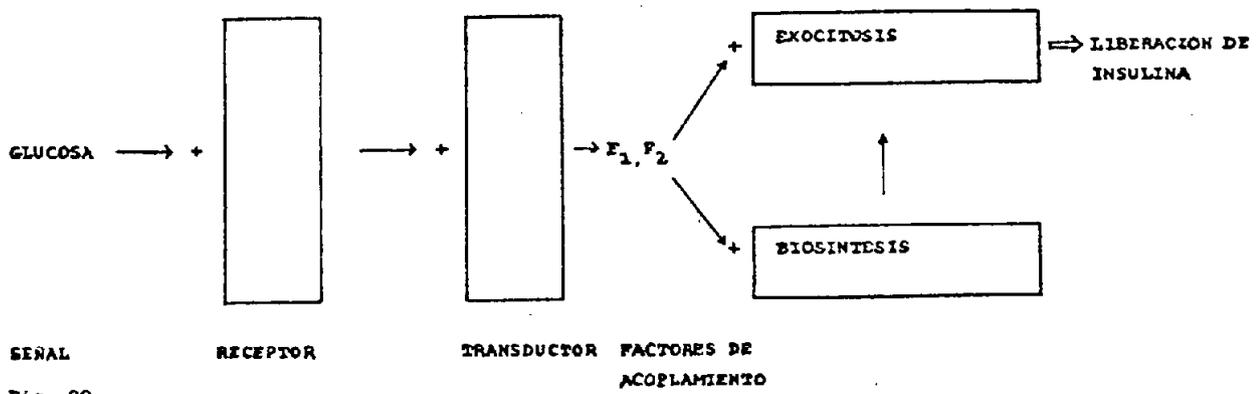


Fig. 90

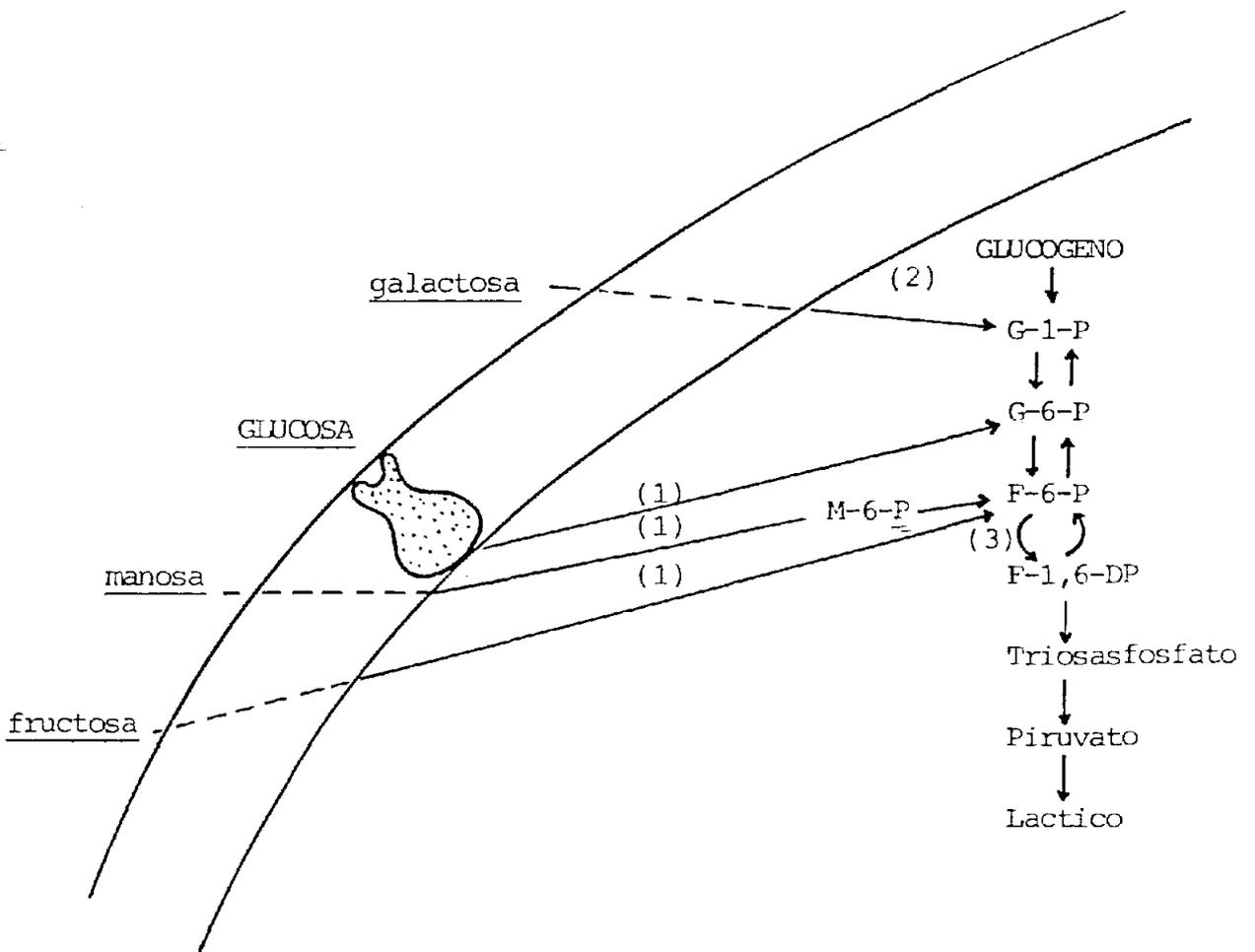
Modelo para la regulación de la liberación de insulina por glucosa. Ashcroft (1977)

biosíntesis y la secreción de la insulina. Esta teoría intenta agrupar los trabajos de una serie de autores que están convencidos de la existencia de un glucorreceptor.

Por el contrario, hay otras evidencias que parecen apuntar de que es durante el metabolismo de la glucosa y al parecer a nivel de las triosas fosfato en donde se desencadena la secreción. Fig. 91.

Este argumento se basa en que el gliceraldehído es un potente estimulador de la secreción, pero no tiene en cuenta que la fructosa, (un escalon previo en la vía glicolítica), es capaz de aumentar escasamente la secreción. Así mismo, la galactosa que penetra en el metabolismo por la glucosa-1-P, es capaz de aumentar los niveles de ácido láctico (lo que demuestra su metabolismo hasta el final de la vía glicolítica y sin embargo es incapaz de desencadenar la secreción). Por último las pentosas tampoco modifican la secreción y todos sabemos que estos azúcares acaban en fructosa -6-P, un escalon previo y obligado de la vía glicolítica.

Nosotros pensamos que en el caso de tratarse de un metabolito, se encontraría en las primeras etapas de la glicólisis (glucosa -6-P) o se trata, de una molécula sensible a determinadas concentraciones de glucosa o un transportador de la misma en la etapa inmediatamente



- 1) HEXOQUINASA
- 2) URIDIL TRANSFERASA
- 3) FOSFOFRUCTOQUINASA

Fig. 91

anterior a la fosforilización de la glucosa (hexoquinasa, glucoquinasa). De éste modo, otro azucar que potentemente estimula la secreción como es el caso de la manosa, utiliza así mismo la hexoquinasa para pasar a manosa -6-P, y fructosa -6-P.

Finalmente otro argumento en contra de etapas tardias en la via glicolitica seria el hecho de que en presencia de niveles altos de glucosa, llega un momento que se inhibe la fosfofructoquinasa para dirigir el metabolismo a la sintesis de glucogeno, y sin embargo durante todo el tiempo en que está aumentada la glucosa hay una secreción de insulina permanente. En favor de la existencia del glucorreceptor tenemos en primer lugar la sensibilidad especial de la célula beta a determinadas concentraciones de alfa D-glucosa (estereoespecificidad), en segundo lugar la existencia de potenciadores y en tercer lugar, el papel permisivo de la glucosa, para que otros metabolitos aumenten la secreción, (figura 92) estimuladores, potenciadores, inhibidores).

Si correlacionamos las diferentes concentraciones de glucosa con la secreción utilizando el pancreas aislado y perfundido de rata, tenemos un sigmoide donde la rama ascendente del mismo la encontramos entre 100 y 300mg% Fig. 93 En el caso de animales con distinto periodo de ayuno, progresivamente la secreción de insulina será menor, la respuesta es lineal, pero la perdida de sensibilidad de

EFFECTOS DE LOS AZUCARES SOBRE LA LIBERACION DE LA INSULINA
EN LOS ISLOTES DE RATON.

INICIADORES	POTENCIADORES	INHIBIDORES	SIN EFECTO
GLUCOSA	FRUCTOSA	MANOHEPTULOSA	L-GLUCOSA
MANOSA	N-ACETILGLUCOSAMINA	GLUCOSAMINA	3-O-METILGLUCOSA
GLICERALDEHIDO	L-GLICERALDEHIDO		2-DEOXIGLUCOSA
DIHIDROXIACETONA	MANOHEPTULOSA		GALACTOSA
GLUCOSAMINA	GLUCOSAMINA		TIOGLUCOSA DE ORO
			RIBOSA
			PIBITOL
			XILITOL

Fig. 92

Esta tabla recopila los datos de Ashcroft et al (1972-1973) y Hellman et al (1974).

Los iniciadores de la liberación son capaces de lograr por si mismo la liberación de insulina.

Los potenciadores requieren la presencia de un iniciador en orden a ser efectivo.

Todos los azucares son D-estereoisómeros salvo los indicados como formas L.

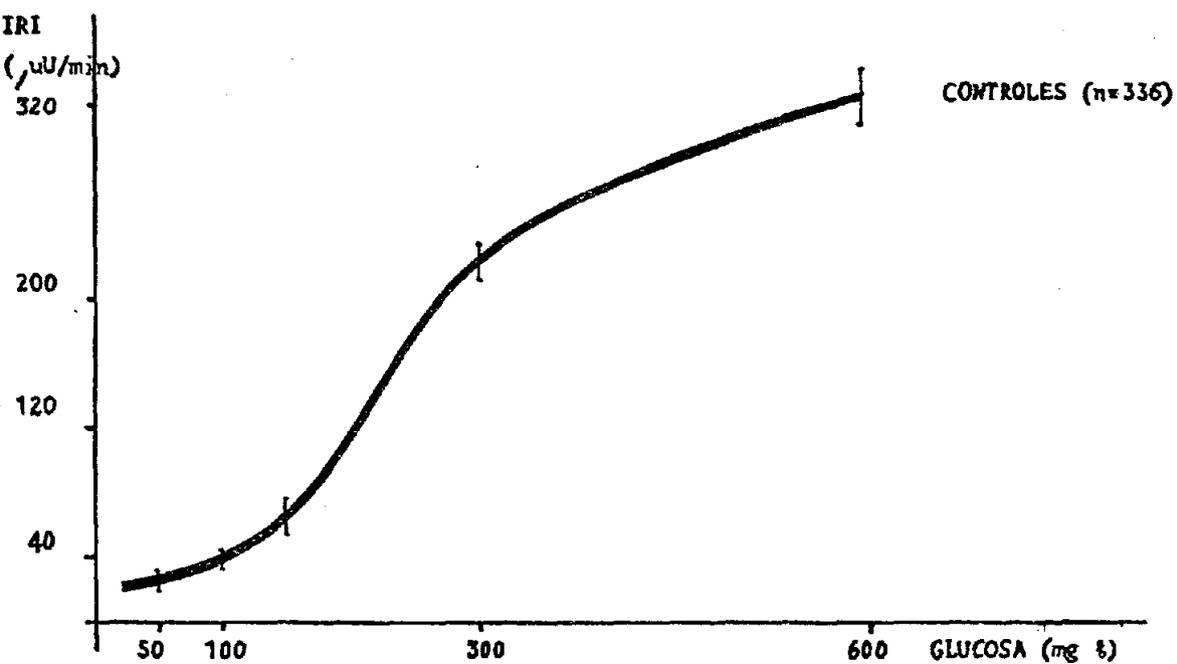


FIG. 93 CINETICA DE LA SECRECION DE INSULINA POR LA CELULA BETA EN PRESENCIA DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE GLUCOSA EN EL GRUPO CONTROL. PODEMOS OBSERVAR COMO LA CINETICA ES SIGMOIDEA CON LA RAMA ASCENDENTE DEL SIGMOIDE ENTRE 100 Y 300.

la célula beta por la glucosa es solamente entre 100 y 300mg% (ver figuras 94 y 95). Goberna et al 1978.

El sigmoide aparece solo frente a la glucosa. Con la arginina (ver fig 96) la respuesta es siempre lineal (Arilla et al 1978). Esta respuesta sigmoidal aparece en el caso de enzimas alostericos, como la fosfofructoquinasa, la fosforilasa beta. Este comportamiento alosterico es semejante al de la Hb frente al O_2 .

Se trataría de una molecula (glucosensor o transportador de la glucosa) que como la hemoglobina se uniría a la glucosa solo frente a determinadas concentraciones, dando la cinética sigmoidal.

Este fenomeno alosterico desaparece en el ayuno, y reaparece con la realimentación (figura 97). Goberna et al 1978.

Cabe la posibilidad que dicha proteína fuese la que fosforiliza a la glucosa, la hexoquinasa, o se trate de una proteínquinasa de membrana. En nuestro laboratorio se están iniciando trabajos para aclarar dicha hipótesis.

El bloqueo del ayuno debe encontrarse a este nivel y debemos describir aquí dos resultados de máximo interés: en primer lugar, al aumentar el Ca^{2+} en el medio, en el caso de animales ayunados, la respuesta de secreción es mayor pero continua siendo lineal (Goberna et al 1978). Figura 98 . Al aumentar los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos en la célula beta del pancreas en el caso

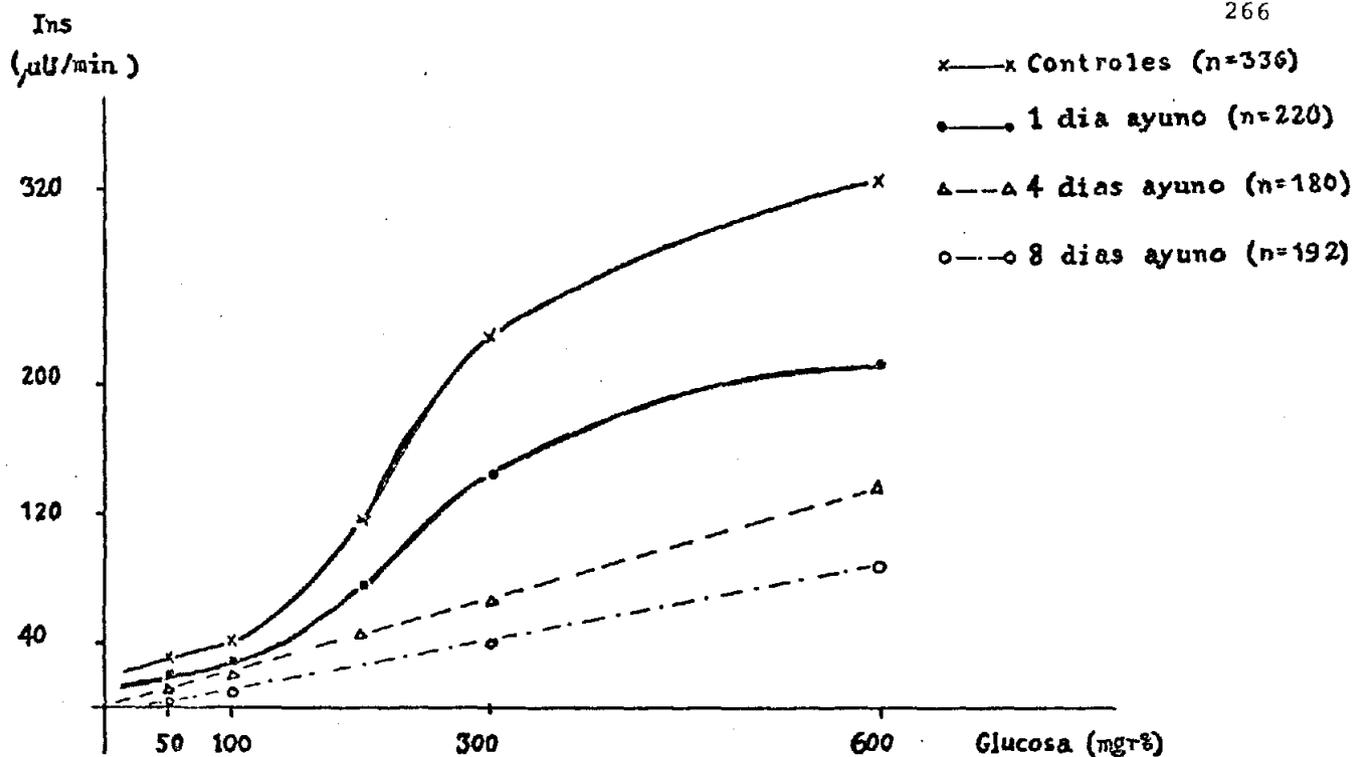


FIG. 94 MUESTRA LA DISTINTA RESPUESTA DE LA CELULA BETA FRENTE A CONCENTRACIONES CRECIENTES DE GLUCOSA. EN EL CASO DE PANCREAS PROCEDENTE DE ANIMALES CONTROLES LA RESPUESTA ES SIGMOIDEA. EN EL CASO DE ANIMALES AYUNADOS 4 Y 8 DIAS, LA RESPUESTA ES MENOR Y LINEAL.

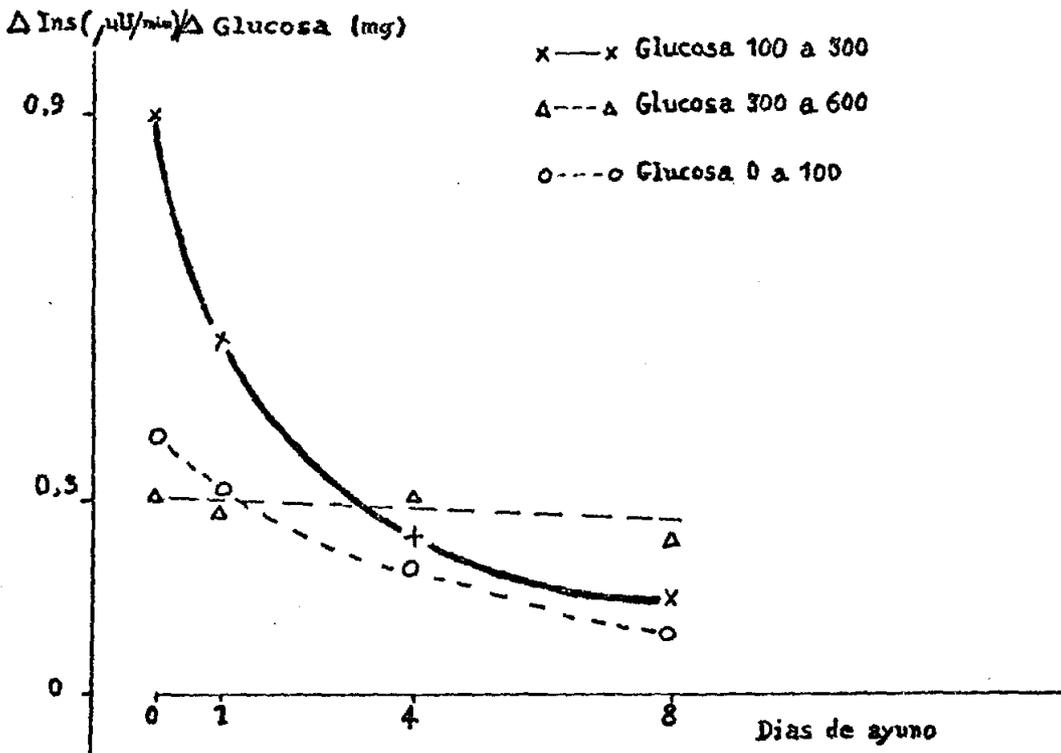


FIG. 95 INFLUENCIA DE LOS PERIODOS DE AYUNO CRECIENTE (ABSCISAS) SOBRE LA SECRECION DE INSULINA, REPRESENTADA COMO INCREMENTO DE LA SECRECION POR MILIGRAMO DE GLUCOSA AUMENTADA EN EL MEDIO (ORDENADAS), DEL ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS TRES TRAMOS CARACTERISTICOS DE LA CURVA PODEMOS OBSERVAR QUE MIENTRAS EL AYUNO NO TIENE NINGUNA INFLUENCIA EN LA SECRECION PROVOCADA POR GLUCOSA ENTRE 300 Y 600 MILIGRAMOS, LA CAIDA ES EXPONENCIAL EN CONCENTRACIONES QUE OSCILAN ENTRE 100 Y 300.

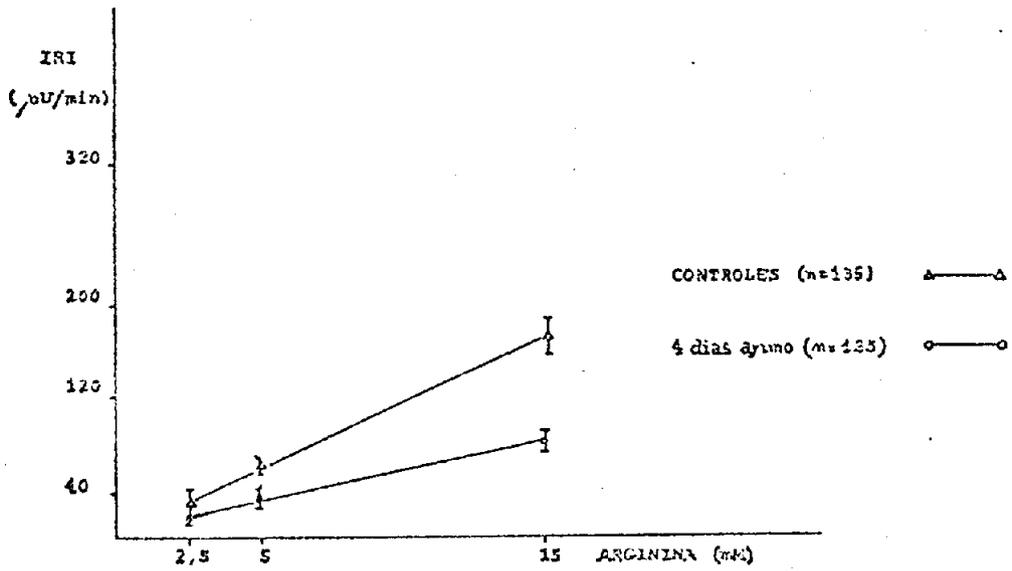


FIG. 96 CINÉTICA DE LA SECRECIÓN DE INSULINA POR LA CELULA BETA EN PRESENCIA DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE ARGININA 2'5, 5 Y 15mM EN CONTROLES Y 4 DIAS DE AYUNO. PODEMOS OBSERVAR COMO LA CINÉTICA ES LINEAL.

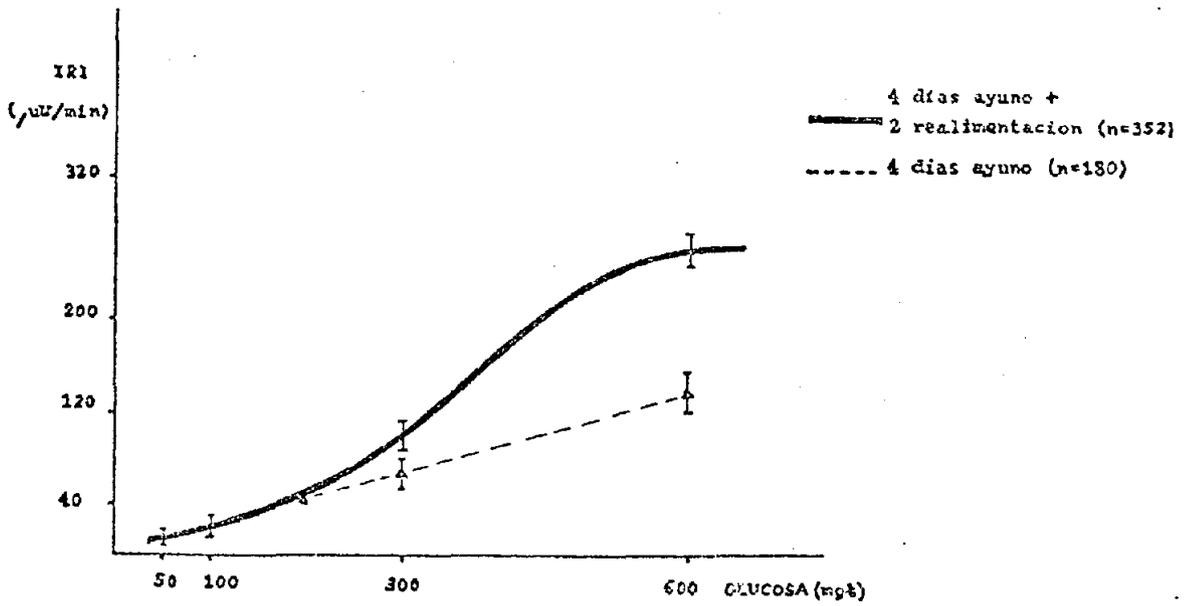


FIG. 97 RECUPERACION DE LA CINETICA SIGMOIDAL DE LA SECRECION DE INSULINA DESPUES DE LA REALIMENTACION CON DIETA STANDARD DURANTE 48 HORAS EN RATAS SOMETIDAS A 4 DIAS DE AYUNO.

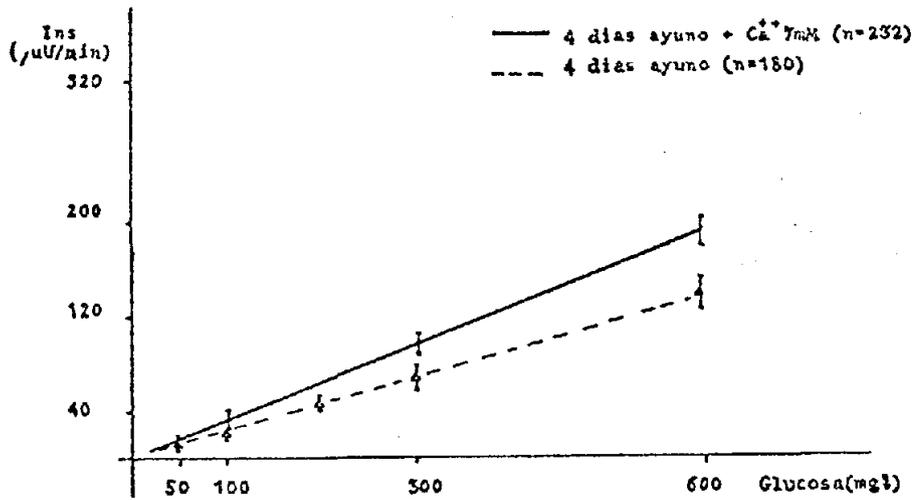


FIG. 98 CINETICA DE LA SECRECION DE INSULINA POR LA CELULA BETA CON CALCIO 7 mM Y GLUCOSA 2'75, 5'5, 16'7 Y 33'4 mM DESPUES DE 4 DIAS DE AYUNO. PODEMOS OBSERVAR QUE LA CINETICA SIGUE SIENDO LINEAL COMO A LOS 4 DIAS DE AYUNO, PERO CON UNA MAYOR PENDIENTE.

de animales ayunados, mediante inhibidores competitivos de la fosfodiesterasa, o mediante dibutiril -cAMP, el desbloqueo de la secreción es evidente con la aparición del sigmoide característico (ver figuras 99-100). (Goberna et al 1978, Ortiz et al 1978). Finalmente hay otros dos argumentos a favor de la existencia de una molécula sensible o transportadora de la glucosa. En primer lugar la existencia de potenciadores que modulan la secreción. Tiene que existir un locus para ellos.

En segundo lugar el papel permisivo de la glucosa en el estímulo de la secreción provocada por los no azúcares tales como el palmitico (ver figura 101).

Por último debemos decir que en 1977 se aisló en membranas adipocitos una proteína transportadora de la glucosa que conserva las propiedades del transportador en la célula intacta. Shanahan and Czech 1977.

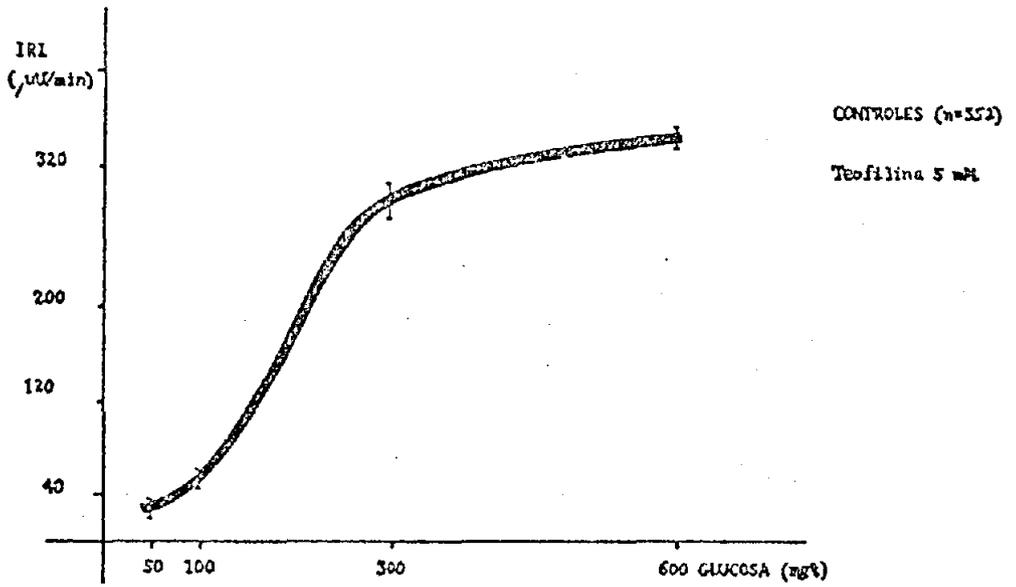


FIG. 99 CINETICA DE LA SECRECION DE INSULINA POR LA CELULA BETA EN PRESENCIA DE TEOFILINA 5 mM Y GLUCOSA 2'75, 5'5, 16'7 Y 33'4 mM EN UN GRUPO CONTROL. PODEMOS OBSERVAR COMO LA CINETICA ES SIGMOIDEA.

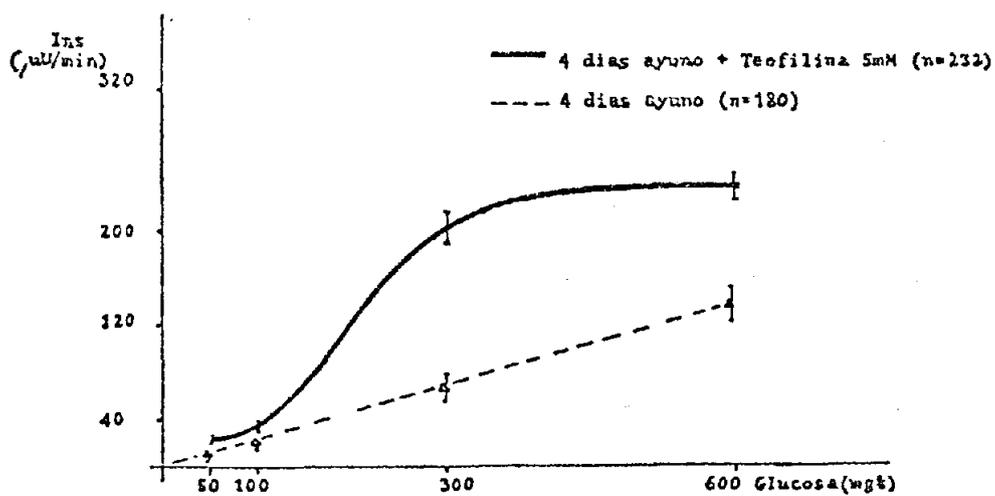


FIG. 100 RECUPERACION DE LA CINETICA SIGMOIDAL DE LA SECRECION DE INSULINA POR TEOFILINA 5 mM EN PRESENCIA DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE GLUCOSA 2'75, 5'5 16'7 Y 33'4 mM DESPUES DE 4 DIAS DE AYUNO.

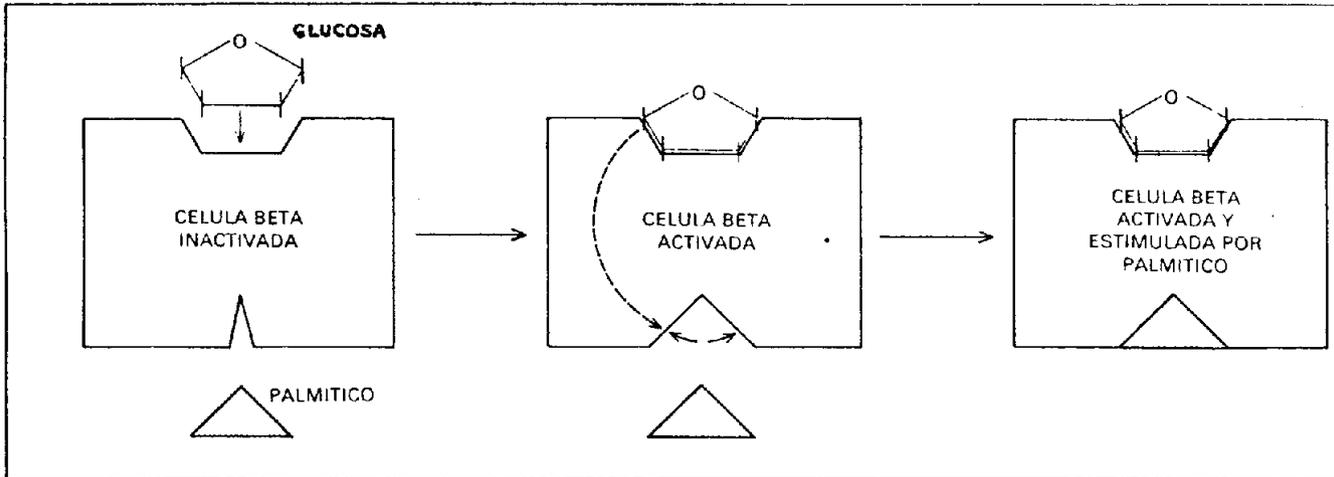


Fig. 101 La glucosa tiene un papel permisivo para que otras sustancias sean capaces de estimular la célula beta. En la figura se muestra cómo el palmítico por sí solo es incapaz de estimular la célula beta (izquierda), pero una vez adaptada la glucosa a su receptor/transportador (centro), el palmítico es capaz de estimular la célula ya activa (derecha) provocando de este modo la secreción de la insulina. (R. Goberna, 1978).

5º CONCLUSIONES.

5°) CONCLUSIONES.

1. En pancreas aislado y perfundido la secreción de insulina muestra una cinética sigmoide dependiente de la glucosa extracelular en concentraciones comprendidas entre 2'75 y 33'4 mM.
2. El ayuno provoca un bloqueo de la secreción de insulina por inactivación de la célula beta. En el trabajo se muestra como la glucosa, arginina y beta-OH-butilato a diferentes concentraciones son incapaces de estimular la secreción en periodos de ayuno de 4 y 8 días.
3. El ayuno provoca una pérdida del sigmoide característico y la linearización de la secreción.
4. La realimentación con dieta standard durante cuarenta y ocho horas en animales sometidos a cuatro días de ayuno, desbloquea parcialmente la secreción de insulina que vuelve a la normalidad, apareciendo la cinética sigmoidal.
5. La utilización de teofilina 5 mM (metilxantina) en pancreas procedentes de animales ayunados, desbloquea también la secreción de insulina, y reaparece la cinética sigmoidal. Los mismos resultados se obtienen con dibutilil-AMPc 2 mM.

6. Al aumentar las concentraciones de Ca^{++} en el medio de perfusión (de 3'5 a 7'5 mM) de los pancreas procedentes de las ratas ayunadas, aumenta significativamente la secreción de insulina, pero la cinética continua siendo lineal.

7. La arginina aumenta la secreción de insulina, inducida por glucosa, siendo la cinética de secreción lineal. Realizadas las mismas experiencias en el ayuno, la cinética de secreción continua siendo lineal.

8. Nuestros resultados indican que el beta-OH-butirato, en presencia de glucosa, representa un estímulo de la célula beta, produciendo un aumento inmediato de la secreción de insulina. En el ayuno, hay una pérdida progresiva de la sensibilidad de la célula beta frente al beta-OH-butirato.

9. Estos hallazgos nos hacen postular la hipótesis de que en el ayuno se pierde alguno de los mecanismos de secreción. No sabemos todavía si se trata de un transportador de la glucosa, un enzima alosterico de las primeras etapas de la glicolisis como la hexoquinasa, glucoquinasa o fosfofructoquinasa, o un hipotético glucosensor. Los trabajos en la Cátedra de Bioquímica se orientan en este momento para aclarar estas incógnitas.

6º BIBLIOGRAFIA.

6°) BIBLIOGRAFIA.

ALBERT, K.G.M.M., CHRISTENSEN, N.J. and CHRISTENSEN, S.E.
Inhibition of insulin secretion by somatostatin.
Lancet, 2: 1299; 1973.

ANDERSON, E. and LONG, A.
The effect of hyperglycemia on insulin secretion as
determined with the isolated rat pancreas in a perfusion
apparatus.
Endocrinology 40: 92; 1947.

ARILLA, E., HERRERA, T., ORTIZ, S., RUIZ, G., Lucas, M.,
Y GOBERNA, R.
Acción de la arginina sobre la cinetica de secreción de
insulina durante el ayuno.
XVII Congreso Nacional Sociedad Española Ciencias
Fisiológicas, 1978. 104.

ASCHROFT, S.J.H. and RANDLE, P.J.
Enzyme of glucose metabolism in normal mouse pancreatic
islets.
Biochem J. 119: 5; 1970.

ASCHROFT, S.J.H., BASSET, J.M., RANDLE, P.J.
Insulin secretion mechanism and glucose metabolism in
isolated islets.
Diabetes 21:(suppl 2) 538; 1972.

ASCHROFT, S.J.H., RANDLE, P.J. and TALJEDAL, I.B.
Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in normal
mouse pancreatic islets.
Febs Lett. 20: 263; 1972.

ASCHROFT, S.J.H., WEERASINGHE, L.C.C. and RANDLE, P.J.
Interrelationships of islet metabolism, adenosine triphosphate
content and insulin release.
Biochem, J. 132: 223; 1973.

BASABE, J.N., LOPEZ, J., VIKTORA and WOLFF, F.
Insulin secretion studied in the perfused rat pancreas. I.
Effect of tolbutamide, leucine, and arginine their
interaction with diazoxide and relation to glucose.
Diabetes 20: 449; 1971.

BHATENA, S.J., PERRINO, P.V., VOYLES, N.R., SMITH, S.S.,
WILKINS, S.D., COY, D.H., SCHALLY, A.V., RECENT, L.
Reversal of somatostatin inhibition of insulin and
glucagon secretion.
Diabetes 25: 1031; 1976.

BRAZEAU, P., VALE, W., BURGUS, R., LING, N., BURCHER, M.,
RIVER, J., GUILLEMIN, R.
Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of
immunoreactive pituitary growth hormone.
Science 179: 77; 1973.

BRISSON, G.R. and MALAISSE, W.J.

The stimulus-secretion coupling of glucosa-induced insulin release XI. Effects of theophylline and epinephrine on ^{45}Ca efflux from perifused islets.

Metabolism 22: 455; 1973.

BROLIN, S.E. and BERNE, C.

The structure and metabolism of the pancreatic islets.p.245

Ad^S: FALKMER, S., HELLMAN, B., TALJEDAL, I.B.

Pergamon. Press. Oxford 1970.

BUCKLEY, I.K. and PORTER, K.R.

Cytoplasmic fibrils in living cultured cells.

A light and electron microscope study.

Protoplasma 64: 349; 1967.

CAPITO, K. and HEDESKOV, C.J.

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

Biochem. J. 142: 153; 1974.

CERASI, E. and LUFT, R.

Diabetes mellitus a disorder of cellular information transmission?.

Horm Metab. Res: 2: 246; 1970.

CERASI, E. and LUFT, R.

Is diabetes mellitus a disorder of the cellular information transmission?.

Acta Diabet. Lat. 7 (suppl 1) 278; 1970.

CERASI, E., LUFT, R., EFENDIC, S.

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

Acta Endocr. (Kbh) 69: 335; 1972.

CERASI, E.

Mechanism of glucose stimulated insulin secretion in health and in diabetes: some reevaluations and proposals.

Diabetologia, 11: 1; 1975.

CHANG, K.J., MARCU, N.A. and CUATRECASAS, P.

Cyclic adenosine monophosphate-dependent phosphorylation of specific fat cell mambrane proteins by an endogenous membrane-bound Protein Kinase.

J. Biol. Chem 249: 6854; 1974.

CHARLES, M.A., LAWECKI, J., PICTET, R. and GRODSKY, G.M.

Insulin secretion interrelationships of glucose, cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and calcium.

J. Biol. Chem 250: 6134; 1975.

CHENG, K. and KATSOYANNIS, P.G.

The inhibition of sugar transport and oxidation in fat cell ghosts by colchicine.

Biochem. Biophys. Res. Commun 64:1069; 1975.

COORE, H.G. and RANDLE, P.J.

Block of insulin secretion from the pancreas by D-Mannoheptulose.

Nature (London) 197: 1264; 1963.

COORE, H.G. and RANDLE, P.J.

Regulation of insulin secretion studied with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro.

Biochem. J. 93: 66; 1964.

CURRY, D.L., BENNETT, L.L.

Reversal of somatostatin inhibition of insulin secretion by calcium.

Biochem. Biophys. Res. Commun 60: 1015; 1974.

CURRY, D.L., BENNETT, L.L., LI, C.H.

Direct inhibition of insulin secretion by synthetic somatostatin.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 38: 885; 1974.

DAVIS, B. and LAZARUS, N.R.

Insulin release from mouse islets. Effect of glucose and hormones on adenylate cyclase.

Biochem. J. 129: 373; 1972.

DEAN, P.M. and MATTHEWS, E.K.

Electrical activity in pancreatic islets cells.

Nature 129: 389; 1968.

DEERY, D.J., COLEMAN, T.J. and TAYLOR, K.W.

Effect of azaserine on insulin release in vitro.

Biochem J. 124: 65p; 1971.

DEVIS, G., SOMERS, G. and MALAISSE, W.J.

Dynamics of calcium induced insulin release.

Diabetologia, 13: 531; 1977.

FAJANS, S.S., FLOGD, J.C. Jr.

Stimulation of islets cell secretion by nutrients and by gastrointestinal hormones released during digestion.

In steiner, D.F., N. Freinkel(eds), Handbook of Physiology, sect. 7, Endocrinology, vol.I. Am.

Physiol. Soc. Washington. D.C., p 473: 1972.

FIELD, J.B., JOHNSON, P. HERRING, B., WEINBERG, A.N.

Evidence for the hexose monophosphate pathway for glucose metabolism in human pancreatic beta cells.

Nature(London) 185: 468; 1960.

FUSSGANGER, R.D., STRAUB, K., GOBERNA, R., JAROS, P.,
SCHRODER, K.E., RAPTIS, S. and PFEIFFER, E.F.

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

Horm. Metab. Res. 1: 224; 1969.

GABBAY, K.H. and TZE, W.J.

Inhibition of glucosa induced release of insulin by
aldose reductase inhibitors.

Proc. Natl. Acad. Sci. 69: 1435; 1972.

GABBIANI, G., MALAISSE-LAGAE, F., BLONDEL, B. and ORCI, L.

Actin in pancreatic islet cells.

Endocrinology 95: 1630; 1974.

GEORG, R.H., SUSSMAN, K.E., LEITNER, J.W., KIRSCH, W.M.

Inhibition of glucose and tolbutamide induced insulin
release by iodoacetate and antimycin A.

Endocrinology: 89: 169; 1971.

GEPTS, W., F. GREGOIRE, A. VAN ASSCHE and M. DE GASPARE.

The structure and metabolism of the pancreatic islets p.283.

Ed^S: Falfmer S., Hellman, B., Taljedal, I.B.

Pergamon Press. Oxford. 1970.

GERICH, J.E., CHARLES, M.A. and GRODSKY, G.M.

Characterization of effect of arginine and glucose on glucagon an insulin release from perfused rat pancreas.
J. Clin. Invest. 54: 833; 1974.

GILLESPIE, E.

Colchicine binding in tissue slices.

Decrease by calcium and biphasic effect of adenosine 3'-5'-monophosphate.

J. Cell. Biol. 50: 544; 1971.

GILLESPIE, E.

Cyclic AMP, cell growth and the immune response.
(Braun, V., Lichtenstein, L.M. and Parker, N. eds)
p. 217, Springer. Verlag. Berlin 1974.

GOBERNA, R.

Tesis Doctoral:

Dinamica de la secreción de insulina.

Valencia 1968.

GOBERNA, R., FUSSGANGER, R.D., RAPTIS, S., DITSCHUNEIT, H.
and PFEIFFER, E.F.

Glybenclamid (HB 419) and the prediabetes of subtotally
pancreatectomized rats.

Horm. Metab. Res. 25: 175; 1969.

GOBERNA, R., FUSSGANGER, R.D., RAPTIS, S., TELIB, M. and
PFEIFFER, E.F.

The role of the exocrine pancreas in the stimulation of
insulin secretion by intestinal hormones. II Insulin
responses to secretion and pancreozymin in
experimentally-induced pancreatic exocrine insufficiency.
Diabetologia 7: 68; 1971.

GOBERNA, R., KARL, H., FUSSGANGER, R.D., LAUBE, H. and
PFEIFFER, E.F.

Effect of the synthetic progestin chlormadinone acetate
on the insulin response to glucose in normal and
subtotally pancreatectomized rats.
Endocrinology 39: 974; 1971.

GOBERNA, R.

Hormonas gastrointestinales y secreción de insulina.
Actas de la Sociedad de Endocrinología de Madrid.
IV, (2) 71: 1972.

GOBERNA, R.

Glucagon y diabetes experimental.
Diab. Clin. Endocr. y Nutr. X, (2) 27: 1975.

GOBERNA, R., ARILLA, E., RUIZ, G., JIMENEZ, J., PRIETO, J.C.
Y SOBRINO, F.

Cinética de secreción de la insulina durante el ayuno.
III Congreso Nacional de Endocrinología. p.108. 1978.

GOBERNA, R., ARILLA, E., HERRERA, M.T., RUIZ, G.,
SOBRINO, F. and PRIETO, J.C.

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

Diabetologia 15: 235; 1978 (abstract).

GOBERNA, R., TAMARIT, J.Jr. De MIGUEL, E. and TAMARIT, J.
Direct stimulation of insulin secretion "in vitro" by
perfusion of F.F.A. (Free Fatty acid.) and ketone bodies.
VIII Congress of the International Diabetes Federation.
Brussels. Excerpta Medica. 280:22; 1973.

GOBERNA, R.

¿Cómo se segrega la insulina?.

Scientific. American (Edición en español). 21: 93; 1978.

GOODMAN, D.B.P., RASMUSSEN, H., DIBELLA, F. and GUTHROW, C.E.

Cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate-stimulated
phosphorylation of isoted neurotubule subunits.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67: 652; 1971.

GREY, N.J., GOLDRING, S. and KIPNIS, D.M.

The effect of fasting diet and actinomycin don insulin
secretion in the rat.

J. Clin. Invest. 49: 881; 1970.

GRILL, V. and CERASI, E.

Stimulation by hexoses of cyclic AMP accumulation and insulin release in pancreatic islets.

Diabetologia. 10: 366; 1974(abstracts).

GRILL, V. and CERASI, E.

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

Febs. Letters. 54: 80; 1975.

GRODSKY, G.M., BATTIS, A.A., BENNETT, L.L., VEELLA, C.Mc.

WILLIAMS, N.B. and SMITH, D.F.

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

Amer. J. Physiol. 205: 638; 1963.

GRODSKY, G.M. and BENNETT, L.L.

Cation requirements for insulin secretion in the isolated perfused pancreas.

Diabetes. 15: 910; 1966.

GRODSKY, G.M.

A threshold distribution hypothesis for packet storage of insulin.

II- Effect of calcium.

Diabetes: 21: 584; 1972.

GUTHROW, C.E., ALLEN, J.E. and RASMUSSEN, H.

Phosphorylation of an endogenous membrane protein by an endogenous membrane associated cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate-dependent protein kinase in human erythrocyte ghosts.

J. Biol. Chem. 247: 8145; 1972.

HEDESKOV, C.J., CAPITO, K.

The effect of starvation on insulin secretion and glucose metabolism in mouse pancreatic islets.

Biochem. J. 140: 423; 1974.

HELLERSTROM, C., WESTMAN, S., MARSDEN, N. and TURNER, D.

The structure and metabolism of the pancreatic islets.

p. 315. Eds. Falkmer, S. Hellman, B., Taljedal, I.B.

Pergamon Press. Oxford 1970.

HELLMAN, B., SEHLIN, J. and TALJEDAL, I.B.

The pancreatic beta cell recognition of insulin secretagogues. Site of action of tobultamide.

Biochem. Biophys. Res. Commun 45: 1348; 1971.

HELLMAN, B., SEHLIN, J. and TALJEDAL, I.B.

Effects of glucose and other modifiers of insulin release on the oxidate metabolism of aminoacids in micro-dissected pancreatic islets.

Biochem. J. 123: 513; 1971.

HELLMAN, B., SEHLIN, J. and TELJEDAL, I.B.

Uptake of alanine, arginine and leucine by mammalian pancreatic beta cell.

Endocrinology. 89: 1432; 1971.

HELLMAN, B.

Algunos aspectos de los mecanismos de insulino-secreción. Obesidad y diabetes.

Anales de la Universidad Hispalense. 20: 81; 1974.

HELLMAN, B., IDAHL, L.A., LERNMARK, A. and TALJEDAL, I.B.

The pancreatic beta-cell, recognition of insulin secretagogues: does cyclic AMP mediate the effects of glucose?.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 3405; 1974

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

and TALJEDAL, I.B.

The pancreatic beta cell recognition of insulin secretagogues. Comparisons of glucose with glyceraldehyde isomers and dihydroxyacetone.

Arch. Biochem. Biophys. 162: 448; 1974.

HELLMAN, B., IDAHL, L.A., LERNMARK, A., SEHLIN, J. and TALJEDAL, I.B.

The pancreatic beta cell recognition of insulin secretagogues. Effects of calcium and sodium on glucose metabolism and insulin release.

Biochem. J. 138: 33; 1974.

HELLMAN, B., IDAHL, L.A., LERNMARK, A., SEHLIN, J.
and TALJEDAL, I.B.

Membrane sulphhydryl groups and the pancreatic beta cell
recognition of insulin secretagogues.

In Diabetes. Proc. Congr. Int. Diabetes. Feb. 8th
ed. W.J. Malaisse. J. Pirart, 65: 1974.

HELLMAN, B.

The significance of calcium for glucose stimulation
of insulin release.

Endocrinology. 97: 392; 1975.

HELLMAN, B.

Stimulation of insulin release after raising extracellular
calcium.

Febs. Lett. 62. 125; 1976.

HOWELL, S.L., KOSTIANOVSKY, M. and LACY, P.E.

Beta granulo formation, in isolated islets of
Langerhans.

J. Cell Biol. 42: 695; 1969.

HOWELL, S.L. and MONTAGUE, W.

Adenylate cyclase activity in isolated rat islets of Langerhans. Effects of agents which alter rates of insulin secretion.

Biochem. Biophys. Acta. 320: 44; 1973.

HOWELL, S.L., MONTAGUE, W., TYHURST, M.

Calcium distribution in islets of Langerhans a study of calcium concentrations and of calcium accumulation in beta cell organelles.

J. Cell. Sci. 19: 395; 1975.

HUXLEY, H.E.

Mechanism of muscular contraction.

Science. 164: 1356; 1969.

IDAHL, L.A., SEHLIN, J., TALJEDAL, I.B.

Metabolic and insulin releasing activities of D-glucose anomers.

Nature. 254: 75; 1975.

JARRET, R.J. and KEEN, H.

Oxidation of sugars other than glucose by isolated mammalian islets of Langerhans.

Metabolism. 17: 155; 1968.

KANAZAWA, Y., IKENCHI, M., HAYASHI, M. and KOSAKE, K.

Movement of B-granules in cultured pancreatic beta cells
and its implication in insulin release.

Diabetes. 25(suppl.1) 346:(Abst) 1976.

KOERKER, D.J., RUCH, W. and CHIDECKEL, E.

Somatostatin: hypothalamic inhibitor of the endocrine
pancreas.

Science: 184: 482; 1974.

KUO, W.N., HODGINS, D.S. and KUO, J.F.

Adenylate cyclase in islets of Langerhans.

J. Biol. Chem. 248: 2705; 1973.

LABRIE, F., LEMAIRE, S., POIRIER, G., PELLETIER, G.

and BOUCHER, R.

Adenohypophyseal secretory granules, their phosphorylation
and association with Protein Kinase.

J. Biol. Chem. 246: 7311; 1971.

LACY, P.E., HOWELL, S.L., YOUNG, D.A. and FINCK, C.J.

New hypothesis of insulin secretion.

Nature(London) 219: 1177; 1968.

LACY, P.E., FINKE, E.H. and CODILLA, R.C.

Cinemicrographic studies on beta granule movement in monolayer culture of islet cells.

Lab. Invest. 33:570; 1975.

LAMBERT, A.E., KANAZAWA, BURR, I.M., ORCI, L. and RENOLD, A.E.

On the role of cyclic AMP in insulin release.

I overall effects in cultured fetal rat pancreas.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 185: 232; 1971.

LAMBERT, N., CAMUS, J. and CRISTOPHE, J.

Phosphorylation of protein components of isolated zymogen granule membranes from the rat pancreas.

Febs. Lett. 49: 228; 1974.

LAUBE, H., R. FUSSGANGER, GOBERNA, R., SCHRODER, K.,

HINZ, M., STRANB, K. und PFEIFFER, E.F.

Arginin-induzierte sekretion von insulin und glucagon bei verschiedenen diatformen.

Zymp. Dtsch. Ges. Endokrin. 16: 325; 1970.

LAZARUS, N.O. and DAVIS, B.

Model for extrusion of insulin B granule.

Lancet. 146: 1975.

LEMAY, A., DESCHENES, M., LEMAIRE, S., POIRIER, G.,
PULIN, L. and LABRIE, F.

Phosphorylation of adenohipophyseal plasma membranes
and propertiers of associated Protein Kinase.

J. Biol. Chem. 249: 323; 1974.

LERNMANRK, A. and HELLMAN, B.

Effect of epinephrine and mannoheptulose on early and late
phases of glucose-stimulated insulin release.

Metabolism 19: 614; 1970.

LEVIN, S.R., GRODSKY, G.M., HAGUTA, R., SMITH, D.F. and
FORSHAM, P.H.

Relationships between arginine and glucose in the induction
of insulin secretion from the isolated perfused rat pancreas.
Endocrinology. 90: 624; 1972.

LEVIN, S.R., CHARLES, M.A., SMITH, D., GRODSKY, G.M.

Contrasting effects of diphenylhydantoin(DPH) and diazoxide
(Dz) upon the first and second phases of insulin secretion
in the isolated, perfused rat pancreas.

Diabetes. 21: 327; 1972.

LOUBATIERES, A.

Stimulation and inhibition of insulin secretion. Physiollogical
and pharmacological interferences, synergism and antagonism.

Acta. Diabet. Lat. 5(suppl 1) 220: 1968.

LOUBATIERES, A., MARIANI, M.M., CHAPAL, J.

Insulino-sécrétion étudiée sur le pancreas isolé et perfusé du rat.II. Action des catécholamines et des substances bloquant les récepteurs adrénérgiques.

Diabetologia 6: 533; 1970.

LUCAS, M.

Modulación de la acción de la glucosa en la célula beta por agentes insulínotropos.

Tesis Doctoral. Madrid. 1975.

LUFT, R., EFENDIC, S. and HOKFELT, T.

Immunohistochemical evidence for the localization of somatostatin-like immunoreactivity in a cell population of the pancreatic islets.

Med. Biol. 52: 428; 1974.

MALAISSSE, W.J., MALAISSSE-LAGAE, F. and MAYHEW, D.

A possible role for the adenyliclase system in insulin secretion.

J. Clin. Invest. 46: 1724; 1967.

MALAISSSE, W.J., MALAISSSE-LAGAE, F. and WRIGTH, P.H.

A new method for the measurement in vitro of pancreatic insulin secretion.

Endocrinology 80: 99; 1967.

MALAISSSE, W.J. and MALAISSSE-LAGAE, F.

Stimulation of insulin secretion by noncarbohydrate metabolites.

J. Lab. Clin. Med. 72: 438; 1968.

MALAISSSE, W.J. and MALAISSSE-LAGAE, F.

Effects of glycodiazin and glibenclamide upon insulin secretion in vitro.

Europ. J. Pharmacol. 9: 93; 1970.

MALAISSSE-LAGAE, F., GREIDER, M.H., MALAISSSE, W.J. and LACY, P.E.

The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. IV. The effect of vincristine and deuterium oxide on the microtubular system of the pancreatic beta cell.

J. Cell. Biol. 49: 530; 1971.

MALAISSSE-LAGAE, F. and MALAISSSE, W.J.

Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. III. Uptake of ⁴⁵Calcium by isolated islets of Langerhans.

Endocrinology. 88: 72; 1971.

MALAISSSE, W.J.

Role of calcium in insulin secretion.

J. Med. Sci. 8: 244; 1972.

MALAISSSE, W.J.

Insulin secretion multifactorial regulation for a single process of release.

Diabetologia 9: 167; 1973.

MALAISSSE-LAGAE, F., AMBERDT, M., RAVAZZOLA, M., STAUFFCHER, W., ORCI, L. and RENOLD, A.E.

A peculiarity of the beta cell microtubules in spiny mice.

Diabetology. 9: 80(Abst); 1973.

MALAISSSE, W.J. DEVIS, G., HERCHUELZ, A., SENER, A. and SOMERS, G.

Calcium antagonists and islet function.VIII. The effect of magnesium.

Diab. Metab.(Paris) 2: 1; 1976.

MALAISSSE, W.J., DEVIS, G. and SOMERS, G.

Inhibition by verapamil of ionophore-mediated calcium translocation.

Experientia(in press) 1977.

MALAISSSE, W.J., SENER, A., HERCHUELZ, A., HUTTON, F.C., DEVIS, G., SOMERS, G., BLONDEL, B., MALAISSSE-LAGAE, F. and ORCI, L.

Sequential crents in the process of glucose-induced insulin release.

Diabetes ED. J.S. Bajaj. Excerpta Med.Amsterdam 1977.

MARCO, J., MELANI, F., GOBERNA, R., ROTT, W.H. und
PJEIFFER, E.F.

Einfluss der prednisolonbe-handlung auf die insulin sekretion
der ratte.

Diabetologia, 4: 365; 1968.

MATCHINSKY, F.M. and ELLERMAN, J.

Metabolism of glucose in the islets of Langerhans.

J. Biol. Chem. 243: 2730; 1968.

MATSCHINSKY, F.M., ELLERMAN, J.E., KRZANOWSKI, J.,

KOTLER-BRAJTBURG, J., LANDGRAF, R. and FERTEL, R.

The dual function of glucose in islets of Langerhans.

J. Biol. Chem. 246: 1007; 1971.

MATSCHINSKY, F.M.

8th Congress of the International Diabetes Federation.

Workshop on Biophysies and Biochemistry of pancreatic
islets.

Brussels, July, 15: 1973.

MATCHINSKY, F.M. and ALLERMAN, J.

Dissociation of the insulin-releasing and the metabolic
functions of hexoses in islets of Langerhans.

Biochem. Biophys. Res. Commun 50: 183; 1973.

MATTEWS, E.K.

Insulin secretion. First European Symposium on
Hormones and cell Regulation. 57: 1977.

McINTYRE, N., HOLDES WORTH, C.D. and TURNER, D.S.

New interpretation of oral glucose tolerance.
Lancet II 20: 1964.

McINTYRE, N., HOLDS WORTH, C.D. and TURNER, D.S.

Intestinal factors in the control of insulin secretion.
J. Clin. Endocr. 25: 1317; 1965.

MILNER, R.D.G. and HABES, C.N.

The structure and metabolism of the pancreatic islets.
p.489. Ed^S: FALKMER, S. HELLMAN, B., TALJEDAL, I.B.
Pergamon. Press. Oxford. 1970.

MIZEL, S.B. and WILSON.

Nucleoside transport in mammalian cells inhibition by
colchicine.
Biochemistry 11: 2573; 1972.

MONTAGUE, W. and TAYLOR, K.N.

Regulation of insulin secretion by short chain fatty acids.
Nature, 217: 853; 1968.

MONTAGUE, W. and COOK, J.R.

The role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate en the regulation of insulin release by isolated rat islets of Langerhans.

Biochem. J. 122: 115; 1971.

MONTAGUE and HOWELL, S.L.

Advances in cyclic nucleotide research.

(Greemgard, P. and Robinson, G.A. cds).

Vol. 6p. 201: 1975. Raven Press. New York.

MONTAGUE, W., HOWELL, S.L. and GREEN, I.C.

Insulin release and the microtubular system of the islets of Langerhans. Identification and characterization of tubulin-like protein.

Br. Med. J. 148: 237; 1975.

MONTAGUE, W. and HOWELL, S.L.

The mode of action of adenosine 3':5'-cyclic phosphate in the regulation of insulin secretion.

Polypeptide hormones: molecular and cellular aspects.

Ciba Foundation Symposium 41.

Elsevies-Excerpta Med-Noth Holland.

Amsterdam. Oxford. New York.

NIKI, A., NIKI, H., MIWA, I., OKUDA, J.

Insulin secretion by anomers of D-glucose.

Science 186: 150; 1974.

OLMSTED, J.B. and BORISY, G.G.

Microtubules.

Annu. Rev. Biochem. 42: 507; 1973.

ORCI, L., AMHERDT, M., MALAISSE-LAGAE, F., ROUILLER, C.
and RENOLD, A.E.

Insulin release by emiocytosis: Demonstration with
freeze-etching technique.

Science 179: 82; 1973.

ORCI, L., BAETENS, D. and DUBOIS, M.P.

Evidence for the D-cell of the pancreas secreting somatostatin.
Horm. Metab. Res. 7:400; 1975.

ORTIZ, S., ARILLA, E., BEDOYA, F., SOBRINO, F., PINTADO, E.
GOBERNA, R.

Modificaciones de los niveles intracelulares de cAMP en la
célula beta durante el ayuno.

XVII Congreso Nacional Sociedad Española Ciencias
Fisiologicas 028:1978.(abstract).

PAGLIARA, A.S., STILLINGS, S.N., HOVER, B., MARTIN, D.M.
and MATSCHINSKY, F.M.

Glucose modulation of aminoacid induced glucagon and
insulin release in isolated perfused rat pancreas.

J. Clin. Invest. 54: 819; 1974.

PATEL, Y.C., WEIR, G.C., REICHLIN, S.

Anatomic distribution of somatostatin in brain and pancreatic islets as studied by radioimmunoassay.

Endocrinology 96: suppl: 127; 1975.

PFEIFFER, E.F., FRANK, M., FUSSGANGER, R., GOBERNA, R.

HINZ, M. and RAPTIS, S.

Gastrointestinal hormones and islet function.

XVI Nobel Symp. Frontiers in gastrointestinal hormone research. July, 20, 1970.

Editado por Almquist and Wirsell.p.245

Stockolm 1973.

RAVINOVITCH, A., GRILL, V., RENOL, A.E. and CERASI, E.

Insulin release and cyclic AMP accumulation in response to glucose in pancreatic islets of fed and starved rats.

The J. of Clin. Invest. 58: 1209; 1976.

RASMUSSEN, H.

Cell communication calcium ion, and cyclic adenosine monophosphate.

Science 170: 404; 1970.

REBHUM, L.I.

Polarized intracellular particle transport: Saltatory movement and cytoplasmic streaming.

In. Rev. Cytol. 32: 93; 1972.

ROSENERD, A., ZACKROFF, R.V. and WEISENBERG, R.C.

Magnesium stimulation of calcium binding to tubulin and calcium induced depolymerization of microtubules.

Febs. Lett. 65: 144; 1976.

RUBIN, R.P.

The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones.

Pharmacol. Rev. 22: 389; 1970.

SHANABAN, M.F. and CZECH, M.P.

Partial purification of the D-glucose transport system in rat adipocyte plasma membranes.

J. Biol. Chem. 252: 6554; 1977.

SAMS, D.J. and MONTAGUE, W.

The role of adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate in the regulation of insulin release.

Properties of islet-cell adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate phosphodiesterases.

Biochem J. 129: 945; 1972.

SEHLIN, J.

Effects of mannoheptulose on the dynamics of glucose oxidation in the pancreatic beta-cells.

Febs. Lett. 30: 45; 1973.

SELAWRY, H., GURMAN, R., FINK, G. and RECANT, L.

The effect of starvation on tissue adenosine 3'-5' monophosphate levels.

Biochem. Biophys. Res. Commun 51: 198; 1973.

SENER, A., LEVY, J., MALAISSE, W.J.

The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Does glycolysis control calcium transport in the beta-cell?.

Biochem. J. 156: 521; 1976.

SLOBODA, R.D., RUDOLPH, S.A., ROSENBAUM, J.L. and GREENGARD, P.

Cyclic AMP-dependent endogenous phosphorylation of a microtubule associated protein.

Proc. Natl. Acad. Sci. 72: 177; 1975.

SOBRINO, F.

Caracteres bioquímicos de una proteína kinasa dependiente del 3'-5' adenosin monofosfato ciclico.

Niveles plasmáticos y tisulares del 3'-5' AMPc.

Tesis Doctoral. Sevilla 1977.

SOMERS, G., VAN OBERGHEN, E., DEVIS, G., RAVAZZOLA, M., MALAISSE-LAGAE, L. and MALAISSE, W.J.

Dynamics of insulin release and microtubular microfilamentous system. III. Effect of colchicine upon glucose-induced insulin secretion.

Eur. J. Clin. Invest. 4: 229; 1974.

SOMERS, G., DEVIS, G., MALAISSE, W.J.

Analogy between native and exogenous ionophores in the pancreatic beta-cell.

Febs. Lett. 66: 20; 1976.

STRYER, L.

Bioquímica. p. 73.

Editorial Reverté. S.A. Barcelona, Bogotá.

Buenos Aires. Caracas. Mexico. Rio de Janeiro, 1976.

SUSSMAN, K.E., WAUGHAN, G.D. and TIMMER, R.F.

An in vitro method for studying insulin secretion in the perfused isolated rat pancreas.

Metabolism. 15: 466; 1966.

SUSSMAN, K.E. and VAUGHAN, G.P.

Insulin release after ACTH, glucagon and adenosine 3'-5' phosphate (cyclic AMP) in the perfused isolated rat pancreas.

Diabetes. 16: 449; 1967.

TAMARIT, J., GOBERNA, R., TAMARIT-RODRIGUEZ, J., LUCAS, M.,
CEBEIRA, M, and SOBRINO, F.

Inhibitory effects of serotonin (5HT) and lisozyme on glucose induced insulin secretion in the isolated rat pancreas.

Diabetologia 10: 388; 1974.

TAMARIT, F., GOBERNA, R., SOMOLINOS, R., LUCAS, M.,
and PRIETO, J.C.

Inhibiting effect of thyrocalcitonin upon glucose induced
insulin secretion in isolated perfused rat pancreas.

IX Congress of the International Diabetes Federation.

New Delhi, India.

Excerpta Medica 400: 19; 1976.

TAMARIT, J., TAMARIT-RODRIGUEZ, J., GOBERNA, R. and LUCAS, M.

Inhibition of insulin secretion "in vitro" by somatostatin.

Rev. esp. Fisiol. 30: 299; 1974.

TAYLOR, E.W.

The mechanism of colchicine inhibition of mitosis. I.

Kinetics of inhibition and the binding of ³H-colchicine.

J. Cell. Biol. 25: 145;(suppl) 1965.

TOMITA, T., LACY, P.E., MATSCHINSKY, F.M. and Mc Daniel, M.L.

Effect of alloxan on insulin secretion in isolated rat
islets perfused in vitro.

Diabetes 23(6) 517; 1974.

TRIFARO, J.M.

Solubilization and partial characterization of the
phosphorylated component(s) of the membrane of adrenal
chromaffin granules.

Febs. Lett. 23: 237; 1972.

TURTLE, J.R. and KIPMIS, D.M.

An adrenergic receptor mechanism for the control of cyclic 3'-5' adenosine monophosphate synthesis tissues. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28: 797; 1967.

VAN OBBERGHEN, E., SOMERS, G., DEVIS, G., VAUGHAN, G.D., MALAISSE-LAGAE, P., ORCI, L. and MALAISSE, W.J.

Dynamics of insulin release and microtubular-microfilamentous system. I. Effect of cytochalasin B. J. Clin. Invest. 52: 1041; 1973.

WESSELS, N.K., SPOONER, B.S., ASH, J.K., BRADLEY, M.O., LUDUENA, M.A., TAYLOR, E.L., WRENN, J.T. and YAMADA, K.M. Microfilaments in cellular and developmental processes. Science. 171: 135; 1971.

WEATHERBEE, J.A., LUFTIG, R.B. and WEIHING, R.R.

Depletion of microtubule-associated-protein (MAP) content abolishes apecificity of in vitro binding of adenovirus to microtubules.

Feb. Proc. 35: 1428 (Abst); 1976.

YALOW, R.S., BLACK, H., WILLAZON, M. and BERSON, S.A.

Comparison of plasma insulin levels following administration of tobultamide and glucose.

Diabetes. 9: 356; 1960.

ZAWALICH, W.S., KARL, R.C., FERRENDELI, J.A. and
MATSCHINSKY, F.M.

Factors governing glucose induced elevation of cyclic-
3'-5' AMP levels in pancreatic islets.

Diabetologia 11: 231; 1975.