

R. 6465

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

"REGULACION DE LA SECRECION DE LOS ISLOTES DE  
LANGERHANS DURANTE EL AYUNO".

Tesis para aspirar al grado  
de Doctor en Farmacia  
Sevilla Enero de 1980

REGULACION DE LA SECRECION DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS  
DURANTE EL AYUNO.

por

SANTIAGO ORTIZ BLAZQUEZ

El Catedrático Director:

R. Goberna Ortiz

*R. Goberna*

Catedrático-director del  
Departamento de Bioquímica  
de la Facultad de Medicina  
de la Universidad de  
Sevilla.

El Profesor Ponente:

P. Romero Raya

Prof. Agregado de Microbio-  
logía de la Facultad de Far-  
macia de la Universidad de  
Sevilla.

El co-director

J.C. Prieto Villapouca

*J.C. Prieto*



Trabajo presentado como Tesis para optar  
al grado de Doctor en Farmacia

Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia



CATEDRA DE BIOQUIMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
SEVILLA-9

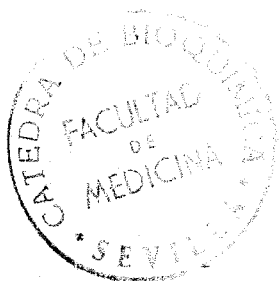
PROF. RAIMUNDO GOBERNA



AVDA. SANCHEZ PIZJUAN, 4  
TELEFS. 87 70 60 - 37 78 70

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

CERTIFICA: Que el trabajo titulado "Regulación de la secreción de los islotes de Langerhans durante el ayuno", realizado por el licenciado Santiago Ortiz Blazquez para optar al grado de Doctor, ha sido llevado a cabo bajo mi dirección y la co-dirección del Dr. Juan Carlos Prieto Villapún.



Sevilla, 15 de Enero de 1980

Prof. Dr. R.Goberna

A mi padre (en memoria) y a mi madre.

A mi mujer Pilar.

A mis hermanos Josefa y Francisco.

## AGRADECIMIENTOS.

Al Prof. Goberna y al Dr. Prieto que por sus enseñanzas, estímulo y colaboración han hecho posible la realización de este trabajo.

Al Dr. Sobrino por su colaboración en este trabajo en los problemas referentes a los nucleótidos cíclicos.

A F. Bedoya por su eficaz ayuda en la realización de la parte experimental.

A mis compañeros de la Cátedra de Bioquímica:

M. Lucas

E. Arilla

E. Pintado

C. Osuna

G. Ruiz

M.T. Herrera

J.M. Guerrero

por su ayuda en todo momento.

A Eduardo Melendez por la ayuda realizada en las representaciones gráficas.

A Mary Carmen que mecanografió todo el trabajo.

INDICE

## 1. INTRODUCCION.

1.1. Hormonas pancreáticas .....	2
1.2. Insulina .....	6
1.2.1. Estructura .....	6
1.2.2. Mecanismo de secreción de insulina ....	6
1.2.2.1. Glucorreceptor .....	9
1.2.2.2. AMPc y secreción de insulina ....	12
1.2.3. Control de la secreción de insulina ...	17
1.2.4. Fisiología de la secreción de insulina.	25
1.2.4.1. Insulina durante el ayuno .....	26
1.2.4.2. Insulina e ingesta alimenticia..	28
1.3. Glucagón .....	30
1.3.1. Estructura .....	30
1.3.2. Mecanismo de secreción de glucagón ....	31
1.3.2.1. Glucosa y secreción de glucagón.	31
1.3.2.2. AMPc y secreción de glucagón .	34
1.3.3. Control de la secreción de glucagón ...	36
1.3.4. Fisiología de la secreción de glucagón.	41
1.3.4.1. Glucagón durante el ayuno ....	42
1.3.4.2. Glucagón e ingesta alimenticia.	44
1.4. Objetivos .....	47

## 2. MATERIAL Y METODOS.

2.1. Animales de experimentación .....	50
2.2. Aislamiento de los islotes de Langerhans .....	50
2.2.1. Recuerdo anatómico del páncreas de rata.	50
2.2.2. Protocolo quirúrgico .....	53
2.2.3. Aislamiento .....	53
2.2.4. Incubación .....	58
2.3. Radioinmunoanálisis de insulina .....	60
2.3.1. Preparación de la insulina standard de marcaje .....	60
2.3.2. Anticuerpos .....	60
2.3.3. Marcaje de insulina .....	63

2.3.4.	Purificación .....	66
2.3.5.	Determinación de la insulina de los islotes .....	69
2.4.	Radioinmunoanálisis de glucagón .....	75
2.4.1.	Preparación del glucagón standard y de marcaje .....	75
2.4.2.	Marcaje de glucagón .....	76
2.4.3.	Purificación .....	78
2.4.4.	Anticuerpos .....	79
2.4.5.	Determinación del glucagón liberado por los islotes .....	81
2.5.	Determinación del AMPc por proteína enlazante en islotes .....	86
2.5.1.	Preparación del AMPc .....	88
2.5.2.	Obtención y purificación de la proteí- na quinasa .....	89
2.5.3.	Aislamiento de proteína inhibidora de la proteína-quinasa .....	95
2.5.4.	Determinación del AMPc en islotes ....	96
2.6.	Determinación de DNA en islotes aislados ...	104
2.6.1.	Material: standard DNA .....	104
2.6.2.	Método .....	105
2.6.3.	Reacción .....	107
2.7.	Diseño experimental .....	108

### 3. RESULTADOS.

3.1.	Contenido de DNA en islotes de Langerhans de ratas alimentadas y de ratas sometidas a ayuno .....	114
3.2.	Secreción de insulina inducida por glucosa en islotes de Langerhans .....	115
3.2.1.	Glucosa (2'75 y 16'7mM) .Controles 4 y 8 días de ayuno .....	115



3.2.2. Glucosa (2'75, 16'7 y 33'4 mM). Contro-	
les y 4 días de ayuno.....	123
3.3. Secreción de glucagón en presencia de glucosa	
en islotes de Langerhans .....	127
3.3.1. Glucosa (2'75 y 16'7 mM). Controles	
4 y 8 días de ayuno .....	127
3.3.2. Glucosa (2'75, 16'7 y 33'4 mM). Controles	
y 8 días de ayuno .....	133
3.4. Efecto de la realimentación con dieta standard	
o con dieta selectiva (glucosa 20% por vía oral)	
sobre la secreción de hormonas pancreáticas en	
islotes de ratas sometidas a ayuno previo .....	137
3.4.1. Secreción de insulina .....	137
3.4.2. Secreción de glucagón .....	150
3.5. Efecto de altas concentraciones de $Ca^{++}$ sobre	
la secreción de hormonas pancreáticas en pre-	
sencia de glucosa. Controles, 4 y 8 días de	
ayuno .....	162
3.5.1. Secreción de insulina .....	162
3.5.2. Secreción de glucagón .....	167
3.6. Importancia del AMPc en los mecanismos de	
secreción de insulina y glucagón en islotes de	
ratas alimentadas y ratas sometidas a ayuno ..	173
3.6.1. Niveles intracelulares de AMPc en islo-	
tes de ratas alimentadas. Modificacio-	
nes durante el ayuno. Efecto de la teo-	
filina y la glucosa .....	173
3.6.2. Efecto de la teofilina sobre la secre-	
ción de insulina en presencia de glu-	
cosa .....	180
3.6.3. Efecto del db-AMPc sobre la secreción	
de insulina en presencia de glucosa ...	197

3.6.4. Efecto del db-AMPC sobre la secreción  
de glucagón en presencia de glucosa ..207

4. <u>DISCUSION</u> .....	217
5. <u>CONCLUSIONES</u> .....	236
6. <u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	240

ABREVIATURAS

ACTH: Hormona adrenocorticotropa.  
A.e.: Actividad específica.  
AMPc: 3'-5' adenosín monofosfato.  
ATP: Adenosín trifosfato.  
BSA: Albúmina sérica bovina.  
DABA: Acido 3-5 diaminobenzoico.  
db-AMPc: Dibutiril AMPc.  
DEAE: Dietilaminoetil.  
EDTA: Etilendiaminotetracetato sódico.  
ESM: Error standard de la media.  
F: Fracción libre.  
FEC: Fluido extracelular.  
GIP: Péptido inhibidor gástrico.  
HGH: Hormona somatotropa humana.  
HPL: Lactógeno placentario humano.  
HSA: Albúmina sérica humana.  
IBMX: Isobutilmetilxantina.  
IRG: Glucaçón inmunoreactivo.  
IRI: Insulina inmunoreactiva.  
KRB: Krebs Ringer bicarbonato.  
L: Fracción ligada.  
NSS: Suero de carnero normal.  
PG: Prostaglandina.  
RIA: Radioinmunoanálisis.

T<sub>3</sub>: Triyodotironina.

T<sub>4</sub>: Tiroxina.

TCA: Acido tricloroacético.

Tris: Trihidroximetilaminometano.

VIP: Péptido intestinal vasoactivo.

16 INTRODUCCION.

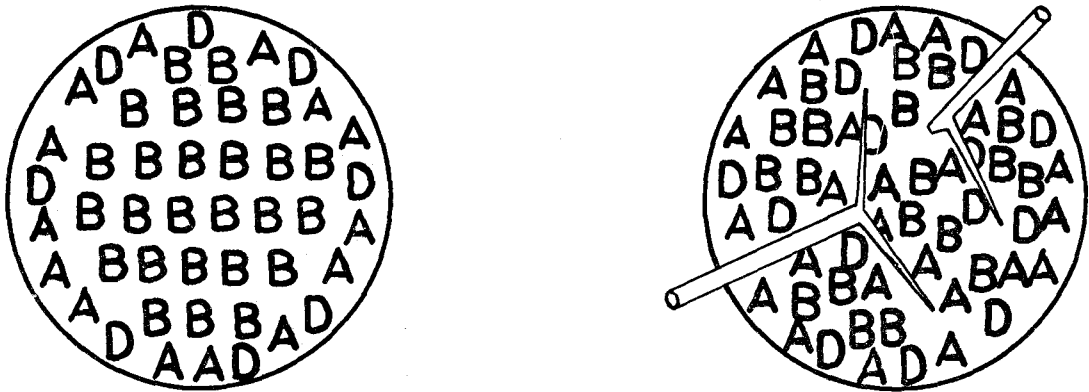
### 1.1. HORMONAS PANCREATICAS.

La regulación de la homeostasis de los nutrientes metabólicos constituye una de las partes más importantes de las funciones fisiológicas, determinando la capacidad de los organismos vivos de sobrevivir en un medio que impone cambios imprevisibles en el aporte y demanda de energía.

Esta importante tarea está a cargo, sobre todo, de los islotes de Langerhans, microórganos pancreáticos que realizan estas funciones a través de la secreción de tres o más polipéptidos. La actividad biológica de dos de éstos, insulina y glucagón, ha sido bien caracterizada. El papel de la somatostatina es objeto de estudio intensivo, mientras que el de otros polipéptidos pancreáticos permanece desconocido.

El islote de Langerhans está constituido por diferentes tipos de células endocrinas que segregan insulina, glucagón, somatostatina y gastrina. El uso de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos de insulina, glucagón y somatostatina ha permitido la localización y distribución de las células productoras de dichas hormonas en el islote. Las células B (beta) contienen insulina; las células A (alfa 2) glucagón y las células D (alfa 1) somatostatina. Estas últimas

constituyen un grupo heterogéneo de células probablemente productoras también de gastrina. Han sido descritos otros tipos de células cuyas características morfológicas y funcionales no están completamente determinadas. (fig. 1)



- B** Células productoras de insulina
- A** Células productoras de glucagón
- D** Células productoras de somatostatina

Fig. 1 (Izquierda). Representación esquemática del número y distribución de células del islote de rata, productoras de insulina, glucagón y somatostatina. La mayor parte de células de glucagón y somatostatina se encuentran en la periferia del islote rodeando las células de insulina, que se encuentran en el centro.

(Derecha). Representación esquemática del número de tipos de células del islote humano. Los vasos, en su penetración en el islote, son acompañados de células productoras de glucagón y somatostatina. El islote se encuentra dividido en pequeños glóbulos, cada uno de los cuales contiene una parte central formada por células productoras de insulina y que está rodeada por células de glucagón y somatostatina.

(Modificado de L. Orci, 1977).



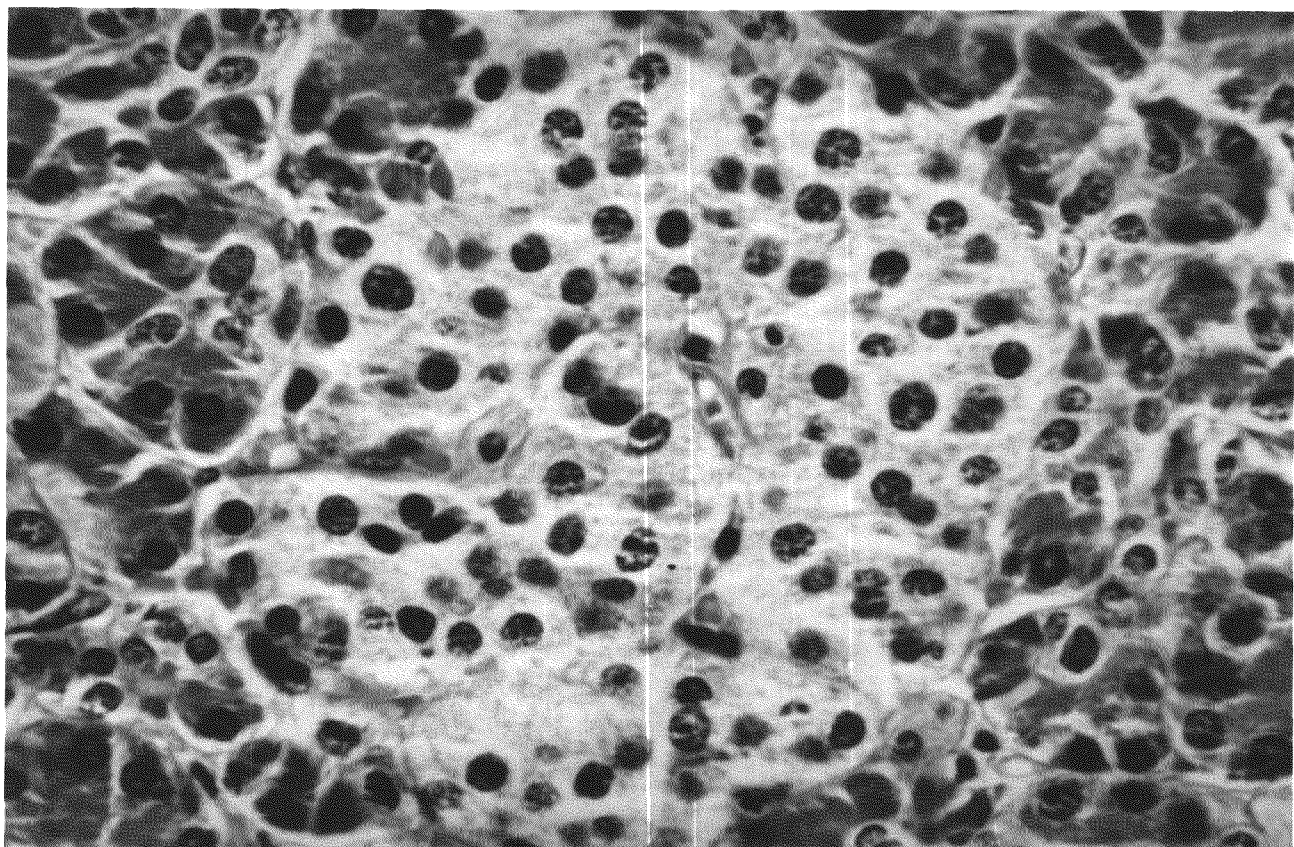


Fig. 2 Islote de Langerhans rodeado por células acinares pancreáticas. Las células constituyentes presentan un núcleo redondo con cromatina granular y están separadas entre sí por escaso tejido conjuntivo que incluye abundantes capilares sanguíneos. Con técnicas especiales, podrían diferenciarse al microscopio óptico distintos tipos celulares, principalmente las células beta secretoras de insulina y alfa, de glucagón. Se han descrito tipos productores de gastrina y somatostatina. (Goberna, 1978)

## 1.2. INSULINA.

### 1.2.1. ESTRUCTURA.

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 (fig. 3).

En su configuración forma hexámero con cationes de  $Zn^{++}$ , agrupándose varias moléculas. En 1970, Steiner y colaboradores, de la Universidad de Chicago, aislaron un presursor de la insulina, el que denominaron proinsulina (fig. 3). 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) y transformándose en la insulina.

### 1.2.2. MECANISMO DE SECRECIÓN DE INSULINA.

A través de numerosos trabajos publicados en las dos últimas décadas se ha planteado el problema de cual es el verdadero responsable fisiológico de la secreción de insulina. Todas las hipótesis coinciden en general

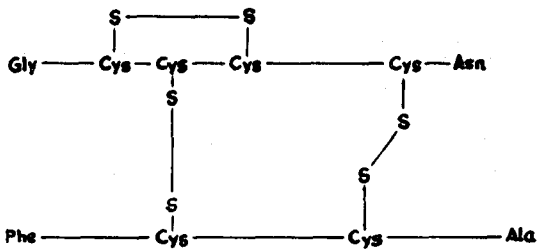
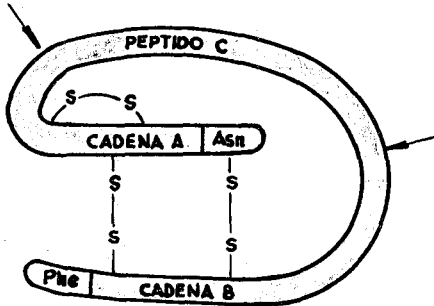


Fig. 3 La molécula de insulina tiene un peso molecular de 5900. En su estructura (abajo) distinguimos dos cadenas. La cadena A comienza con la Gly y termina con Asn y tiene un puente disulfuro intracatenario. La cadena B comienza con la Phe y termina con la Ala. Las dos cadenas están unidas entre si por dos puentes disulfuros. El precursor de la insulina, denominado proinsulina (arriba), tiene un peso molecular de 9000. En presencia de un enzima proteolítico como la tripsina, se rompe la cadena en los lugares indicados por las flechas, liberándose el péptido de conexión (o C) y apareciendo un resto que es la insulina activa. (Goberna, 1978).

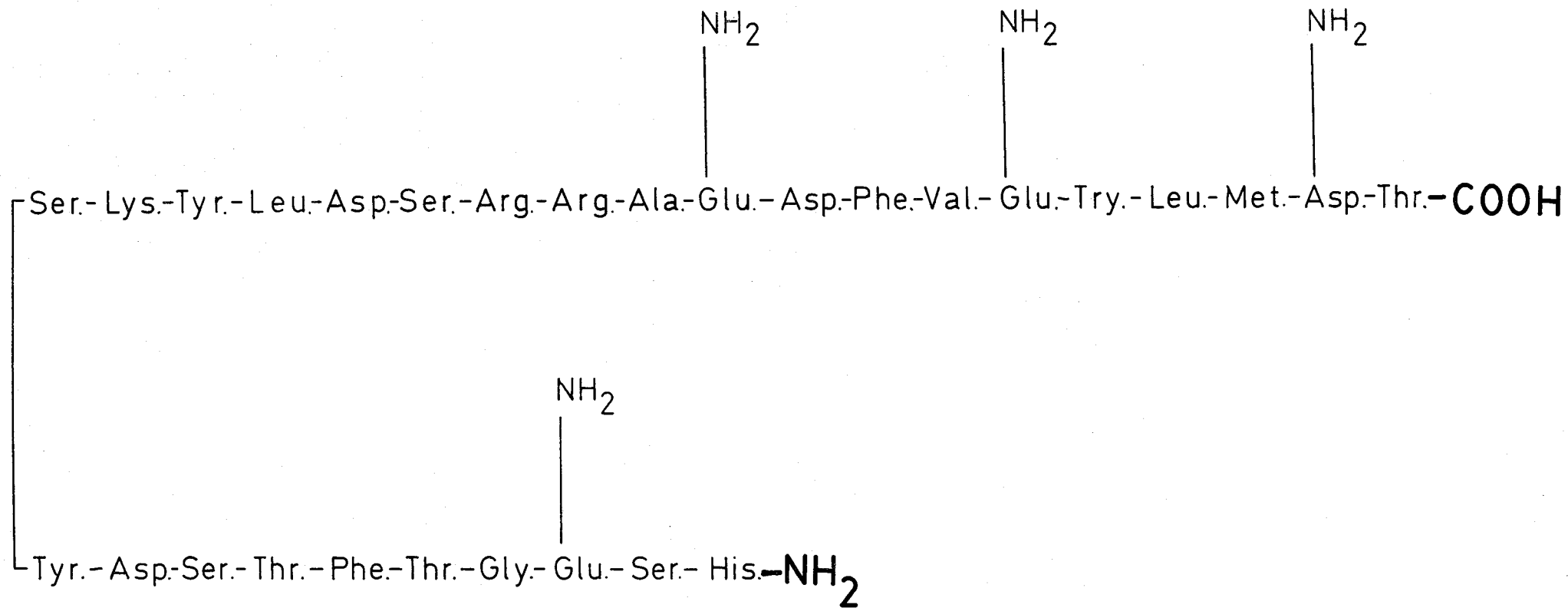


Fig. 4 Estructura primaria del glucagón.

en que es la glucosa el disparador del mecanismo secretorio de esta hormona pancreática; sin embargo, la glucosa podría ser el responsable primario o secundario, en el sentido de que actuaría por unión a un posible glucorreceptor de la membrana de la célula beta iniciando así la secreción de insulina, o bien que ésta se desencadenaría por un metabolito de la propia glucosa. Existen también en la literatura suficientes datos para pensar que la insulinosекреción mediada por glucosa se deba a la activación de un sistema adenilciclase de la membrana de la célula beta, produciéndose así AMPc que actuaría como segundo mensajero activando una serie de etapas desconocidas que darían lugar a la secreción de insulina como efecto final.

#### 1.2.2.1. Glucorreceptor.

En 1970, Cerasi y Luft, sugirieron que la glucosa podría unirse a un receptor (glucosensor) de la membrana de la célula beta como primer paso en la liberación de insulina. Actuarían a continuación otros dos componentes: un sistema de acoplamiento que proporcionaría una relación entre los mecanismos sensitivos y los de descarga, y el aparato para la liberación de insulina.

La secreción de insulina es estimulada preferentemente por el anómero alfa de la glucosa. En cambio los islotes

de Langerhans, como otros tejidos, parecen metabolizar con preferencia el anómero beta, que por otra parte, posee un menor poder insulinogénico, lo que apoya la hipótesis del glucorreceptor, sugiriendo que la célula beta ha desarrollado la propiedad particular de reconocer el anómero alfa como desencadenante del mensaje insulinogénico.

En la respuesta de la célula beta a la glucosa pueden observarse dos fases: una descarga inicial de insulina y una etapa tardía de síntesis y nueva secreción. Podría pensarse que solo la etapa inicial se debería a la actuación del glucosensor, mientras que la tardía estaría influenciada por los metabolitos de la glucosa en la célula beta.

Sin embargo, si se estudian las cinéticas de dosis-respuesta de ambas fases insulinosecretoras, puede comprobarse que la  $K_m$  para estas dos funciones son análogas en el hombre y en toda una serie de modelos experimentales, mientras que la capacidad ( $V_{max}$ ) de la respuesta tardía es en la mayoría de los casos posiblemente mayor. Por tanto, la afinidad de los mecanismos implicados en la secreción de insulina es constante, lo que obliga a pensar en una sola unidad de reconocimiento (glucosensor). No puede descartarse a pesar de todo, de que el metabolismo de la glucosa en la célula beta pueda ser determi-

nante para la modulación de la respuesta insulínica, en particular en su fase más tardía, como indican Cerasi y Luft (1970).

La hipótesis de que la fase tardía de la secreción de insulina se deba a metabolitos de la glucosa en la célula beta se basa principalmente en el hecho de que la manohexulosa, además de inhibir competitivamente la acción de la hexoquinasa y, de este modo, la fosforilación de la glucosa a glucosa 6-fosfato y por tanto su metabolización, es también capaz de inhibir simultáneamente la secreción de insulina mediada por glucosa (Coore y Randle, 1963).

Se han propuesto como metabolitos intermediarios responsables de la secreción de insulina la glucosa 6-fosfato, ácido 6-fosfogluconico y ácido difosfogluconico, aunque se han planteado serias dudas al respecto, especialmente a partir de los trabajos de Matschinsky et al (1971) demostrando que la glucosa por sí sola es capaz de provocar la secreción de insulina antes de que sufra alteraciones metabólicas. Este hecho apoya la hipótesis de que la secreción de insulina tenga lugar al combinarse la glucosa con un receptor específico (glucorreceptor) de la célula beta.

Este glucorreceptor, aún sin caracterizar con certeza (parece ser una glucoproteína) posee una elevada especificidad para la glucosa o azúcares muy similares

estructuralmente. Así Grodsky et al (1963), han observado que la glucosa y manosa son los estimuladores más potentes de la secreción de insulina, mientras que la fructosa no tiene ningún efecto. Una pequeña modificación estructural es capaz de ser detectada por el glucorreceptor, y así, la glucosa 1-fosfato y la glucosa 6-fosfato no provocan secreción de insulina "in vitro" (Tamarit-Rodriguez et al, 1974).

El hecho de que azúcares como la fructosa no produzcan secreción de insulina, aunque son metabolizables por la célula beta, apoya también la hipótesis de un receptor específico (Ashcroft et al, 1972).

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

#### 1.2.2.2. AMPC y secreción de insulina.

Existen una serie de datos experimentales apoyando la importancia del AMPC en la secreción de insulina inducida por glucosa, aunque no puede aún plantearse una afirmación concluyente (Malaisse et al 1967b; Turtle y Kipnis, 1967; Lambert et al 1971). De hecho, diversos agentes capaces de incrementar el contenido de AMPC en el



islote son a la vez estimuladores de la insulinos secreción, aunque verdaderamente no se conoce con certeza cual sería la posición del nucleótido cíclico en la transmisión del impulso desde la glucosa hasta la etapa final responsable de la liberación de insulina. Así, Turtle y Kipnis (1967), han observado que la teofilina, potente inhibidor de la fosfodiesterasa del AMPc, aumenta la concentración de este nucleótido en el islote, estimulando a la vez la secreción de insulina en presencia de glucosa.

Se han estudiado diversos azúcares como estimuladores de la acumulación de AMPc insular, observándose que la glucosa es el más potente estimulador del AMPc, aunque en este punto los resultados obtenidos por los diferentes autores son contradictorios. Por ejemplo, Hellman et al (1974) trabajando en islotes aislados de ratón incubados con concentraciones de glucosa que estimulaban la liberación de insulina no pudieron demostrar modificaciones significativas en el contenido celular de AMPc. Grill y Cerasi (1974), en islotes aislados de rata, observaron un aumento rápido del contenido de AMPc en presencia de glucosa, mientras que Davis y Lazarus (1972); Howell y Montague (1973); Kuo et al (1973) no encontraron ningún efecto de la glucosa sobre el contenido insular de AMPc.

Malaisse et al (1967c) y Selawry et al (1973) demostraron que en el ayuno prolongado, condición en la que la célula beta pierde la capacidad de ser estimulada por la glucosa (Goberna, 1978; Goberna et al 1978b; Arilla, 1979), disminuyen los niveles de AMPc.

Capito y Hedeskov (1974) han observado modificaciones de los niveles basales de AMPc en islotes pancreáticos de animales ayunados y alimentados. Sin embargo, los primeros habían perdido la capacidad de aumentar los niveles de AMPc en respuesta a la glucosa, al contrario de lo que sucede en los animales alimentados.

Grill y Cerasi (1975), han estudiado también el poder de otros azúcares como la D-manosa sobre la acumulación de AMPc insular, y demostraron que ésta es capaz de estimularla aunque con una eficacia menor que la de la glucosa, presentando una concentración umbral más elevada.

Los carbohidratos pueden actuar de forma sinérgica sobre la acumulación del AMPc insular, como puede comprobarse con la utilización simultánea de D-glucosa y D-galactosa. La D-galactosa carece de poder estimulante pero actúa sinérgicamente con la D-glucosa potenciando su efecto, aunque se requieren elevadas concentraciones de aquélla (Jarret y Keen, 1968).

La acción de la glucosa sobre los niveles de AMPc en

el islote, puede explicarse por diversos mecanismos (Sams y Montague, 1972; Howell y Montague, 1973):

a) estimulación directa de la adenilciclasa; b) aumento de un "pool" específico de ATP que serviría de sustrato para la ciclasa; c) inhibición de la fosfodiesterasa.

Ninguna de estas posibilidades se ha demostrado como válida y, de la misma manera, no se sabe si la glucosa necesita ser metabolizada previamente por los islotes a fin de estimular el sistema adenilciclasa o bien si esta acción se transmite directamente por el glucorreceptor.

Según Grill y Cerasi (1975), 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 de AMPc. También es posible que estos azúcares actúen sobre los receptores de la membrana de la célula beta.

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 experiencias en las que el AMPc insular está elevado en ausencia de glucosa como ocurre en presencia de inhibidores de la fosfodiesterasa o estimulantes de la adenilciclasa tales como la toxina colérica (Hellman et al 1974; Cerasi, 1975; Charles et al 1975). En tales condiciones, aunque la concentración de AMPc insular puede estar tan elevada como en el caso de

incubaciones con glucosa 27'7 mM, la secreción de insulina resulta poco estimulada. Parece pues que la presencia de glucosa sea necesaria para proporcionar las condiciones óptimas para la liberación de insulina. Si se aumenta la concentración de glucosa en presencia de toxina colérica, se observa que el aumento de AMPc es aun mayor (Cerasi, 1975). Esta respuesta suplementaria del AMPc en presencia de toxina colérica o de concentraciones altas de isobutil-metil-xantina (IBMX) o de teofilina muestra una buena correlación con la liberación de insulina (Cerasi, 1975). Podría ocurrir que el AMPc de los islotes se halle distribuido en diferentes compartimentos y que únicamente el que es estimulado por la glucosa accede a los mecanismos de liberación de insulina. Otros hechos que sugieren una distribución de este tipo son: a) el ayuno bloquea la respuesta del AMPc insular a la glucosa (Rabinovitch et al 1978); b) en islotes de hamster diabético se observa una respuesta deficitaria del AMPc a la glucosa (Rabinovitch et al 1978) pero, en cambio, puede aumentarse notablemente el contenido de AMPc de los islotes con IBMX mientras que en c) las catecolaminas son capaces de suprimir totalmente la respuesta del AMPc insular a la glucosa pero no pueden modular la respuesta del nucleótido a IBMX o a la toxina colérica (Rabinovitch et al 1978).

Estas observaciones demuestran que las respuestas del AMPc a la glucosa, por un lado, y a otros agentes estimulantes, por otro, tienen quizás diferentes motivaciones, lo que hace pensar que existan en el islotes varios compartimentos de adenilciclasa/AMPc (Cerasi y Grill, 1978). Es evidente, sin embargo, la necesidad de profundizar aún más en el conocimiento del papel del AMPc en los mecanismos responsables de la secreción de insulina.

### 1.2.3. CONTROL DE LA SECRECIÓN DE INSULINA.

Varias son las sustancias que influyen sobre la secreción de insulina; además del papel de los nucleótidos cíclicos, ya aludidos, vamos a considerar los siguientes: glúcidos, aminoácidos, ácidos grasos y cuerpos cetónicos, hormonas y factores de origen nervioso.

a) Glúcidos. Se han utilizado diversas técnicas para estudiar la acción de la glucosa y análogos estructurales sobre el páncreas endocrino: "in vivo" sobre el organismo intacto (Cerasi y Luft, 1967; Porte y Pupo, 1969) o "in vitro" con páncreas aislado y perfundido (Sussman et al, 1966), fragmentos de páncreas (Malaisse et al, 1967) o islotes aislados (Lacy y Kostianovsky, 1967).

Las hexosas y sus derivados desencadenan la secreción de insulina de dos formas diferentes: independientemente o con la presencia simultánea de uno o varios efectores. En el grupo primero figuran la glucosa y manosa (Goberna et al, 1979; Arilla et al 1979), entre otros y en el segundo galactosa y fructosa, carbohidratos que precisan de la presencia de bajos niveles de glucosa para provocar una respuesta secretora.

La glucosa 1-fosfato y glucosa 6-fosfato por si solas no producen secreción de insulina "in vitro" (Tamarit-Rodríguez et al, 1974); sin embargo, se han propuesto la glucosa 6-fosfato, ácido 6-fosfogluconico y ácido difosfoglicérico como metabolitos intermedios responsables de la secreción de insulina (Matschinsky et al 1971) mientras que la manoseptulosa es capaz de inhibir la secreción de insulina mediada por glucosa, además de inhibir el metabolismo de esta hexosa en muchos tejidos bloqueando su fosforilación a glucosa 6-fosfato (Coore y Randle, 1964).

b) Aminoácidos. Los aminoácidos estimulan tanto la secreción de insulina como la de glucagón si bien son, en general, más efectivos sobre esta última hormona. La capacidad de secreción de insulina de cada aminoácido varía según la especie; en el hombre el más potente es la arginina, seguido de lisina y leucina (Fajans y Floyd, 1972).

Los aminoácidos no metabolizables derivados de la leucina y arginina estimulan la secreción de insulina, sugiriendo quizás que el modo de actuación de los aminoácidos en este proceso sea por fijación a un receptor específico de la membrana de la célula beta (Fajans et al 1974). Así Pagliara et al (1974) sugieren la existencia de glucorreceptores y receptores de aminoácidos comunes tanto a la célula beta como a la alfa. En la fig. ( 5 ) correspondiente a Pagliara et al, 1974 , se muestran los hipotéticos lugares receptores para aminoácidos como una hendidura presente en la superficie celular. El glucorreceptor está representado por el círculo central. La molécula de glucosa la representamos por la abreviatura G. Los aminoácidos aparecen como triángulos negros. La glucosa al ponerse en contacto con la célula beta y ocupar el glucorreceptor induce un cambio conformacional en el receptor del aminoácido aumentando así su afinidad por el aminoácido correspondiente, que se uniría a su receptor y de este modo se incrementaría la liberación de insulina. Sin embargo en la célula alfa, la ocupación del glucorreceptor, disminuye drásticamente la afinidad de los receptores de aminoácidos.

La arginina se comporta como un potenciador de la acción insulinosecretora de la glucosa, dando lugar a una liberación mayor que la obtenida con glucosa sola (Hellerstrom et al 1970; Hellman et al 1971; Gerich et al 1974a).

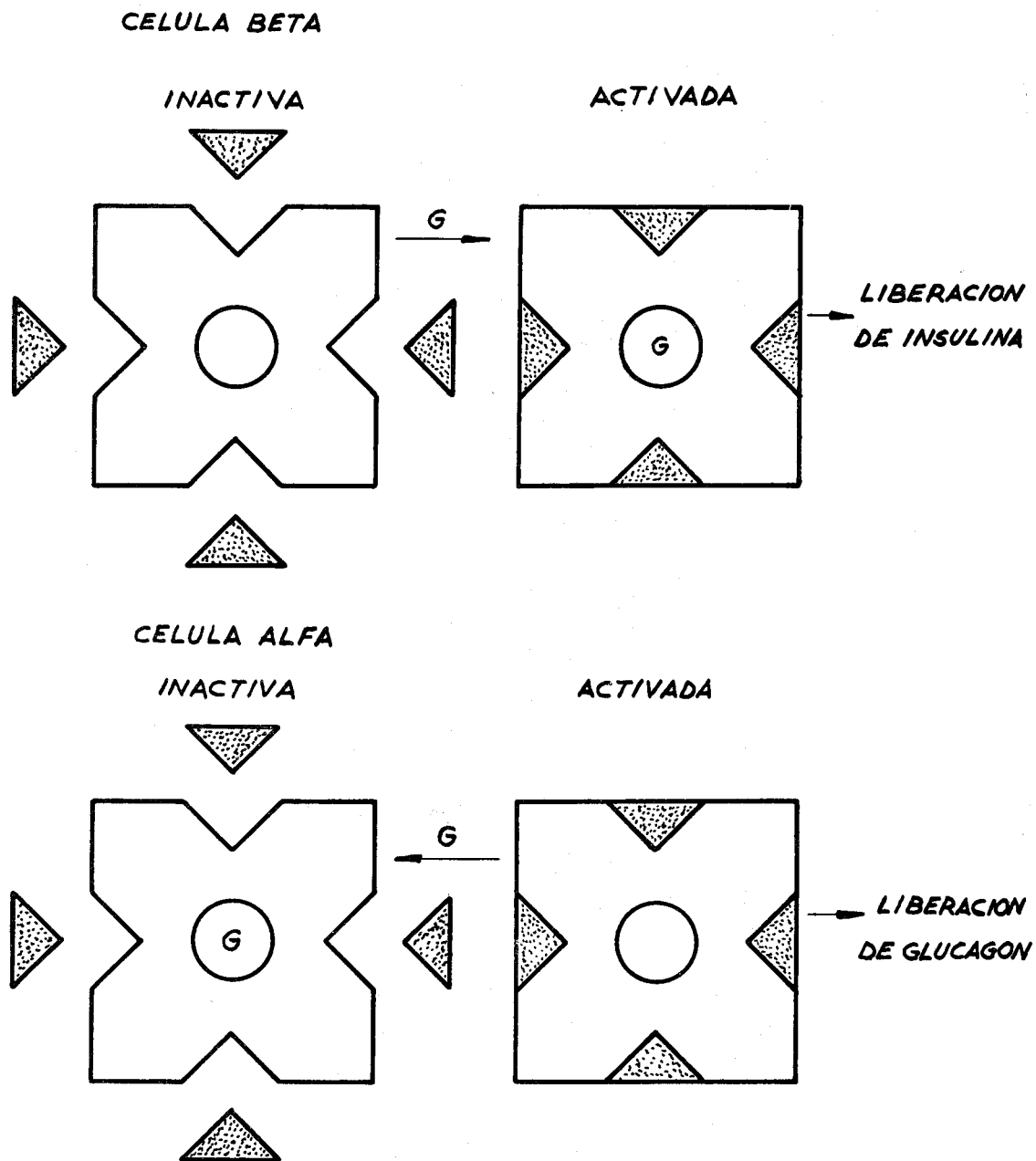


Fig.5 Hipotéticos receptores de aminoácidos en el islote. Activación por glucosa en la célula beta (arriba). Inhibición por glucosa en la célula alfa (abajo). (Modificado de Pagliara et al. 1974).



c) Acidos grasos y cuerpos cetónicos. Los tejidos y sus derivados son capaces de modificar la capacidad insulinosecretora de la célula beta aunque la magnitud del efecto varía según las especies y las condiciones experimentales.

"In vitro", los ácidos grasos libres de cadena corta (propionato, butirato, pentanoato y octanoato) o larga (palmitato y oleato) y los cuerpos cetónicos estimulan la secreción de insulina en presencia de concentraciones basales de glucosa (Hawkins et al 1971; Goberna et al 1973; Goberna et al 1974). Sin embargo "in vivo" los cuerpos cetónicos estimulan la secreción de insulina en ratas y perros (Madison et al 1964; Balasse et al 1967), pero en otras especies como en el hombre los resultados son contradictorios (Balasse y Ooms, 1968).

El papel de estos metabolitos en la regulación fisiológica de la secreción de insulina requiere nuevos estudios, proponiéndose que puedan ser importantes durante el ayuno prolongado para asegurar una liberación suficiente de insulina y así prevenir la cetoacidosis (Shah y Cerchio, 1973).

d) Hormonas y derivados. Existen un gran número de hormonas que intervienen en la regulación de la secreción de la insulina, bien por un mecanismo directo o indirecto.

Es bien conocido el efecto directo de la somatostatina sobre la secreción de insulina "in vitro", observándose un efecto inhibitor sobre la secreción de esta hormona (Curry y Bennett, 1974; Tamarit et al 1974; Osorio et al 1976). El mecanismo de actuación de la somatostatina permanece oscuro, especialmente después de los trabajos de Luft et al (1974), Dubois, (1975) que mediante inmunofluorescencia y radioinmunoanálisis ponen de manifiesto la presencia de somatostatina dentro de los islotes pancreáticos sugiriendo que este péptido puede actuar como un regulador local.

La hormona adenocorticotropa (ACTH) estimula la adenilciclase de los islotes de Langerhans (Kuo et al 1973).

El lactógeno placentario (HPL), que posee una estructura similar a la hormona de crecimiento (HGH) en el 85% de su secuencia aminoacídica y actúa como sustitutoria de esta hormona hipofisaria durante el embarazo (Prieto et al 1976) potencia la secreción de insulina mediada por glucosa (Laube et al 1971). Parece probable su participación en el progresivo deterioro de la tolerancia a los hidratos de carbono durante la gestación.

Las hormonas tiroideas  $T_3$  y  $T_4$  no tienen ningún efecto, si bien se encuentran alteraciones de tipo diabetogénico en casos de hiper e hipotiroidismo (Malaisse et al 1967a).

Varias hormonas gastrointestinales se comportan como

insulinosecretoras. La gastrina, secretina y pancreozimina, estimulan la liberación de insulina tanto "in vitro" en presencia de glucosa (Grotsky, 1970; Goberna et al 1971; Iversen, 1971; Goberna, 1972), como "in vivo" (Dupre et al 1969; Rehfeld y Stadil, 1973). La pancreozimina es la de acción más potente y estimula tanto la secreción de insulina como la de glucagón (Fussganger et al 1969).

Son conocidas las alteraciones de la secreción de insulina durante el embarazo (Malaisse et al 1969; Costrini y Kalkoff, 1971), ciclo menstrual (Bailey y Matty, 1972) y tratamiento con anticonceptivos orales (Goberna et al 1971). Los estrógenos y la progesterona no influyen directamente sobre los islotes pancreáticos "in vitro" (Costrini y Kalkoff, 1971) pero la administración durante un largo periodo "in vivo" incrementa la secreción de insulina y el tamaño de la célula beta (Goberna et al 1972).

Los glucocorticoides no tienen un efecto directo sobre los islotes de Langerhans "in vitro", pero un tratamiento prolongado con estas hormonas tiene como resultado una elevación en los niveles de insulina y glucagón (Marco et al 1968; Wise et al 1973).

La serotonina disminuye la secreción de insulina en respuesta a la glucosa en el hamster (Quickel et al 1971) y su efecto depende de la especie. Así, incrementa

la insulinosecreción o no tiene efecto en rata, perro y hombre (Federspiel et al 1974; Seino et al 1975).

Las prostaglandinas también tienen efecto sobre la secreción de insulina. La  $PGE_1$ ,  $PGE_2$  y  $PGE_{2\alpha}$  aumentan la secreción de insulina en respuesta a la glucosa "in vitro" en la rata (Johnson et al 1973). Se desconoce si su mecanismo de secreción es directo, a través de la liberación de AMPc, o indirecto a través de la secreción de catecolaminas.

e) Factores de origen nervioso. El sistema nervioso simpático y parasimpático también interviene en la regulación de la función de la célula beta. Existen terminaciones adrenérgicas y colinérgicas alrededor del islote de langerhans.

La adrenalina inhibe la secreción de insulina inducida por glucosa (Coore y Randle, 1964; Karam et al 1966). La respuesta de la insulina a la administración de glucagón, teofilina, db-AMPc, tolbutamida y otras sustancias es también inhibido por la adrenalina. La noradrenalina, neurotransmisor adrenérgico, tiene un efecto similar sobre la secreción de insulina (Iversen, 1973a)

La acetilcolina, aumenta la secreción de insulina (Malaisse et al 1967d) "in vitro". Estos mismos

efectos aparecen por acción de la muscarina (Sharp et al 1974) y son anulados por la atropina, un antagonista colinérgico (Malaisse et al 1967d). Estos efectos son aumentados por la eserina, un inhibidor de la colinesterasa (Malaisse et al 1967d).

#### 1.2.4. FISIOLOGIA DE LA SECRECION DE INSULINA.

Tanto los carbohidratos como las grasas y proteínas de la dieta intervienen en la secreción de insulina. Después de una noche de ayuno, los niveles de insulina circulante en plasma son el orden de  $10 \mu\text{U/ml}$ . La cantidad aproximada de glucosa utilizada por día por un hombre adulto normal, es de 150 g por el cerebro, 50 g de las células sanguíneas y 50 g por músculo y otros tejidos (Felig, 1973) mientras que una pequeña cantidad es utilizada por el sistema nervioso periférico y la médula. Los niveles plasmáticos de glucosa son cuidadosamente mantenidos dentro de un estrecho intervalo de concentración (aprox. 60-100 mg/100ml). Hay muchos factores implicados en la regulación de metabolismo, incluidos ciertas hormonas y el sistema nervioso autónomo. La insulina es la hormona más importante involucrada en el almacenamiento de nutrientes, mientras que el glucagón, catecolaminas, glucocorticoides y hormona de crecimiento son las principales hormonas que utilizan

la energía almacenada.

#### 1.2.4.1. Insulina durante el ayuno.

Durante las primeras horas del ayuno, el abundante glucógeno hepático protege a la sangre de la disminución de la concentración de glucosa. Después de una noche, el glucógeno hepático está alrededor del 1% (10 a 15g totales). Sin embargo los niveles de glucógeno hepático durante el periodo de alimentación son alrededor del 4% (total aproximado de 50 a 60 g).

Durante el ayuno hay una interacción hormonal y nerviosa que regula el grado de gluconeogénesis al mínimo necesario para proveer de glucosa al sistema nervioso central. Por algún tiempo la lipólisis está regulada, tal como en otros tejidos humanos, debiéndose a ella la mayoría de los requerimientos energéticos de ácidos grasos libres. La insulina es liberada en pequeñas cantidades durante el ayuno y sirve como el mejor freno sobre las rutas catabólicas en hígado de tejido adiposo (Cahill et al 1966).

Aunque la provisión de glucógeno hepático es pequeña, continúa el aprovisionamiento de glucosa al cerebro, requiriendo algún fracaso protéico para tener sustrato para la gluconeogénesis. Este proceso es estimulado

por la secreción de glucagón durante el ayuno en combinación con varias hormonas. La excesiva utilización de glucosa y aún de proteínas por tejidos capaces de derivar la energía desde los lípidos puede ser perjudicial para la economía corporal durante el ayuno prolongado. Varios mecanismos se combinan para prevenir la utilización innecesaria de glucosa por los tejidos periféricos. Así, la hormona de crecimiento y el cortisol limitan la sensibilidad de células periféricas a la acción de la insulina, de modo que los niveles bajos de esta hormona pancreática durante el ayuno no estimulan la utilización de glucosa.

El estímulo para la regulación de la secreción de insulina en el ayuno pueden implicar a los productos de la lipólisis, niveles de aminoácidos, influencias nerviosas y otros factores respecto a la concentración de glucosa durante el ayuno (Goodner y Porte, 1972).

El aumento de la glucosa plasmática sobre los niveles observados durante el ayuno estimula la secreción de insulina. Es conocido el papel del sistema nervioso simpático elevando el nivel de la glucosa sanguínea durante un "stress" emocional. Cuando la glucosa plasmática desciende por debajo de 50 mg/100 ml (o desciende muy rápidamente incluso a altas concentraciones), los centros de la médula espinal cervical y del cerebro e

hipotálamo responden por estimulación del sistema nervioso simpático dando los síntomas característicos de la hipoglucemia.

En ausencia de insulina la utilización de glucosa es muy lenta lo que se demuestra por el gran retraso en la desaparición de la glucosa en sangre tras una sobrecarga y un aumento de la glucosuria.

#### 1.2.4.2. Insulina e ingesta alimenticia.

La relación entre la cantidad relativa de carbohidratos en la dieta y la tolerancia a la glucosa permanece incompletamente comprendida. Brunzell et al (1971), indican una disminución de la respuesta glucémica correspondiente a una prueba de glucosa oral después de ingestión de una dieta rica en carbohidratos, mientras que Reaven y Olefsky (1974) describen altas concentraciones de glucosa e insulina en sangre después de una dieta similar. Aunque las poblaciones y diseños varían entre ambos estudios, los datos no permiten una respuesta a estas hipótesis.

Está bien demostrado que la fructosa tiene menor efecto insulinogénico que la glucosa (Behall et al 1976). Mann y Truswell (1972), demuestran la disminución de la concentración de insulina en plasma cuando la sacarosa es sustituida por almidón. Esto es indirectamente



opuesto a la conclusión alcanzada por Crapo et al (1976) que encuentran una alta concentración de insulina después de una ingestión oral de sacarosa.

En resumen puede indicarse que no hay un acuerdo unánime en cuanto a la respuesta de la célula beta a la cantidad y calidad de los carbohidratos de la dieta.

### 1.3. GLUCAGON.

#### 1.3.1. ESTRUCTURA.

El glucagón es un polipéptido constituido por 29 aminoácidos de peso molecular 3.855. Su estructura primaria parece ser idéntica en todos los mamíferos, con excepción del cobaya, y presenta algunas variaciones en aves y peces. (fig. 4)

En solución acuosa concentrada y también en presencia de micelas lipídicas tienen lugar interacciones hidrofóbicas de las cadenas laterales de los aminoácidos apolares dando lugar a una conformación en hélice. Esta es la forma en que el glucagón es almacenado en los gránulos alfa y parece ser necesario para la unión específica a los receptores de membrana en las célula diana. Para la actividad biológica es necesaria la estructura íntegra del glucagón. La hidrólisis del aminoácido aminoterminal (histidina) da lugar a una pérdida de la actividad biológica aunque conserva la capacidad de unión a receptores de membrana. Se ha sugerido que la unión al receptor tiene lugar mediante interacciones hidrofóbicas y que se induce una conformación helicoidal estabilizada por el receptor. Esta conformación reordena regiones hidrofóbicas que pueden reaccionar con las posiciones complementarias del receptor.

Por su parte, el aminoácido carboxiterminal es necesario como determinante para la producción de anticuerpos específicos para glucagón pancreático.

### 1.3.2. MECANISMO DE SECRECIÓN DE GLUCAGÓN.

La secreción del glucagón está precedida por la síntesis de proglucagón y conversión de éste en glucagón que es almacenado en gránulos en la célula alfa. Estos están compuestos por glucagón trímero, que a menudo tiene una estructura cristalina y son segregados por exocitosis. Las células A (secretoras de glucagón) contienen diversas deshidrogenasas que metabolizan una gran cantidad de sustancias. Sin embargo, la secreción de glucagón es continua y se acelera cuando estos procesos son inhibidos por falta de sustratos o por bloqueadores metabólicos. Quizás la energía es requerida no para la secreción de glucagón sino para impedir su transporte "en declive", desde un compartimento de alta concentración en la célula A a otro compartimento de baja concentración en el líquido celular (Foa, 1977).

#### 1.3.2.1. Glucosa y secreción de glucagón.

La oposición biológica entre las acciones de insulina y

glucagón dota a la unidad célula alfa/célula beta, de una gran capacidad para cambiar el flujo de la glucosa de una manera fisiológicamente apropiada, manteniendo la concentración extracelular del carbohidrato dentro de unos límites estrechamente regulados. Este concepto se esquematiza en la figura n°6.

Este crítico balance parece ser en gran parte el resultado de una marcada variación en la relación de concentraciones plasmáticas de insulina y glucagón. Durante un ejercicio violento, por ejemplo, el requerimiento de glucosa por parte del músculo está marcadamente incrementado. La hipoglucemia, en este caso, está prevenida por un incremento proporcional en la nueva entrada de glucosa al torrente circulatorio, en parte por un marcado incremento del glucagón plasmático, manteniéndose a la vez una entrada suficiente de glucosa en el sistema nervioso central. Recíprocamente durante una comida, cuando existe una entrada de glucosa exógena incrementada, aumenta la captación del carbohidrato por el hígado para prevenir la hiperglucemia, a través de un aumento en la secreción de insulina. La glucosa que sale del torrente circulatorio es frecuentemente similar a la que entra, por lo que la concentración de glucosa plasmática casi nunca excede de 150 mg/100 ml en sujetos jóvenes normales después de una comida rica en carbohidratos. Cuando existe un grave "stress" sostenido,

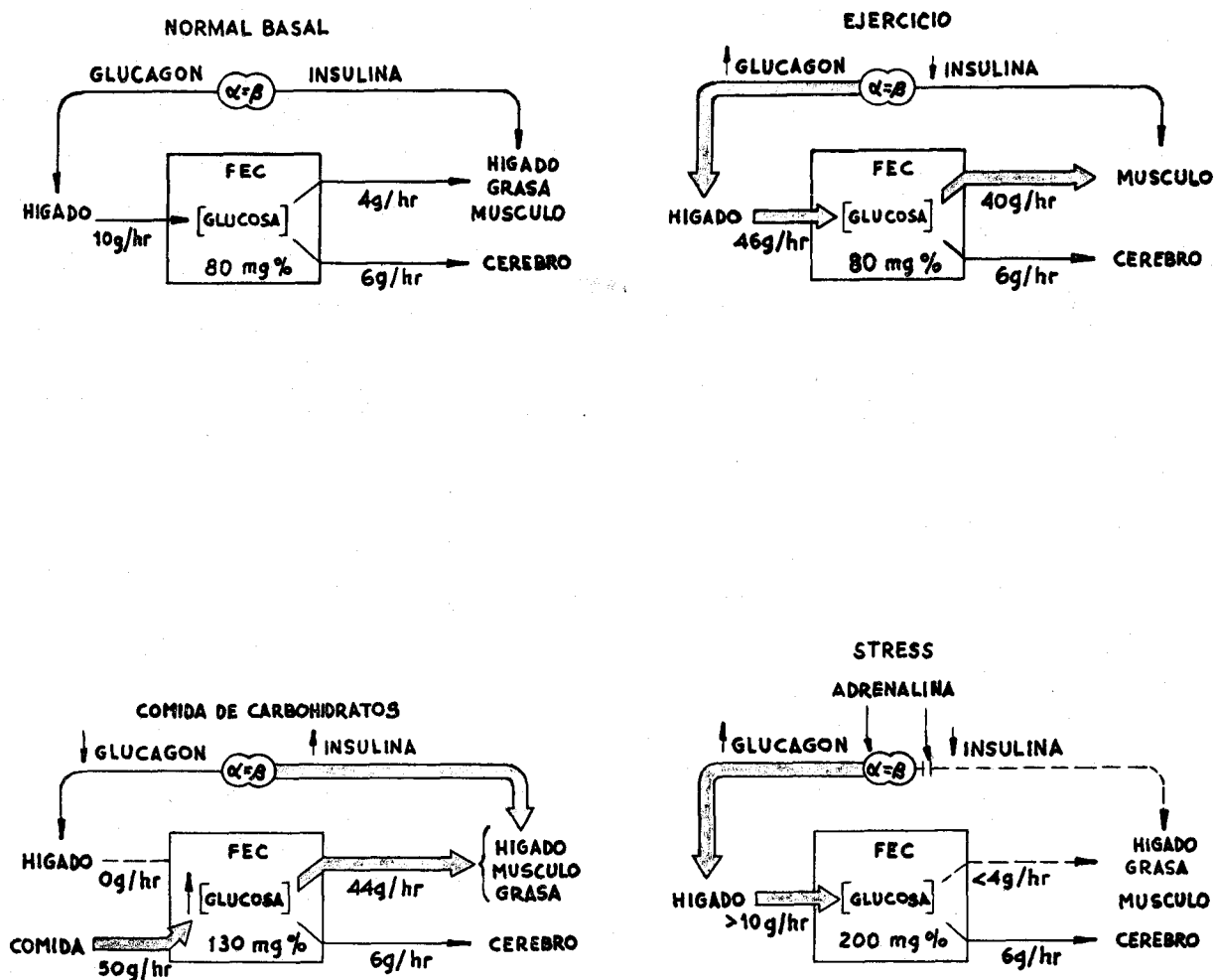


Fig. 6 Acoplamiento entre las células alfa y beta en la regulación de la utilización de la glucosa durante: estado basal, ejercicio intenso, ingesta de glucosa y "stress".  
 FEC = fluido extracelular.  
 (Modificado de Unger, 1976).

es preciso incrementar la glucosa en los líquidos extracelulares rápidamente con el propósito de mantener el aporte continuo de glucosa al cerebro. Para conseguir esta hiperglucemia provocada por el "stress", la secreción de insulina baja y aumenta la del glucagón, probablemente por una disminución del control adrenérgico sobre los islotes, como demuestran los trabajos de Porte et al (1966) y Frohman y Bernardis (1971), que indican que la hiperglucemia en el "stress" continúa tanto tiempo como persista la amenaza sobre el aporte energético al cerebro.

#### 1.3.2.2. AMPC y secreción de glucagón.

Es un hecho bien aceptado que los niveles de AMPC en las células endocrinas juegan un importante papel en la regulación de la secreción hormonal (Montague y Howell, 1975).

La implicación del AMPC en la secreción de glucagón por la célula pancreática A no está completamente demostrada. Se ha observado que el db-AMPC estimula la secreción de glucagón en islotes pancreáticos aislados de rata (Rosselin et al 1973) o de cobaya (Howell et al 1974). Sin embargo, ha sido demostrado que el AMPC inhibe la secreción de glucagón en cultivos celulares pancreáticos (Wollheim et al 1973).

La teofilina, que actúa a través de un incremento en la concentración intracelular de AMPc por inhibición de la fosfodiesterasa, estimula la secreción de glucagón en islotes de ratón (Chesney y Schofield, 1969), rata (Leclercq-Meyer et al, 1971) y cobaya (Howell et al, 1974) y en páncreas aislado de rata (Rosselin et al, 1973). Sin embargo, la administración simultánea de aminofilina y arginina decrece la hiperglucagonemia inducida por la arginina "in vivo" (Marco et al, 1972).

Diversos trabajos (Grill y Cerasi, 1974; Wolters et al 1977; Bouman et al, 1979), con algunas excepciones (Cooper et al, 1973). indican que la glucosa disminuye los niveles de AMPc de los islotes, consecuentemente con una inhibición de la secreción de glucagón. Durante el ayuno, un cambio de dieta sumamente extremo, es bien conocida la estimulación de la secreción de glucagón tanto "in vivo" como "in vitro" (Unger, 1971).

Podemos indicar por lo tanto que existe una relación entre la secreción de glucagón dependiente de la glucosa y el contenido de AMPc de los islotes, con lo que se pone en evidencia el papel de los nucleótidos cíclicos en la regulación de los mecanismos secretorios de la célula pancreática A.

### 1.3.3. CONTROL DE LA SECRECIÓN DE GLUCAGÓN.

Existen diversos moduladores que actúan sobre la secreción de esta hormona pancreática.

a) Glúcidos. La importancia que tiene la glucosa como fuente de energía celular es reflejada por el hecho de que, excepto durante el "stress", los niveles de glucosa arterial regulan la entrada o salida de ésta en la sangre. La influencia de la concentración de glucosa arterial sobre la respuesta del sistema celular pancreático endocrino (células A y B) puede ser estudiada en sistemas de perfusión de páncreas "in vitro" (Pagliara et al, 1975), comprobándose su importancia en el mantenimiento de la glucemia en sujetos normales. En ausencia de "stress" o diabetes, la abundancia de glucosa es el más potente supresor fisiológico de la secreción de glucagón y estimulador de la insulina. Recíprocamente, la ausencia de glucosa es el más potente estimulador de la secreción de glucagón y supresor de la de insulina.

b) Aminoácidos. La administración intravenosa u oral de arginina (Assan et al, 1967; Unger et al, 1970), alanina (Muller et al, 1971 ) o mezclas de aminoácidos (Ohneda et al, 1968), así mismo la ingestión de hidrolizados de proteínas o de proteínas intactas (Muller et



al, 1971) da lugar a una estimulación de la secreción de glucagón. La liberación de glucagón parece ser una respuesta para prevenir una hipoglucemia secundaria a la secreción de insulina debida a aminoácidos. Parece que ciertos aminoácidos tienen un efecto directo sobre la secreción de glucagón en las células A, aunque el mecanismo no está aún bien diluido. Rocha et al (1972), en un trabajo realizado en perros conscientes administrando por vía intravenosa veinte aminoácidos diferentes, llegaron a la conclusión de que solo los aminoácidos ramificados y los aminoácidos relacionados con la alanina son los auténticos estimuladores de la secreción de glucagón.

c) Acidos grasos libres y cuerpos cetónicos. La administración exógena de ácidos grasos libres da lugar a un descenso en la secreción de glucagón "in vivo" (Madison et al, 1968; Luickx y Lefebvre, 1970) y en islotes aislados (Edwards y Taylor, 1970), aunque se sabe que este hecho no tiene una gran importancia fisiológica. Los estados en los que hay hiperlipoacidemia, tales como el ayuno, "stress", hipoglucemia o hipoinsulinemia están precisamente caracterizados por aumento de los niveles de glucagón en sangre. El descenso de insulina y el aumento de glucagón permite generalmente el aumento de la lipólisis como parte de la misión

del islote en la distribución energética aunque un efecto negativo de los ácidos grasos libres sobre la secreción de glucagón puede tener cierta importancia reguladora.

Las cetonas suprimen "in vitro" la secreción de glucagón (Edwards y Taylor, 1970), en contradicción con la existencia de hiperglucagonemia en la cetoacidosis diabética. Este "feedback" negativo sobre los niveles de glucagón "in vivo" parece ser débil, porque la hiperglucagonemia está siempre asociada y parece ser esencial para la producción de cetonas, aún en un esfuerzo para producir energía.

En cuanto al glicerol, Fujita et al (1975) sugieren que no tiene un efecto directo sobre la célula A.

d) Hormonas. La somatostatina inhibe varios sistemas endocrinos y probablemente actúa con un mecanismo común. Curry y Bennett (1974) y Fujimoto y Ensinck (1976), indican que el calcio invierte en parte los efectos inhibidores de la somatostatina sobre la liberación de insulina, sugiriendo que la somatostatina puede actuar sobre los niveles de calcio. Sin embargo estos estudios no indican una existencia directa de relación entre la somatostatina y el calcio extracelular. Un mecanismo similar para la inhibición de la secreción de glucagón por la somatostatina sugiere que

la activación de la célula A es también dependiente del calcio.

En perfusión de páncreas de rata se observa que la secreción de glucagón estimulada por aminoácidos requiere calcio y que éste puede estimular la secreción de glucagón en ausencia de otros secretagogos (Gerich et al, 1974b).

Otros estudios aparentemente conflictivos indican un aumento de la secreción de glucagón consecuente a la deprivación de calcio (Leclercq-Meyer et al, 1973). Lundquist et al (1976) indican que la adición del calcio promueve la liberación de glucagón, actuando como un modulador positivo sobre el efecto inhibitor de la glucosa. Así pues la adición de calcio puede explicar los efectos contradictorios de la literatura, llegándose a la conclusión de que la célula A necesita este catión para su funcionamiento. Puede indicarse que la somatostatina modifica el metabolismo del calcio y a su vez la función secretora de la célula A, aunque este efecto no parece ser directo sobre la liberación de glucagón.

La gastrina, pancreozimina (Unger et al, 1967) y péptido inhibitor gástrico (GIP) (Rabinovitch y Dupre, 1974) están bien identificados como secretagogos del glucagón. Las proteínas, grasas y, en el caso del GIP, la

glucosa, estimulan la secreción de estas hormonas gastrointestinales, por lo que pueden ser consideradas como candidatos hormonales mediadores de la respuesta de la célula A.

Puede postularse la existencia de supresores hormonales de la secreción de glucagón sintetizados en el intestino para explicar la disminución de la glucagonemia en sujetos normales inducida por una comida rica en glucosa (Unger y Eisentraut, 1969). Sin embargo, solo la secretina es conocida como supresora de la secreción de glucagón y estimuladora de la de insulina.

Las catecolaminas estimulan la secreción de glucagón por vía beta-adrenérgica y su efecto es bloqueado por propanolol (Iversen, 1973a); se ha comprobado que el ejercicio y "stress" pueden modificar la respuesta de la célula A. Hay una evidencia indirecta de que la dopamina puede también ser un estimulante de la célula A (George y Rayfield, 1974) pero el significado fisiológico es poco claro. El cortisol, administrado crónicamente en altas dosis, incrementa la respuesta del glucagón a la arginina (Marco et al, 1973) y alanina (Wise et al, 1975). La neurotensina es también un estimulador del glucagón y supresor de la insulina, mientras que la sustancia P estimula la liberación de ambas hormonas (Brown y Vale, 1976).

e) Factores de origen nervioso. El control del hipotálamo sobre la función de las células A y B está bien estudiado por Frohman y Bernardis (1971). La estimulación del núcleo ventromedial da lugar a la secreción de glucagón (Frohman y Bernardis, 1971), mientras que la estimulación de los nervios simpáticos bloquea la regulación de la célula A durante el "stress" por estimulación por vía beta-adrenérgica (Marliss et al 1973). El control colinérgico puede ser también un factor importante en mantener el descenso y responder al estímulo de la célula A (Bloom et al, 1974; Iversen, 1973b).

#### 1.3.4. FISIOLOGIA DE LA SECRECION DE GLUCAGON.

Después de una noche de ayuno, los niveles medios de IRG en individuos normales son aproximadamente 75 pg/ml, como se ha comprobado por radioinmunoanálisis utilizando anticuerpos específicos para glucagón pancreático. Sin embargo la concentración basal de glucagón puede calcularse alrededor de 25 pg/ml; con un rango de 5-80 (Unger y Orci, 1976). La función de la secreción de glucagón en los estados basales es mantener un grado de producción suficiente de glucosa hepática para reponer la que ha sido utilizada.

#### 1.3.4.1. Glucagón durante el ayuno.

Durante el ayuno o durante la restricción de la ingesta de carbohidratos, se observa en individuos normales un aumento de la concentración plasmática de glucagón, con un promedio de 50-100% sobre los niveles obtenidos tras un ayuno nocturno (Muller et al, 1971), a la vez que disminuye la secreción de insulina. La relación molar insulina/glucagón en plasma desciende a un promedio de 0'4 (Unger, 1971). Esta relación hormonal origina un aumento de producción de glucosa hepática, inicialmente a través de un incremento de la glucogenolisis y luego, cuando el glucógeno está agotado, probablemente a través de un incremento en la gluconeogénesis (Unger y Orci, 1976).

Progresivamente existe un incremento de la producción de cetonas, con lo cual se suministra una energía alternativa al sistema nervioso central. Como las cetonas se convierten en un aporte calórico útil disminuye la gluconeogénesis (Cahill et al, 1966).

La hipoglucémia inducida por la insulina está asociada por un rápido incremento del glucagón. Samols et al (1972) sugieren que la insulina no tiene un efecto directo supresor sobre la secreción de glucagón. La marcada hiperinsulinemia provocada por infusión de insulina o por un tumor secretor de esta hormona, puede

conducir a la célula A a segregar glucagón en respuesta a la hipoglucemia, como es el caso del insulinoma, donde los niveles plasmáticos de glucagón están frecuentemente disminuidos. Alternativamente, es posible que una verdadera subida de los niveles de insulina permita la entrada de glucosa en la célula A, en desafío a la hipoglucemia, con lo que la célula A estaría "equivocada" y se conduciría como si la glucosa fuera abundante (Unger y Orci, 1976).

En situaciones de hipoglucemia e hipoinsulinemia conseguidas por administración de florizina (Unger et al, 1962) o por adrenalectomía total, los niveles de glucagón pueden estar muy altos (alrededor de 600 pg/ml) durante días. La hipoglucemia producida por el alcohol (Palmer et al, 1976), es otra forma de hipoglucemia provocada por descenso de la insulinemia, asociada similarmente con hiper glucagonemia.

Samols et al (1972), han propuesto que la insulina inhibe directamente la secreción de glucagón, pero no se puede descartar la posibilidad de que la insulina actúe potenciando la capacidad de la glucosa para suprimir la liberación de glucagón.

En ausencia de insulina, la glucosa no puede suprimir la secreción de glucagón habiendose observado incluso, en ocasiones, que está incrementada la secreción de

esta hormona. Edwards y Taylor (1970) y Braaten et al (1974), han sugerido que la supresión de la secreción de glucagón es un proceso dependiente de energía; si es así, el descenso de la concentración de glucosa intracelular puede ser responsable de los altos niveles de la secreción de glucagón en ausencia de insulina.

#### 1.3.4.2. Glucagón e ingesta alimenticia.

La hiperglucemia inducida por la ingesta oral de glucosa y otros carbohidratos o la infusión intravenosa de glucosa disminuye los niveles plasmáticos de glucagón mientras que aumenta concomitantemente la secreción de insulina.

Ello puede reflejar la desaparición de la mayor parte del glucagón en la circulación, aunque la magnitud del descenso parece estar desproporcionada con respecto a la hiperglucemia, sugiriendo Unger y Orci (1976) la participación de alguna señal entérica desde el intestino.

La ingestión oral de proteínas, hidrolizados protéicos o mezclas de aminoácidos, o bien la administración intravenosa de ciertos aminoácidos, producen un aumento de glucagón en el plasma (Rocha et al, 1972).

La respuesta a los aminoácidos tras una comida rica en proteínas se considera como el estímulo más importante



para la célula A, a menos que sea acompañada por una ingestión de carbohidratos. La disposición apropiada de los aminoácidos ingeridos dentro de los varios caminos de la biosíntesis protéica requiere que la insulina sea secretada y que la producción de glucógeno hepático sea incrementada para prevenir la hipoglucemia aminogénica. De este modo, existe un 70% de incremento en el "turnover" de glucosa durante la infusión de arginina (Cherrington et al, 1974). Sin embargo, si la secreción de glucagón es suprimida por somatostatina (Sakurai et al, 1974) o glucosa (Unger et al, 1969) durante la administración de un aminoácido glucogenético como la alanina, la glucosa plasmática puede disminuir. No obstante, si la glucosa es ingerida junto con una comida protéica, el incremento de la secreción de glucagón es inútil y está abolido durante la hiperglucemia, mientras que la secreción de insulina está fuertemente aumentada (Unger y Orci, 1976).

Entre distintas hormonas gastrointestinales estudiadas, la gastrina, pancreozimina y GIP (Unger et al, 1967; Rabinovitch y Dupre, 1974), no solo tienen la actividad biológica requerida para estimular la secreción de los islotes sino que también son conocidas por ser liberadas después de la ingestión y durante la absorción de aminoácidos. La influencia de agentes colinérgicos parece estar implicada también, por cuanto se conoce que la

atropina disminuye la respuesta del glucagón a una comida protéica (Unger y Orci, 1976).

En el hombre, la ingestión de una comida grasa pura da lugar a un ligero aumento en el glucagón plasmático (Bottger et al, 1973). Los efectos de la absorción de grasas sobre la secreción de insulina y glucagón pueden ser mejor estudiados si la grasa se deposita directamente en el duodeno, como ha sido realizado en perros conscientes (Bottger et al, 1973). Puede así observarse un gran incremento en el glucagón con pequeña o nula modificación de la insulina plasmática.

#### 1.4. OBJETIVOS.

Revisado el estado actual de conocimientos sobre los mecanismos de secreción de insulina y glucagón, pretendemos dilucidar el papel del AMPc en ambos procesos, en presencia de glucosa en islotes pancreáticos aislados de ratas en estado de ayuno (modelo experimental que asemeja a la diabetes) o de alimentación, así como establecer las interrelaciones entre la secreción de las dos hormonas pancreáticas, en situaciones de diverso aporte calórico. En este sentido, perseguimos los siguientes objetivos:

- a) Modificaciones de la secreción de insulina y glucagón en presencia de glucosa (2'75 y 16'7 mM) tras 4 y 8 días de ayuno.
- b) Efecto de la realimentación (2 días) sobre la secreción de insulina y glucagón en presencia de glucosa (2'75 y 16'7 mM) en islotes de ratas sometidas previamente a 4 días de ayuno.
- c) Efecto de altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la secreción de insulina y glucagón en presencia de glucosa (2'75 y 16'7 mM) en islotes de ratas controles y sometidas a ayuno.
- d) Modificaciones del contenido intracelular de AMPc en islotes durante el ayuno.

- e) Efecto de la teofilina sobre la secreción de insulina inducida por glucosa (2'75 y 16'7 mM) en islotes de ratas controles y sometidas a ayuno.
- f) Efecto del db-AMPC sobre la secreción de insulina y glucagón en presencia de glucosa (2'75 y 16'7 mM) en islotes de ratas controles o sometidas a ayuno.

2o MATERIAL Y METODOS.

## 2.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Hemos utilizado ratas machos wistar-albino con un peso comprendido entre 250 y 350g. correspondientes a unas 12 semanas de edad. Las ratas están sometidas a una dieta standard cuya composición se detalla en la página siguiente. La anestesia la realizamos con pentobarbital sódico inyectado intraperitonealmente a la dosis de 4mg/100g de peso, quedando anestesiada la rata a los pocos minutos y el efecto dura aproximadamente dos horas.

## 2.2. AISLAMIENTO DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS.

### 2.2.1. Recuerdo anatómico del páncreas de rata.

El páncreas de rata se encuentra entre las dos capas del mesenterio que incluye el duodeno.

Se extiende en tres partes fundamentales:

La primera, recubre los vasos esplénicos y llega desde el bazo hasta la zona medial representada por la aorta; la segunda parte está anatómicamente relacionada con la curvatura mayor del estómago, mientras que la tercera está íntimamente unida al marco duodenal.

El páncreas está parcialmente cubierto por el estómago y por el hígado, por lo que hay que rechazar ambos en laparatomía media abdominal.

El color es rosado vinoso, por lo que es fácil de distinguir de la grasa epiploica más amarillenta que está unida en su borde superior directamente relacionada

CONTENIDO EN PRINCIPIOS NUTRITIVOS, MINERALES Y VITAMINICOS  
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 <sub>1</sub>	:	6	mg/Kg
Vitamina B <sub>2</sub>	:	10	mg/Kg
Vitamina B <sub>6</sub>	:	6	mg/Kg
Vitamina B <sub>12</sub>	:	12	mcg/Kg
Acido Pantoténico	:	20	mg/Kg
Niacina	:	50	mg/Kg
Acido Fólico	:	4	mg/Kg
Colina	:	1.500	mg/Kg

con el estómago.

Los conductos pancreáticos principales no desembocan directamente en el duodeno, sino que lo hacen en el colédoco. Hay dos más importantes de mayor tamaño, el primero de los cuales termina a cinco milímetros de la desembocadura del colédoco, entre el duodeno y el hígado. Pueden verse por transparencia levantando el duodeno. Existen otros conductos pancreáticos más pequeños en número de 8 a 12, cuya entrada en el duodeno es variable.

Toda la vascularización que llega al páncreas proviene de la aorta, a través del tronco celíaco y de la arteria mesentérica superior. Las arterias directamente encargadas de la irrigación pancreática son la pancreaticoduodenal y la rama gastroduodenal de la arteria hepática común.

La cola del páncreas recibe ramas de la arteria esplénica que sale del tronco celíaco y que en ocasiones puede salir directamente de la aorta.

El drenaje venoso del páncreas se realiza a través de numerosos vasos que confluyen todos en la vena porta.

El drenaje linfático se realiza a través del conducto mesentérico superior.

Los islotes se hayan distribuidos por todo el tejido pancreático aunque proporcionalmente la cola tiene mayor número.

Constituye aproximadamente el 1% del peso total del órgano



que puede ser de 1'5g en rata de 300g.

### 2.2.2. Protocolo quirúrgico.

Una vez anestesiada la rata se extrae la lengua de la boca para dejar libres las vías respiratorias. Se le practica laparatomía media amplia de xifoides a pubis. Se identifica el ilíaco hepático, se libera el colédoco y casi en la bifurcación de los hepáticos se hace una pequeña apertura, a través de la cual introducimos un catéter de los utilizados en linfografía. Una vez canalizado el colédoco pasamos una ligadura para fijar el catéter y con unas pinzas Kocher cerramos la desembocadura del colédoco en el duodeno.

Con una jeringa conectada al catéter, introducimos una solución de Hanks frío (cuya composición describimos en la pag. n° 59 ) y vamos hinchando el páncreas con unos 10ml de esta solución, hasta que veamos el páncreas aumentado de tamaño; entonces practicamos la pancreatometomía (ver fig. n° 8 ).

### 2.2.3. Aislamiento.

El páncreas, una vez recortado, se coloca sobre una placa Petri que contiene Hanks frío (ver fig. n° 9 ), y se limpia de las impurezas de grasa que pudiera llevar. Inmediatamente después se lleva todo el páncreas sobre un vaso de precipitado de unos veinte ml y se trocea con unas tijeras de acero que corten muy bien hasta dejarlo hecho una papilla muy fina (aproximadamente 20 min.).

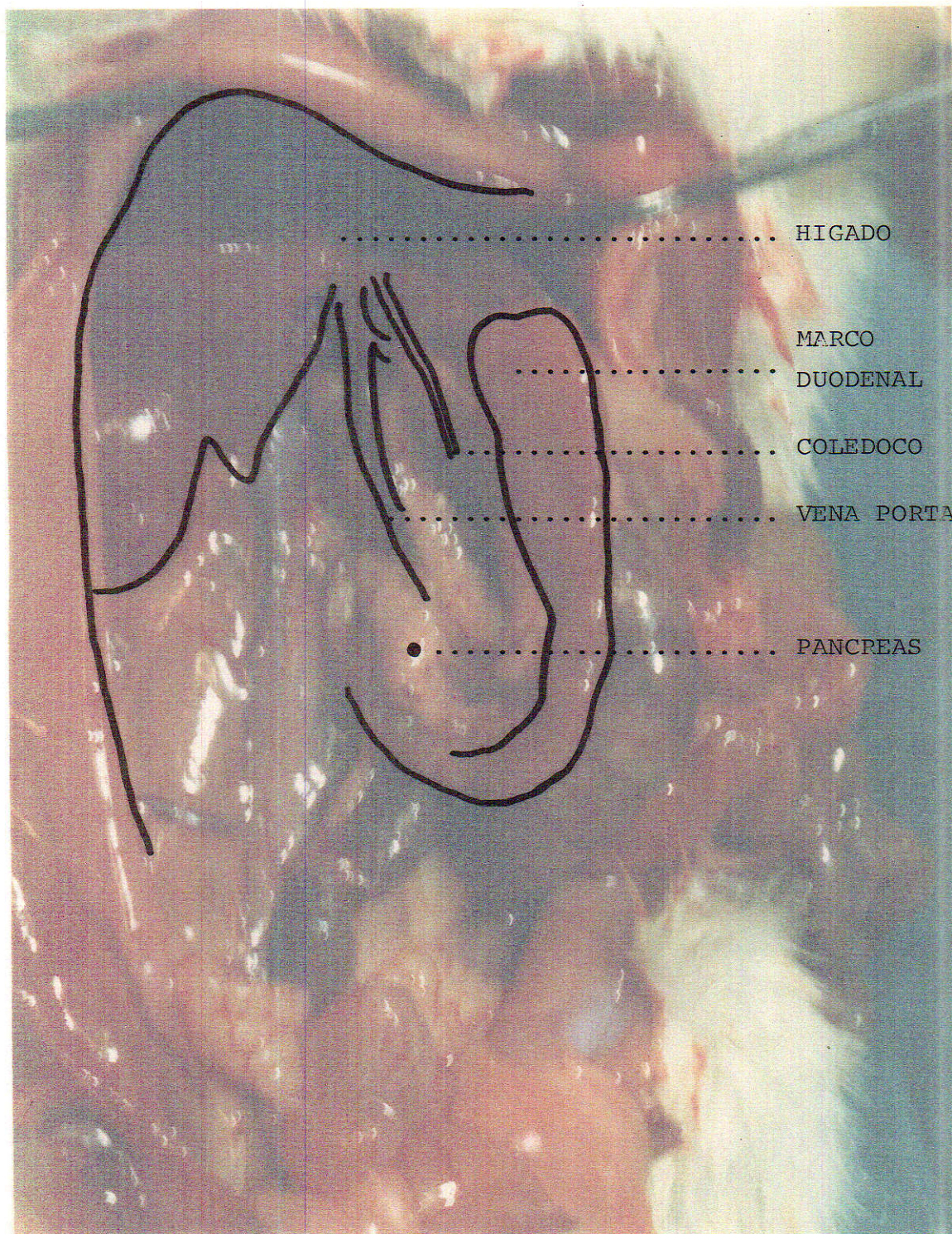


Fig. 7

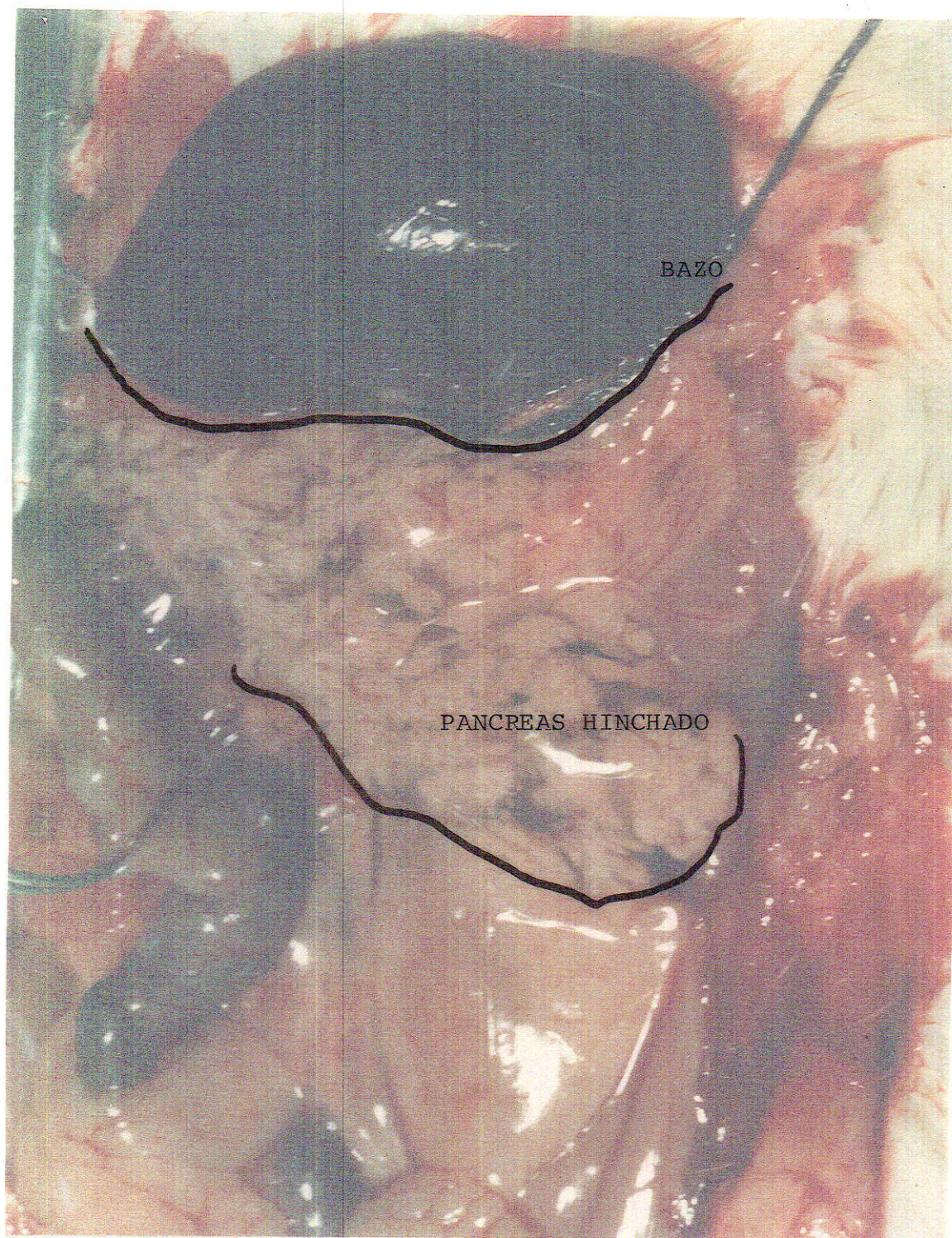


Fig. 8

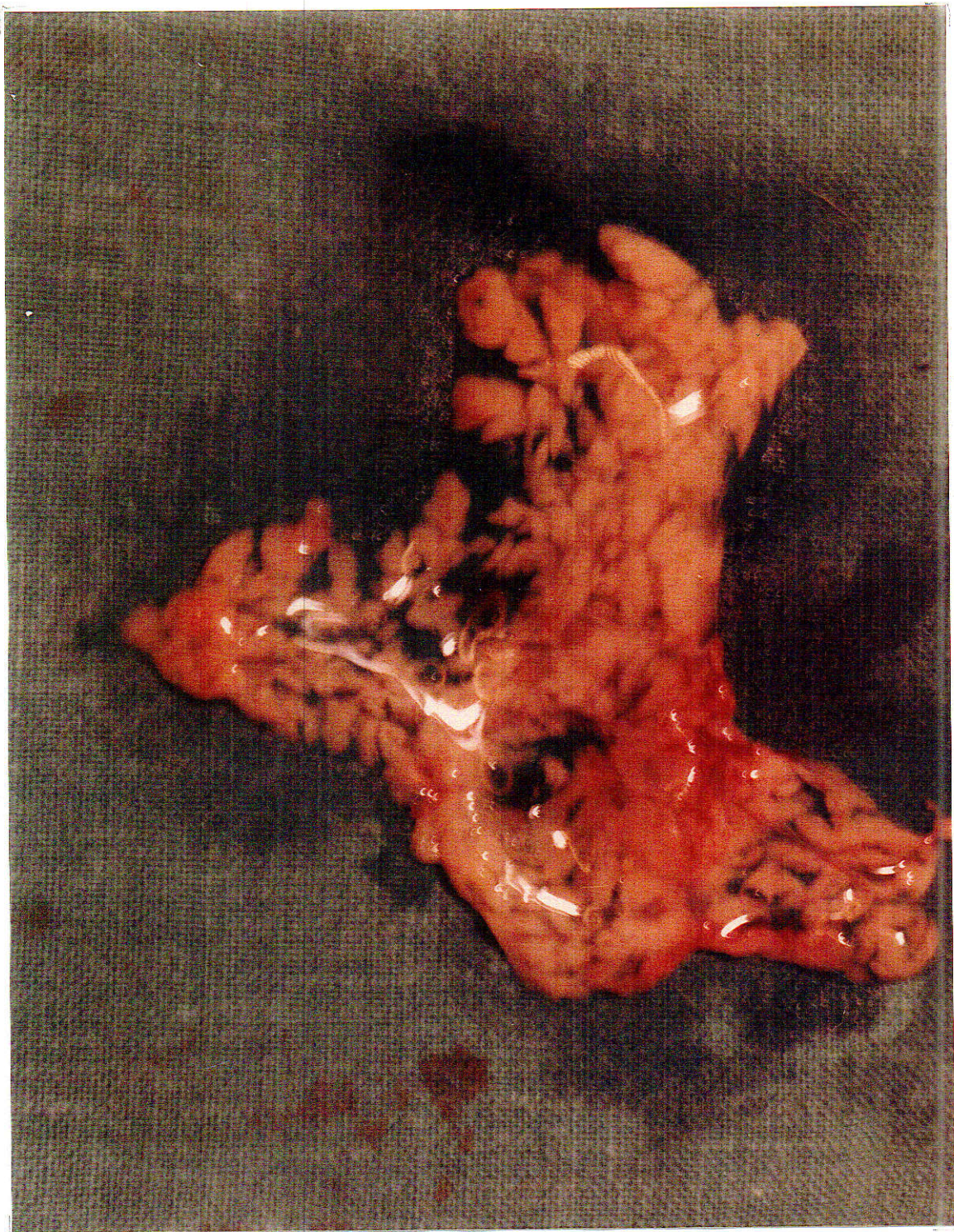


Fig. 9 Páncreas hinchado y extraído del animal previo al aislamiento de los islotes de Langerhans.

Durante dos veces vertemos en el vaso de precipitado Hanks frío y con una pipeta Pasteur descartamos la grasa que queda en la parte superior (del vaso de precipitado) juntamente con la solución de Hanks.

Trasvasamos la papilla a un tubo de ensayo graduado de 10 ml y volvemos a cambiar dos veces más la solución salina .

Una vez limpia la papilla se añade colagenasa a razón de 3 mg x ml de papilla (Worthington, 151 U/mg, CLS IV Biochemical CO), según el método de Lacy y Kostianovsky (1967) con ligeras modificaciones.

Se agita vigorosamente el tubo de ensayo conteniendo la papilla con colagenasa durante 12 min (dependiendo de la actividad de este enzima) en un baño de agua a 37°C.

Una vez terminada la digestión se detiene la actividad de la colagenasa con una solución de Hanks frío. Se centrifuga durante 20 min a baja velocidad y se retira el sobrenadante con una pipeta Pasteur. Se vuelve a resuspender el sedimento con una solución salina y se realiza la misma operación anterior tres veces.

Se toma una muestra con pipeta Pasteur y se deposita en placas de plástico de fondo negro y se observan con una lupa de 12 aumentos.

Se pescan los islotes con una pipeta Pasteur de calibre reducido fabricada por nosotros a la llama, cuidando que los islotes esten lo más limpios posible de exocrino.

#### 2.2.4. Incubación.

Transferimos a tubos de ensayo pequeños que contienen 0'9 ml de Krebs Ringer Bicarbonato (cuya composición describimos en la siguiente página) suplementado con albúmina bovina (BSA, Behringwerke) al 1%, pH 7'4.

Por cada 25 ml de KRB, le añadimos 0'5 ml de Trasylol (Bayer, 100.000 U.i.C./5ml) como inhibidor de proteasas.

Colocamos estos tubos en un baño de agua con hielo y depositamos 5 islotes en cada uno de ellos. Si trabajamos bien con calcio, teofilina, db-AMPC, en el momento de preparar el KRB, añadimos cada uno de los reactivos indicados.

El tiempo transcurrido desde que se extrajo el páncreas hasta el momento de la incubación propiamente dicha, no debe exceder de 1h 45 min.

A continuación se añade 0'1 ml de una solución de glucosa en KRB pH 7'4 y 1% de BSA, de forma que nos quede en el tubo de incubación a una concentración final de 2'75, 16'7, 33'4 mM de glucosa. Se gasean los tubos con carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>) durante 1 min.

Se realiza la incubación en una agitadora mecánica Unitronic 320 (Selecta) a 37°C durante 30 min. Al cabo de este tiempo se extrae 0'7 ml del sobrenadante de cada tubo para su conservación a -20°C hasta que se realice la correspondiente determinación.

COMPOSICION QUIMICA DE LA SOLUCION DE HANKS.

ClNa .....	140 mM
ClK .....	6 mM
SO <sub>4</sub> Mg .....	1'3 mM
Cl <sub>2</sub> Ca .....	1'3 mM
PO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> .....	0'4 mM
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> .....	0'3 mM

COMPOSICION QUIMICA DE KREBS RINGER BICARBONATO.

NaCl .....	118 mM
KCl .....	5 mM
MgSO <sub>4</sub> .....	12 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	12 mM
NaHCO <sub>3</sub> .....	25 mM
CaCl <sub>2</sub> .....	2'5 mM

## 2.3. RADIOINMUNOANALISIS DE INSULINA.

### 2.3.1. Preparación de la insulina standard de marcaje.

Insulina porcina cristalina Novo.

Se pesan 2 mg en balanza de 5 decimales por repeticiones sucesivas. Se disuelven en 2 ml de ClH 0'03 N. Se deja en reposo 30 min agitando esporádicamente.

Se hacen 15 alícuotas de 50  $\mu$ l para marcaje identificadas con IM.

Mezclar 0'1 ml de la solución anterior con 2'4 ml de buffer veronal sódico 0'1 M, pH 8'6, 0'5% BSA, con lo que queda a una concentración de  $10^6$   $\mu$ U/ml (1 mg=25U). Mezclar 0'5 de esta solución con 49'5 ml de buffer, con lo que queda a 10.000  $\mu$ U/ml. Diluir en alícuotas de 1 ml e identificadas con IA.

Congelar todas las alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3.2. Anticuerpos.

Disponemos de anticuerpos de cobaya, diluido 1/100 y congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  y obtenidos de la siguiente forma en nuestro laboratorio:

- Inmunizamos 4 cobayas (14-1-77) con insulina porcina cristalina.

#### Material.

Solución de insulina: se prepara una solución que contiene 1 mg de insulina disuelto en 1 ml de ClH 0'03 N,



3 ml de adyuvante completo de Freud (Difco), que es un antígeno inespecífico constituido por un extracto de cápsulas de bacilo tuberculoso en suspensión oleosa; 0'1 ml de NaOH 0'3 N y 1 ml de ClNa, 0'9%. Se agita hasta conseguir una homogenización durante 15 min.

#### Método.

Se inyecta a los cobayas 1 ml de la suspensión (5U) en la zona lumbar por vía subcutánea en múltiples pinchazos y se administra inmediatamente después con sonda suero glucosado al 50% para evitar hipoglucemia o bien glucosa hipertónica intraperitonealmente.

Esta inmunización se repite con intervalos de 15 días.

Una semana después de la última inmunización se extrae sangre por punción cardíaca a los cobayas. Se separa el suero y se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### Titulación de anticuerpos.

Para saber qué suero de cobaya es más adecuado y contiene mayor cantidad de anticuerpos, se incuban diluciones variables de anticuerpo con una cantidad constante de insulina marcada siendo válidos aquellos sueros que se unan al 50% de dicha insulina.

A continuación con el cobaya seleccionado (en nuestro caso identificado con  $C_3$ ), se prepara una curva standard para cada dilución de anticuerpo (1/10.000, 1/20.000, 1/30.000), como se describe en este mismo apartado de

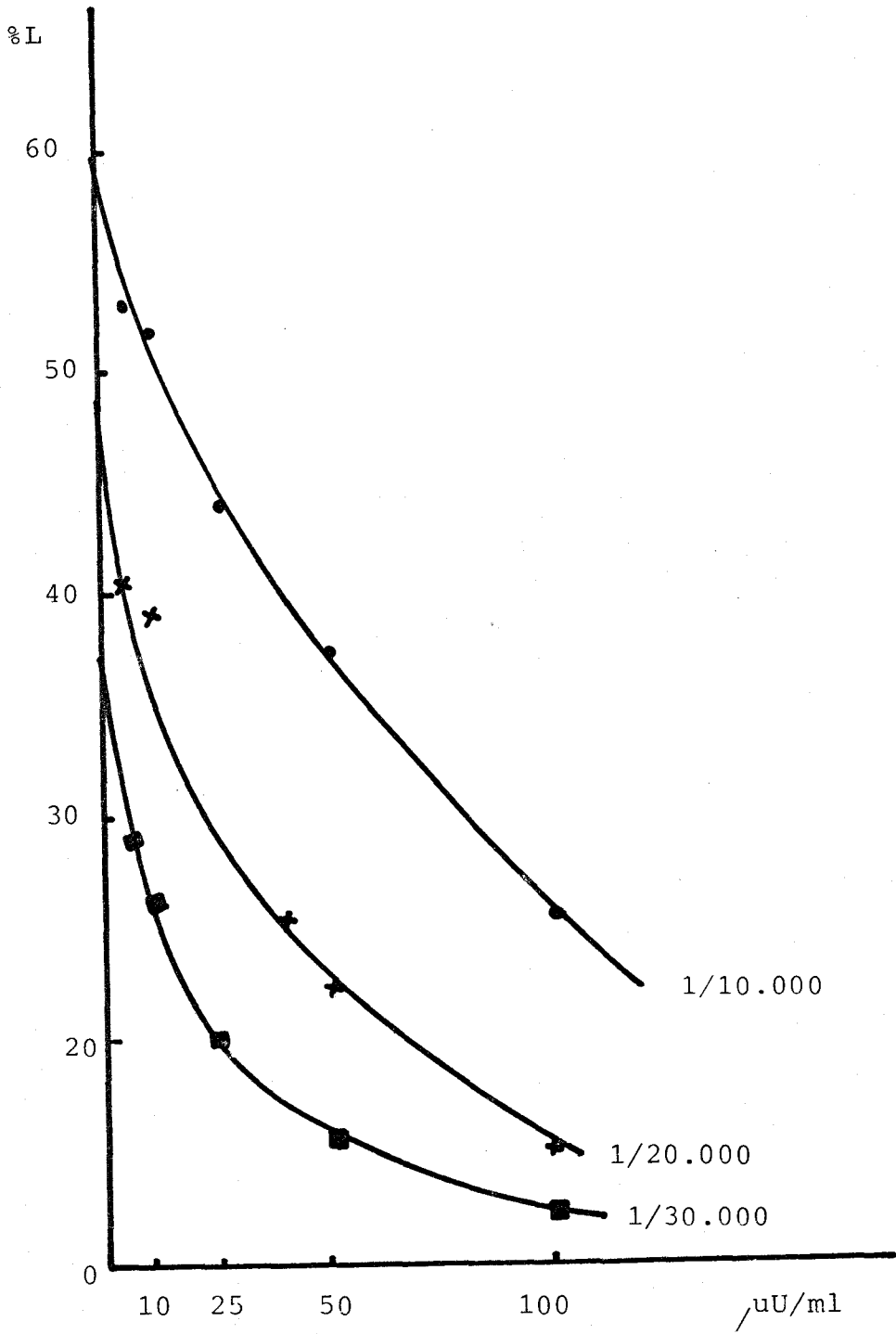


Fig. 10 Curva de titulación del anticuerpo antiinsulina.

RIA de insulina y se observa cual es la dilución del anticuerpo a la cual tiene más sensibilidad la curva (en nuestro caso 1/20.000 inicial) (ver fig.n° 10).

El suero de cobaya (1ml) se completa hasta 100 ml con buffer veronal sódico 0'1 M, pH 8'6 y 0'5 BSA ; se hacen alicuotas de 0'5 ml, se congelan a -20°C, hasta el día del análisis correspondiente.

### 2.3.3. Marcaje de insulina.

Basado en la técnica de Hunter y Greenwood (1962) que consiste en la oxidación por la cloramina T del yoduro radiactivo en yodo atómico I e I<sup>+</sup> que se une a uno o más átomos de carbono del anillo bencénico de las moléculas de tirosina, de las cuales hay cuatro en la insulina, 2 en la cadena A en posición 14 y 19 y otras dos en la cadena B en posición 16 y 26. La acción se detiene por medio del metabisulfito.

#### Material.

- Buffer veronal 0'1 M pH 8'6: preparar un litro en agua bidestilada y desionizada disolviendo 20'62 g de veronal sódico en 800 ml aproximadamente. Ajustar el pH con ClH 1 N y enrasar a 1l. Conservar a 4°C.
- I<sup>125</sup> Amershan, con una actividad total de 10<sub>ul</sub>=1mCi.
- Buffer fosfato 0'3 M pH 7'5: pesar 2'04g de PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K, disolver en 40 ml de agua bidestilada y desionizada, ajustar el pH con NaOH 1 N y enrasar a 50 ml. Conservar a 4°C.

- Cloramina T: pesar 25 mg y disolver en 10 ml de tampón fosfato. Conservar en la oscuridad hasta su uso.
- Metabisulfito sódico: pesar 25 mg y disolver en 5 ml de tampón fosfato y conservar a 4°C.
- BSA: pesar 25 mg y disolver en 1 ml de tampón fosfato.

#### Método.

Realizar el marcaje en tubo de plástico a temperatura ambiente. Con una microjeringa Hamilton provista de catéter Portex n°1; tomar por este orden:

- 20  $\mu$ l de tampón fosfato.
- 5  $\mu$ l de cloramina T (12'5  $\mu$ g).
- 5  $\mu$ l de insulina (5  $\mu$ g).
- 20  $\mu$ l I<sup>125</sup> (2 mCi).
- Dispensar la mezcla en un tubo y agitar 30 s exactos.
- 5  $\mu$ l de metabisulfito (25  $\mu$ g). Agitar.
- 100  $\mu$ l BSA (2'5 mg). Agitar.

Una alícuota de 5  $\mu$ l se disuelve en 5 ml de buffer veronal 0'1 M, pH 8'6, BSA 0'25 %. Se utilizará para talco y TCA.

#### Precipitación con ácido tricloroacético (TCA).

Por triplicado, para cada muestra radiactiva, en tubo de plástico poner (en hielo):

- 1 ml de buffer veronal 0'1 M , pH8'6.

- 0'1 ml de BSA 20%.
- 0'1 ml de muestra radiactiva u hormona purificada.
- 1 ml de TCA 20%.

Tapar con parafilm y agitar. Dejar 10 min en reposo y centrifugar a 3.000 r.p.m. durante 5 min.

Aspirar el sobrenadante y contar la radiactividad de los precipitados.

Contar también por triplicado las mismas muestras que sólo contengan 0'1 ml de muestra radiactiva y calcular los correspondientes porcentajes.

Las muestras radiactivas que se tratan con TCA son mezcla de marcaje, así como también "pool" de la hormona marcada pura.

#### Adsorción con talco.

En las mismas condiciones de la anterior sustituyendo el TCA por una pastilla de talco de 50 mg. Normalmente los resultados de pureza son algo más bajos que por el método anterior, ya que la hormona pura se adsorbe al talco, mientras que algo de la hormona dañada se precipita con TCA.

#### Actividad específica.

La actividad específica (A.e.) puede calcularse a partir del porcentaje de incorporación del  $I^{125}$  a la insulina, conociendo la cantidad utilizada de ambos:

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

Por ejemplo, en el marcaje realizado el 9/2/78 se utilizaron  $2 \times 10^{-9}$  mCi de  $I^{125}$  y  $5 \mu\text{g}$  de insulina, obteniéndose un porcentaje de incorporación  $\%I=73\%$  (media de los resultados de precipitación con TCA y adsorción con talco). La actividad específica de la insulina- $I^{125}$  es por lo tanto:

$$A.e. = \frac{2.000 \times 10^{-9} \times 73}{5 \times 100} = 294 \mu\text{Ci} / \mu\text{g}$$

Conociendo que  $1 \mu\text{Ci} = 2.22 \times 10^6$  d.p.m. y que la eficiencia del contador es del 60 %.

$$- 1 \mu\text{Ci} = 2.22 \times 10^6 = 1.332 \times 10^6 \text{ c.p.m.}$$

$$- 1 \mu\text{g} = 294 \mu\text{Ci} = 391.6 \times 10^6 \text{ c.p.m.}$$

$$- 1 \text{ pg} = 391.6 \text{ c.p.m.}$$

Como trabajamos con 10.000 c.p.m. en el RIA de insulina:

$$1 \text{ pg} \dots\dots\dots 391.6 \text{ c.p.m.}$$

$$x \dots\dots\dots 10.000 \text{ c.p.m.}$$

$$x = 25 \text{ pg.}$$

Como 1 mg de insulina es igual a 25 U de insulina,

1 pg es igual a  $0.025 \mu\text{U}$ .

$$\text{Luego } 10.000 \text{ c.p.m.} = 25 \times 0.025 = 0.625 \mu\text{U.}$$

#### 2.3.4) Purificación.

Hemos utilizado dos métodos para purificación de insulina:

### Cromatografía en columna de Sephadex G 50.

Preparada la suspensión de Sephadex, la depositamos sobre la columna de vidrio (1x50 cm) hasta que esté toda llena y no se observen capas.

Se lava con buffer veronal 0'1M, pH 8'6. El exceso de buffer que queda sobre la columna, se aspira con una pipeta Pasteur y a continuación se deposita la mezcla del marcaje, recogiendo en un colector de fracciones con alícuotas de 2ml en 70 tubos de plástico (en los que previamente se deposita 0'1ml de BSA al 20 %). Una vez que ha pasado la mezcla de marcaje eluimos con buffer veronal 0'1 M pH 8'6.

A continuación recogemos una alícuota de 0'1ml de cada tubo del colector y se lleva al contador gamma(CG-4000, Intertechnique) obteniéndose el resultado que se expresa en la gráfica de la página siguiente (Fig. n° 11).

Se observan tres picos, el primero corresponde a los péptidos rotos durante el marcaje, el segundo corresponde a la hormona purificada y el tercero corresponde al yodo radiactivo no incorporado.

Mezclamos el contenido de los tubos de la fracción intermedia y se dividen en alícuotas de 0'5 ml y se congelan a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Puede trabajarse con este trazador durante tres semanas. Después es necesario repurificar en columna de Sephadex de similares características de la anterior hasta un máximo de otras tres semanas.

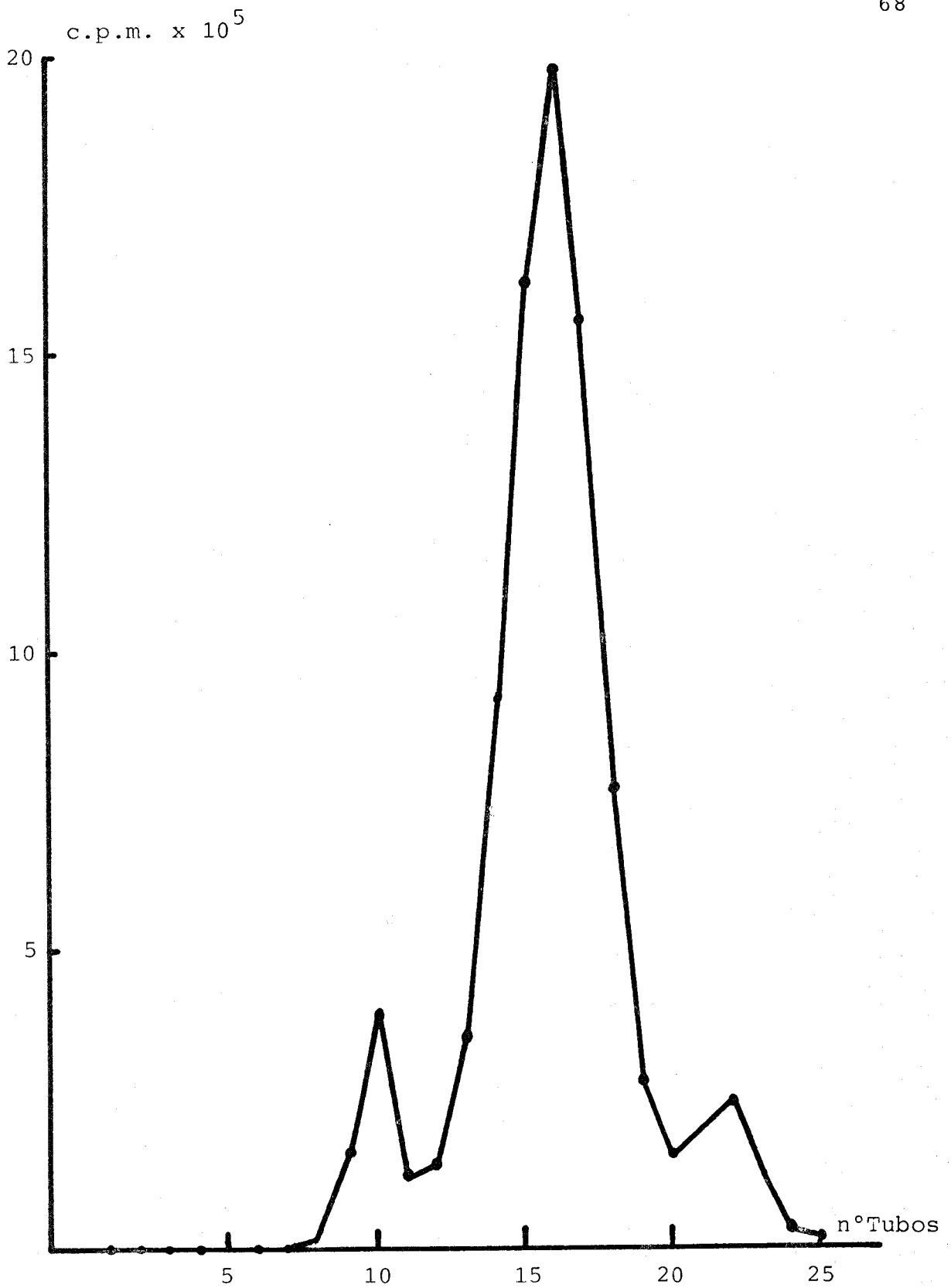


Fig. 11 PURIFICACION DE INSULINA MARCADA  $I^{125}$  EN SEPHADEX  
G-50 (1x50cm)



Purificación con talco (Rosselin et al 1966).

Se añade a la mezcla de marcaje 300 ml de tampón  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  0'3M, pH 7'5 y 2'5 de BSA y 100  $\mu\text{l}$  de talco (100 mg/ml de agua).

Agitar en un mixer y centrifugar durante 10 min a 3000 r.p.m. a 4°C.

Por aspiración en trompa de agua se elimina el sobrenadante. El precipitado (donde se encuentra la hormona purificada) se resuspende en 1 ml de ácido acético 1N/etanol absoluto.

Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 10 min a 4°C.

Aspirar el sobrenadante con pipeta Pasteur y dividir en alícuotas de 20  $\mu\text{L}$  para su liofilización.

Podemos trabajar hasta 90 días con el trazador, mediante el empleo sistemático de este método de purificación.

Por su rapidez y comodidad preferimos este método.

#### 2.3.5. Determinación de la insulina de los islotes:

##### a) Preparación del standard el día del análisis.

Se utiliza buffer veronal 0'1 M, pH 8'6 y 0'5 de BSA, preparado con agua destilada y desionizada. Se descongela una alícuota de IA (insulina análisis) y se preparan las siguientes concentraciones a partir del stock de 10.000  $\mu\text{U/ml}$  teniendo en cuenta que para pasar de una a otra se debe haber agitado en un mixer varias veces y tenido en reposo al menos dos o tres min.

Pauta de preparación.

- 0'1 ml (10.000 $\mu$ U/ml)	+ 3'9 ml buffer	.....	250 $\mu$ U/ml
- 2 ml (250 $\mu$ U/ml)	+ 3 ml "	.....	100 $\mu$ U/ml
- 1 ml (100 $\mu$ U/ml)	+ 1 ml "	.....	50 $\mu$ U/ml
- 1 ml (100 $\mu$ U/ml)	+ 0'5 ml "	.....	75 $\mu$ U/ml
- 0'5 ml (100 $\mu$ U/ml)	+ 1'5 ml "	.....	25 $\mu$ U/ml
- 0'2 ml (100 $\mu$ U/ml)	+ 1'8 ml "	.....	10 $\mu$ U/ml
- 0'1 ml (100 $\mu$ U/ml)	+ 1'9 ml "	.....	5 $\mu$ U/ml
- 0'1 ml (100 $\mu$ U/ml)	+ 3'9 ml "	.....	2'5 $\mu$ U/ml

b) Preparación del anticuerpo el día del análisis.

A partir del "stock" diluido 1/100 realizar una nueva dilución 1/200 con buffer veronal 0'1 M, pH 8'6 y BSA 0'5 %, a título inicial de 1/20.000 y final de 1/80.000, invirtiendo varias veces el tubo y dejándolo reposar.

c) Preparación de la insulina I<sup>125</sup> el día del análisis.

Diluir el trazador (según el tiempo pasado desde el marcaje de modo que 0'1 ml equivalgan a 10.000 c.p.m.) con buffer análisis.

d) RIA de incubación de islotes: se prepara la curva standard por triplicado como hemos indicado anteriormente.

En los tubos que llevan 0  $\mu$ U/ml (sin insulina), en su lugar buffer análisis.

Pipetear sucesivamente a temperatura ambiente por este orden:

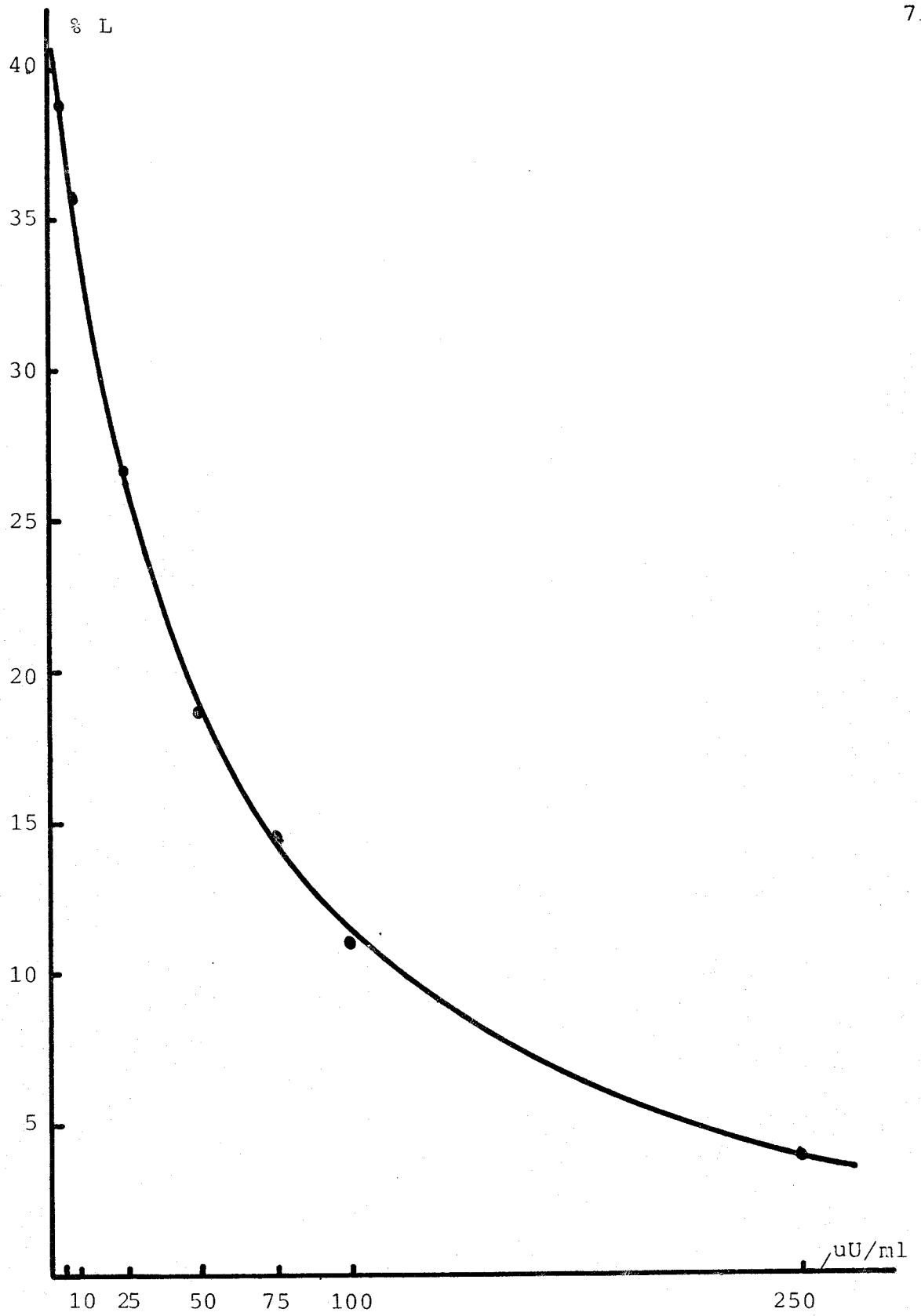


Fig. 12 CURVA STANDARD DE INSULINA I <sup>125</sup>

	Buffer análisis	insulina standard	muestra	insulina I <sup>125</sup>	anticuerpo
Curva standard	0'9 ml	0'5 ml	-	0'1 ml	0'5 ml
Control curva	1'4 ml	0'5 ml	-	0'1 ml	-
Problemas	1'2 ml	-	0'2 ml	0'1 ml	0'5 ml
Control problemas	1'7 ml	-	0'2 ml	0'1 ml	-
Actividad total	-	-	-	0'1 ml	-

Incubar tres días a 4°C.

Separar las fracciones libres y ligadas de todos los tubos (excepto a la actividad total): añadir 0'5 ml de una suspensión de carbón 5 % (Charcoal Sigma Chemical Company) y dextrano T 70 (Pm 70.000) 0'5% en buffer veronal 0'1 M pH 8'6 sin albúmina. Agitada constantemente y preparada al menos 15 min antes de su uso. Dejar los tubos en reposo durante 5 min.

Centrifugar a 3.000 r.p.m. durante 10 min. Aspirar al vacío los sobrenadantes.

Contar la radiactividad de los sedimentos que corresponde a la fracción libre (F), ya que la insulina I<sup>125</sup> queda retenida entre los poros del carbón-dextrano, mientras que la unida al anticuerpo, al ser una molécula muy grande, queda fuera de su dominio y libre en el sobrenadante. Se cuenta la radiactividad durante 2 min y se hace lo mismo con los tubos de actividad total.

Calcular la media de los triplicados así como el porcentaje de los valores con respecto a la actividad total, para obtener el % de F (fracción libre).

Calcular las correspondientes fracciones ligadas L.

$$\% \text{ de L} = 100 - \% \text{ F.}$$

Corregir estos valores de % de L, restándole el control

de adsorción inespecífica correspondiente.

Representar estos valores de % de L corregido frente a las  $\mu\text{U}/\text{ml}$  de los puntos de la curva standard (Fig.n°12).

Leer los valores de % de L de las muestras de las incubaciones directamente en esta curva, multiplicando por 2'5 los valores de dichas muestras, por haberse utilizado 0'2 ml frente a 0'5 de la curva standard.

Se obtiene así la insulina liberada como  $\mu\text{U}/5$  islotes/30min.

## 2.4. RADIOINMUNOANALISIS DE GLUCAGON.

### 2.4.1. Preparación del glucagón standard y de marcaje.

Glucagón porcino cristalino Lilly.

Pesar 2 mg en balanza de 5 decimales por repetición de pesadas. Disolver en 3 ml de ClH 0'02 N, para dar una concentración de 1.000  $\mu$ g/ml. Debe tener a 280 m $\mu$  una densidad óptica de 1'055 frente a un blanco de ClH 0'02 N.

Se hacen 15 alicuotas de 50  $\mu$ l para marcaje, identificado con GM en el tubo y se congelan a -20°C.

Con el resto se prepara un stock de glucagón frío, en buffer glicina 0'2 M con 0'25% de HSA (R) (albúmina humana) (Behringwerke, Marburglahn) y 1 % de NSS (suero de carnero) pH 8'8. Para ello se prepara el buffer glicina 0'2 M, pH 8'8 añadiendo 15 g de glicina a 900 ml de agua bidestilada y desionizada se ajusta el pH y se conserva en frigorífico. En el momento de su uso se añade la cantidad de HSA y NSS necesaria y se comprueba el pH. 1 ml de solución de glucagón anteriormente preparado (0'5 mg/ml) + 49 ml de buffer glicina 0'2 M pH 8'8, 0'25% HSA 1% de NSS (buffer analisis), va a dar un stock de 10  $\mu$ g/ml. Preparar alicuotas de 1 ml, identificadas con GA, y congelar a -20°C.

## 2.4.2. Marcaje de glucagón.

### Material.

- Buffer fosfato 0'3 M, pH 7'5: pesar 2'04 g de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  y disolver en 40 ml de agua. Ajustar el pH con NaOH 1 N y enrasar a 50 ml. Conservar a 4°C.
- Cloramina T: pesar 25 mg y disolver en 10 ml de tampón fosfato.
- Metabisulfito sódico: pesar 25 mg disolver en 5ml de tampón fosfato y conservar a 4°C.
- BSA: pesar 25 mg y disolver en 1 ml de tampón fosfato.
- $\text{I}^{125}$  Amershan, con una actividad total de 10  $\mu\text{l}$  = 1 mCi.

### Método.

Se basa en la técnica de Hunter y Greenwood, descrito para insulina, con la diferencia de que el glucagón contiene 2 moléculas de tirosina, en posición 10 y 13 de su secuencia.

Se realiza el marcaje en tubo de plástico a temperatura ambiente.

Con una microjeringa Hamilton provista de catéter Portex n° 1; tomar por este orden:



- 20,ul de tampón fosfato.
- 5,ul de cloramina T (12'5,ug).
- 4,ul de glucagón (4,ug).
- 25,ul de I<sup>125</sup> (2'5 mCi).

Descargar en un tubo de plástico y se agita 30 s exactos en un mixer.

Añadir 5,ul de metabisulfito.

Agitar. Añadir 100,ul de BSA. Agitar. Añadir 100,ul de Trasylol y agitar.

Transferir una alícuota de 5,ul a un tubo que contenga 5 ml de buffer veronal sódico, 0'1 M, pH 8'6, BSA 0'25%, que se utilizará para TCA y talco. El resto para purificarlo.

La precipitación con talco y TCA de la misma forma que hemos descrito en el RIA de insulina.

#### Actividad específica.

De la misma manera a la descrita en el RIA de insulina, con los siguientes resultados obtenidos en uno de nuestros marcajes.

Hemos obtenido un 56 % de incorporación de I<sup>125</sup> al glucagón:

$$A.e. = \frac{2.500 \times 0'966 \times 56}{4 \times 100} = 338 \text{ uCi/ug.}$$

Hemos utilizado 2'5 mCi de I<sup>125</sup> y 4 mg de glucagón. Con una eficiencia del 60% del contador.

$$1 \mu\text{Ci} = 1'332 \times 10^6 \text{ c.p.m.}$$

$$\text{Luego } 1 \mu\text{g} = 338 \mu\text{Ci} = 450 \times 10^6 \text{ c.p.m.}$$

$$\text{Luego } 1 \text{pg} = 450 \text{ c.p.m.}$$

Como trabajamos a 6.000 c.p.m. en el RIA de glucagón

$$1 \text{pg} \dots\dots\dots 450 \text{ c.p.m.}$$

$$x \dots\dots\dots 6000 \text{ c.p.m.}$$

$$x = 13'3 \text{pg.}$$

#### 2.4.3. Purificación.

Hemos utilizado dos métodos para purificación de glucagón:

##### Purificación en celulosa.

En una jeringa de plástico de 10 ml añadir unas perlas de vidrio y después celulosa Whatman CF 11 hasta 1 ml.

Lavar con buffer veronal 0'1 M, pH 8'6 sin albúmina.

Añadir la mezcla de marcaje.

Lavar con 20 ml del buffer anterior, añadir 2 ml de NSS y desechar el eluido.

Repetir esta última operación 5 veces y recoger en tubos de plástico con 0'1 ml de Trasylol. Hacer un pool con los tubos 2 al 6, que contienen el glucagón- $I^{125}$  puro.

Llevar hasta 50 ml con buffer veronal 0'1 M, pH 8'6,

0'25% de BSA.

Hacer alícuotas de 2 ml y congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Puede utilizarse durante 3 semanas. (Ver fig. n° 13 )

#### Purificación con talco.

Igual que hemos descrito para RIA de insulina, pero conteniendo el medio en el que se realice la purificación 0'1 ml de Trasylol. Hacer alícuotas, congelar y liofilizar.

#### 2.4.4. Anticuerpos.

Hemos dispuesto del anticuerpo Ab 30 K del grupo de R. Unger. Dallas. Texas USA "pool" 3. lote 38 y "pool" 4 lote 1, ambos liofilizados.

Del lote primeramente indicado, una alícuota de 50  $\mu\text{l}$  se reconstituye añadiendo 5 ml de buffer análisis y se disuelve por inversión delicada varias veces durante 1 h. Con ello queda una dilución 1/100. Se hacen alícuotas de 0'2 ml y se congelan (AbG) a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

El segundo anticuerpo (pool 4 lote 1) empleado, con un título más elevado, una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  se reconstituyó con 5  $\mu\text{l}$  de buffer análisis y con ello quedaba a una dilución 1/500. Se hicieron alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Ambos lotes, ligaban aproximadamente en el 0 de la curva de 40 a 45% siendo estas diluciones las más

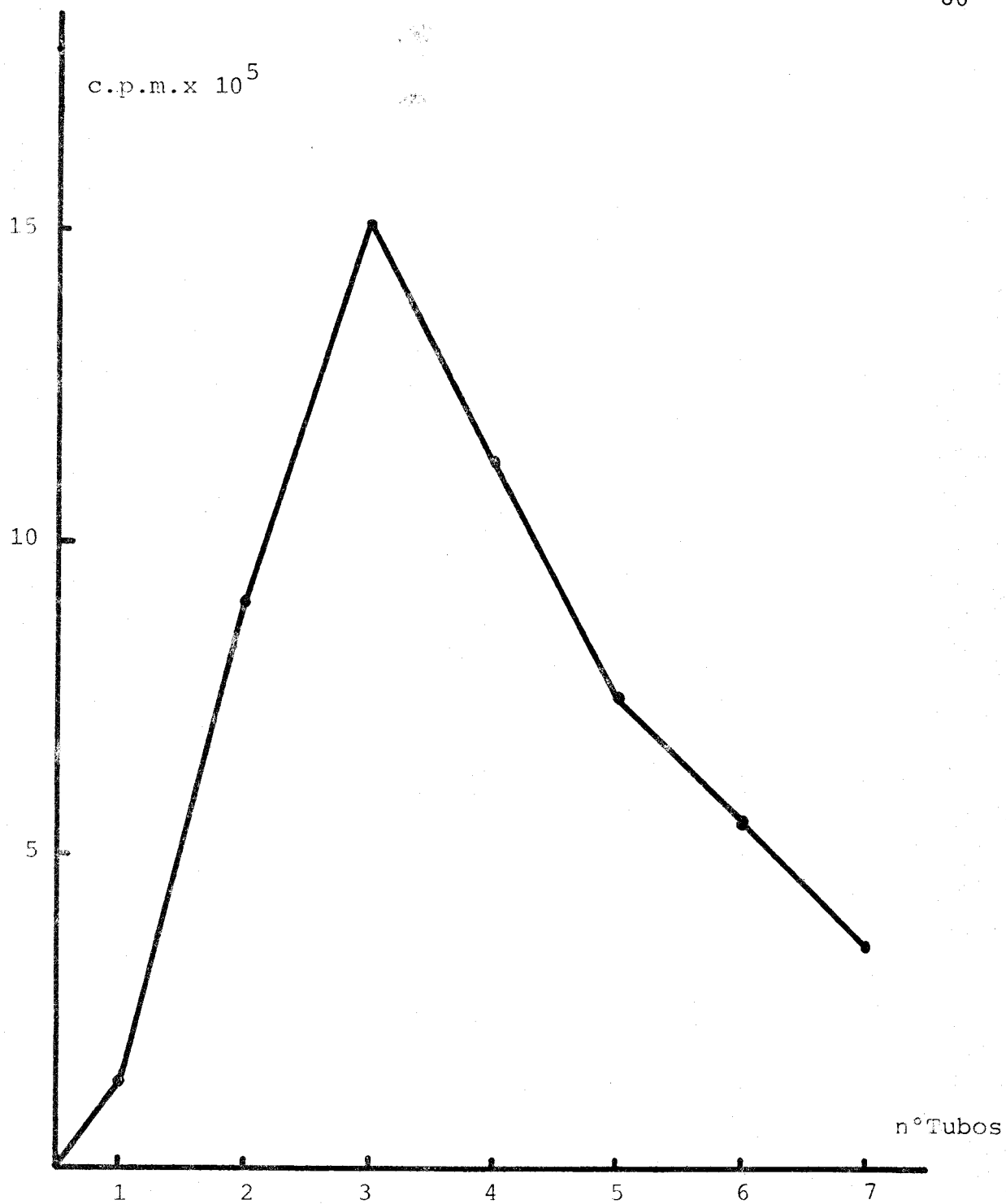


Fig. 13 PURIFICACION DE GLUCAGON MARCADO I<sup>125</sup> EN  
CELULOSA WHATMAN CF-11

adecuadas para cada uno de ellos.

#### 2.4.5. Determinación del glucagón liberado por los islotes:

##### a) Preparación del standard el día del análisis.

Se utiliza buffer glicina 0'2 M con 0'25 de HSA y 1% de NSS, pH 8'8.

A partir del stock GA (10  $\mu$ g/ml).

- 0'1ml (10  $\mu$ g/ml)+0'9ml de buffer análisis.... 1  $\mu$ g/ml
- 0'1ml (1  $\mu$ g/ml)+ 0'9ml de " " ....100 ng/ml
- 0'1ml (100ng/ml)+0'9ml de " " .... 10 ng/ml
- 0'2ml (10ng/ml) +0'6ml de " " ...2500 pg/ml
- 0'2ml (1000ng/ml) +1'8ml de " " ...1000 pg/ml
- 0'3ml (1000pg/ml) +0'3ml de " " ... 500 pg/ml
- 0'2ml (1000pg/ml) +0'6ml de " " ... 250 pg/ml
- 0'1ml (1000pg/ml) +0'9ml de " " ... 100 pg/ml

##### b) Preparación del anticuerpo el día del análisis.

Si hemos utilizado el lote 38 diluir a 1/40 con buffer análisis para que quede a 1/4000 inicial y 1/24000 final.

Si utilizamos el lote 1 diluir a 1/50 para que quede a 1/25000 inicial y 1/150000 final.

##### c) Preparación del glucagón I<sup>125</sup> el día del análisis.

Diluir el trazador según el tiempo pasado desde el marcaje de modo que 0'1 ml equivalgan a 8000 c.p.m. del día del marcaje con buffer análisis.

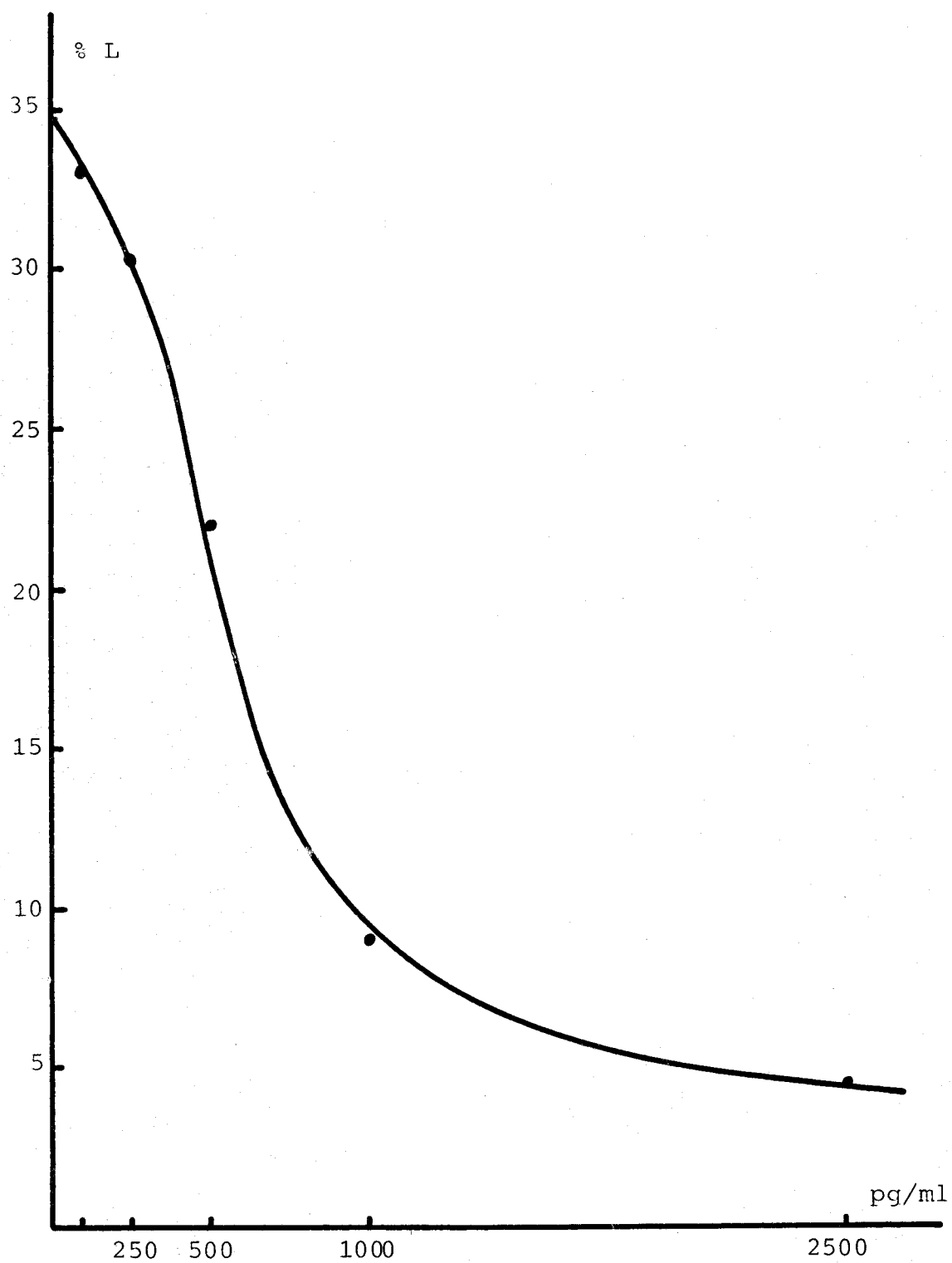


Fig.14 CURVA STANDARD DE GLUCAGON I<sup>125</sup>

La pauta de adición de los reactivos (en tubos por triplicado, a 4°C) es la siguiente:

	buffer análisis	Trasylol	glucagón standard	muestra	anticuerpo
curva standard	0'25 ml	0'05 ml	0'1 ml	-	0'1 ml
control curva	0'35 ml	0'05 ml	0'1 ml	-	-
problemas	0'28 ml	0'05 ml	-	0'02 ml	0'1 ml
control problemas	0'38 ml	0'05 ml	-	0'02 ml	-

Agitar en un mixer todos los tubos.

Incubar dos días a 4°C.

Añadir a todos los tubos (también a 4°C) 0'1 ml de glucagón I<sup>125</sup>. Preparar 10 tubos de actividad total que sólo contengan 0'1 ml de glucagón I<sup>125</sup>.

Agitar todos los tubos en un mixer.

Volver a incubar dos días a 4°C.

Terminada esta última incubación, añadir a todos los tubos a 4°C, (excepto a la actividad total) 0'1 ml de NSS y 0'5 ml de suspensión de carbón (0'5%) y dextrano T 70 0'25% en buffer glicina 0'2 M, pH 8'8 sin albúmina. Agitar esta suspensión constantemente en baño de hielo al menos durante 20 min.

Dejar en baño de hielo reposar durante 30 min todos los tubos después de haber añadido la suspensión de carbón y dextrano.

Centrifugar durante 15 min a 3.000 r.p.m. (centrífuga BECKMAN, mod. TJ-6) a 4°C.

Aspirar el sobrenadante y contar el precipitado y realizar los cálculos exactamente igual que hemos indicado para RIA de insulina.

Leer los valores de % de las muestras de las incubaciones en la curva standard de glucagón, multiplicando los valores de dichas muestras por 5, por haberse



utilizado 20  $\mu$ l de muestra frente a 0'1 ml de la curva standard, obteniéndose así los valores de glucagón liberado en pg/5 islotes/30 min. (Fig. 14).

## 2.5. DETERMINACION DEL AMPc POR PROTEINA ENLAZANTE EN ISLOTES.

La técnica que utilizamos se basa en los trabajos de Gilman (1970), con algunas modificaciones de Cooper et al (1973) para lograr una mayor sensibilidad. La separación del complejo proteína-quinasa AMPc se realiza utilizando carbón activado, según Brown y Ekins (1970). Este método recibe el nombre de proteína enlazante (binding-protein) por referencia a la proteína quinasa dependiente del AMPc.

### Fundamento del radioanálisis por proteína enlazante.

Descrita esta técnica por Gilman en 1970 debido a la existencia de unas proteínas musculares (trabajos posteriores las encontraron prácticamente en todos los tejidos) aislables por los métodos clásicos de precipitación de proteínas y que para su actividad biológica necesitan la presencia de adenosin-monofosfato cíclico (fosforilasa quinasa, quinasa dependiente de AMPc), con el que mantiene una alta afinidad específica.

El descubrimiento de una proteína estable al calor que inhibe la acción catalítica del enzima anterior (Appleman y Kemp, 1966) que se denomina inhibidor de la proteína quinasa y que aumenta la estabilidad del complejo proteína-AMPc.

Fundamentalmente la reacción consiste en una competición

entre el AMPc no radiactivo y el AMPc ( $H^3$ ), por enlazar la subunidad reguladora R de la proteína quinasa. A saber la diferencia en la concentración de un AMPc no radiactivo y otro tritiado, que a volúmenes iguales hay o existe una variación en la masa de sustancia y por tanto en el número de moléculas, implica una desigual probabilidad de interacción con la proteína-quinasa del medio de incubación y enlazarse a sus locus activos.

En el equilibrio coexisten los siguientes componentes:

- (AMPc)=(A): concentraciones del nucleótido sin marcar. Posee concentraciones variables en la curva patrón.
- (AMPc  $H^3$ )=(B): concentración del nucleótido tritiado. A todos los tubos del radioensayo se les pone igual cantidad.
- (P): concentración constante de proteína quinasa.
- (I): concentración constante del inhibidor.
- (P-AMPc) = (P-A): concentración del complejo no radiactivo.
- (P-AMPc  $H^3$ )=(P-B): concentración del complejo radiactivo. Es el componente del que se mide la radiactividad.

### 2.5.1. Preparación del AMPc.

Las dos formas de adenosín-monofosfato cíclico que se han utilizado se prepararon de la siguiente forma:

#### a) AMPc no radiactivo. Espectrofotometría.

Las soluciones que se han utilizado del AMPc se hicieron a partir de una preparación comercial monohidratada (3'-5' adenosín-monofosfato cíclico H<sub>2</sub>O, Boheringer). Se disuelve en una solución tampón fosfato potásico 50 mM, pH 6'5 preparada con agua bidestilada y desionizada.

La concentración se calcula por espectrofotometría, a partir del valor del coeficiente de extinción según Smith (1961): a pH 7 y a una longitud de onda de 259 m $\mu$  con un coeficiente de extinción de 14'650 para una concentración de AMPc 1 mM. A partir de esta concentración patrón se preparan concentraciones más diluidas.

#### b) AMPc radiactivo.

El AMPc tritiado se obtiene comercialmente (the Radiochemical Center) como sal amónica. Se prepara en una primera fase por evaporación en una atmósfera de nitrógeno, del agua/alcohol en que viene disuelta. Después se diluye con una solución tampón fosfato potásico 50 mM, pH 6'5 para obtener una concentración final de 1 pmol/10 $\mu$ l.

### 2.5.2. Obtención y purificación de la proteína-quinasa.

Estos enzimas necesitan para su activación, la presencia de AMPc. Su identificación se realiza a partir de su capacidad para catalizar la fosforilación de una proteína (sustrato) con ATP radiactivo y su capacidad para enlazar con el AMPc.

Para obtener la proteína-quinasa se utiliza músculo de conejo.

#### A) Material y reactivos.

Todas las soluciones tampón utilizadas tienen EDTA 1 mM, pH 7'5. Todas las operaciones se realizan en una cámara frigorífica a 4°C. Las soluciones que contienen la proteína se encuentran siempre en recipientes cubiertos de hielo.

Tampón Tris-ClH 5 mM, pH 7'5.

Tampón Tris-ClH 1 M, pH 7'5.

Tampón  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}/\text{PO}_4\text{HK}_2$  1 M, pH 7'2.

EDTA 0'2 M, pH 7'5.

EDTA 4 mM, pH 7'5.

Acido acético 1 N.

NaOH 0'5 N.

### Preparación de DEAE-celulosa.

La DEAE-celulosa (dietilaminoetil-celulosa) es una resina amónica débil. Contiene el grupo amino cargado positivamente a pH 7'5. Antes de su uso la resina se sometió a los siguientes tratamientos, según la técnica de Devenyi y Gergely (1974).

- a) 45 g de DEAE celulosa se agitan durante 15 min con 5 soluciones de NaOH 0'5 N a temperatura ambiente se deja sedimentar y se sacan las partículas coloidales del sobrenadante alcalino.
- b) Se lava la resina varias veces con agua bidestilada hasta que el pH desciende hasta la neutralidad. Estas dos fases constituyen el pretratamiento.
- c) La resina DEAE celulosa se resuspende a tres volúmenes de solución tampón Tris ClH 5 mM pH 7'5 EDTA 2 mM. Se agita durante 15 min a temperatura ambiente y se decanta el sobrenadante para eliminar las partículas finas. Esta operación se realiza dos veces. La resina ya está lista para el llenado de la columna.

### Columna cromatográfica.

Para que el empaquetamiento de las partículas sea lo más homogéneo posible se llena la columna (30x3'9 cm) hasta la mitad de su altura con solución tampón Tris-ClH 5 mM pH 7'5 EDTA 2 mM. Sobre ella se echa lentamente la suspensión de DEAE celulosa tratada. Una vez formado el lecho cromatográfico hasta la altura deseada, se vacía la columna de eluyente hasta la superficie de la resina y se añade 1 ml de una solución de albúmina bovina al 20%, para saturar el vidrio de la columna e impedir la adhesión al mismo de la proteína-quinasa.

### B) Purificación de la proteína-quinasa.

#### a) Preparación del extracto de músculo.

A un conejo (peso 2-3 kg), después de desangrarle, se le cortan los músculos de las extremidades y dorso. Se trocea y se tritura en un homogenizador comercial en 2'5 volúmenes de solución de EDTA 4 mM a pH 7, a intervalos cortos de tiempo, para evitar el calentamiento de la mezcla y recubriendo el vaso homogenizador con hielo.

El homogenado se centrifuga a 10.000xg durante 30 min ( $1g=1'118 \times 10^{-5} \times (r.p.m.)^2 \times r \text{ cm}$ ). Se recoge el sobrenadante y se desecha el precipitado. Las centrifugaciones se realizan a 2°C.

b) Precipitación ácida.

La solución sobrenadante anterior se lleva a pH 6'1 por adición de unas gotas de ácido acético 1 N. Se forma lentamente un precipitado (que contiene a los enzimas fosforilasa quinasa b y la glucógeno sintetasa), el cual se separa por centrifugación a 10.000 x g durante 30 min.

Se recoge la solución sobrenadante y se ajusta a pH 5'5, por adición de ácido acético 1 N. Se centrifuga a 10.000 g durante 30 min y el precipitado se desecha.

c) Precipitación con sulfato amónico.

La solución sobrenadante se ajusta a pH 6'8 por adición cuidadosa de una solución tampón de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}/\text{PO}_4\text{HK}_2$  1 M pH 7'2 fría. Conseguido esto se añade sulfato amónico (32'5 g/100 ml de solución proteica). Se agita durante 2 h y al cabo de este tiempo se centrifuga durante 60 min a 10.000 x g y se recoge el precipitado. (El sobrenadante se desecha). El precipitado se disuelve en unos 50 ml (como criterio general: en el volumen mínimo necesario para su disolución) de solución tampón Tris-ClH 5mM pH 7'5 y se dializa durante 48 h en 20 vol. de igual solución tampón, en membrana de celofán, con tres



cambios de solución tampón. La solución proteica se centrifuga a 40.000 g durante 1h, y el precipitado se desecha. El sobrenadante se somete a cromatografía.

d) Cromatografía en DEAE-celulosa.

Una vez formada la columna y añadida la solución de albúmina bovina, cuando ésta haya descendido a la superficie, se añade lentamente la solución proteica, con cuidado de no remover la resina. Se deja fluir lentamente, recogiendo fracciones de 13/15 ml en un colector de fracciones, con una velocidad de flujo de 0'5 ml/min. Se recogen 115-120 tubos.

La columna cromatográfica está conectada a un "doble sistema" para producir un gradiente de concentración de solución tampón Tris-ClH pH 7'5 desde 5 mM a 500mM. Este "doble sistema" se compone de dos matraces conectados : el primero con una concentración de 5 mM y el segundo que fluya hacia el primero con una concentración doble de la máxima buscada: 1000 mM y ambos con igual volumen. El primer matraz, en conexión con la columna, aumenta de forma gradual su concentración hasta llegar a la concentración final de 500 mM. Este sistema, productor de un gradiente de concentración, se hace funcionar hacia la fracción nº 20.

### Determinación de la capacidad enlazante de los eluidos.

La capacidad de unión para el cAMP de las fracciones recogidas en la cromatografía se realiza según el proceso que se describe : se incuba durante 90 min a 0°C los siguientes componentes:

- 50  $\mu$ l de solución tampón de fosfato potásico: (PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K/PO<sub>4</sub>HK). 200 mM pH 6'5 + teofilina (8mM) + mercaptoetanol (6 mM) + albúmina bovina 20 %.
- 10  $\mu$ l (1 nmol) de cAMP (H<sup>3</sup>) (según se describe Material y Método, 2.5.1 - a).
- 100  $\mu$ l de las alícuotas de cada fracción cromatográfica.

Se mezcla brevemente en un "mixer" magnético y se incuba en agua-hielo (2°C) hasta alcanzar el equilibrio.

En aquellas fracciones donde hay proteína-quinasa, se forma un complejo con el cAMP (H<sup>3</sup>) libre. Realizando la separación por la técnica del carbón activado: utilizando una suspensión de carbón (2'6 %) y albúmina (2 %) preparada 15-20 min antes de su utilización, en agitación constante a 4°C. Las moléculas pequeñas, como el cAMP son adsorbidas por él pero los complejos macromoleculares permanecen en solución (como la proteína-quinasa enlazada al cAMP). Se obtiene así una buena separación entre las formas libre y complejas del cAMP.

### 2.5.3. Aislamiento de la proteína inhibidora de la proteína-quinasa.

La preparación del inhibidor fue realizada según la técnica descrita por Appleman y Kemps (1966) , con algunas modificaciones de Gilman (1970). Su obtención está muy favorecida por ser un compuesto estable al calor.

Tanto la homogenización del músculo de conejo con EDTA 4 mM pH 7, para obtener el extracto del músculo con posterior centrifugación (10.000 g) durante 30 min, como la precipitación con ácido acético 1 N del sobrenadante anterior, hasta conseguir una solución con un pH comprendido entre 5'9 y 6'1. Se realiza en iguales condiciones que para la obtención de la proteína-quinasa.

Partimos de la solución del sobrenadante ácido (pH 6'1) y realizamos los siguientes procesos a temperatura ambiente:

- a) Se añade el sobrenadante lentamente y con agitación NaOH 1 N hasta llevar el pH a la neutralidad.
- b) La solución a pH 7 se calienta a baño María hasta ebullición durante 20 min con agitación vigorosa, la suspensión obtenida se enfría en un baño de hielo a 10°C y se filtra sobre papel para eliminar las partículas materiales.

c) Al líquido filtrado se añade una solución de TCA 50% en una relación de volúmenes 1:9 (ácido solución) se obtiene un precipitado blanco que se separa por centrifugación a 10.000 g durante 20 min.

d) El sobrenadante de la centrifugación se desecha y el precipitado blanco se disuelve en agua lentamente, ajustando el pH 7 con NaOH 0'1 N cuidadosamente.

e) La solución obtenida se dializa extensamente en celofan contra agua bidestilada durante 48 h con 4 cambios de agua. Aparece un precipitado que se elimina por centrifugación a 40.000 g durante una hora.

La solución obtenida se utiliza como preparación de la proteína inhibidora. Se divide en alícuotas de 0'5 ml que se congelan a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

#### 2.5.4. Determinación del cAMP en islotes.

##### a) Obtención previa del cAMP en islotes.

Partimos de 25 islotes aislados e incubados, como hemos indicado anteriormente (Material y Método apartado n° 2.2).

Terminada la incubación se sonica (durante 10 s) el tubo en el que se ha realizado la incubación de los islotes, se añade 1 ml de TCA al 30%, se homogeniza en un mixer durante 2 min y se centrifuga a 3.000 r.p.m. durante 10 min.

Se extrae el sobrenadante, para eliminar al TCA, con

éter saturado de agua (una parte del sobrenadante y tres de la solución de éter). Eliminando el exceso de éter (capa superior) con una pipeta Pasteur conectada a una trompa de agua al vacío. Repitiendo esta operación cuatro veces.

La capa inferior (después de haber sido eliminado todo indicio de éter) se congela a 20°C y se liofiliza (Liofilizador Virtis).

El día del análisis se constituye el liofilizado con 75  $\mu$ l de una solución de buffer fosfato potásico 50 mM pH 6'5.

b) Técnica del radioensayo por "proteína enlazante".

Los componentes de la reacción son los siguientes:

- 1) 3'-5' adenosín-monofosfato cíclico (cAMP), en sus dos formas, tritiado y no radioactivo.
- 2) Proteína-quinasa, dependiente del cAMP.
- 3) Proteína inhibidora de la proteína-quinasa..
- 4) Solución tampón a una concentración y pH apropiados para alcanzar la máxima actividad enlazante de la proteína.
- 5) Un medio de separación de la fracción ligada y libre.

La preparación de los tres primeros componentes ya ha sido descrita anteriormente. Se describen seguidamente las tres fases operativas en que hemos dividido la técnica.

- A) PREINCUBACION
- B) INCUBACION
- C) SEPARACION DEL COMPLEJO cAMP-PROTEINA.

A) Preincubación.

Ponemos en contacto, en el tampón apropiado, a la proteína-quinasa, al inhibidor y al cAMP no radioactivo. La razón de no añadir el cAMP ( $H^3$ ) es la siguiente: la concentración del nucleótido no radioactivo en los puntos primeros de la curva patrón, y, sin duda, en algunas muestras problemas, es inferior a la concentración de su homólogo radioactivo. De esta manera se permite que el primero ocupe sin ninguna competición todos los "locus" activos de la proteína-quinasa que por su concentración en el medio pueda enlazar.

Material.

- Solución tampón:

a)  $PO_4H_2K/PO_4HK_2$  0'2 M pH 6'5. A una concentración final de 0'100 M. Además contiene:

- teofilina (8 mM). Para inhibir a la posible fosfodiesterasa del cAMP, que pudiera encontrarse bien en la preparación de la proteína, o en las muestras.

- 2-mercaptoetanol (6 mM). Actúa como reductor de los enlaces S-S de la proteína-quinasa.

- EDTA (5 mM). Como quelante del  $Mg^{+2}$ .

- Albúmina sérica bovina (20%).

La elección de un pH apropiado es de fundamental importancia para obtener la máxima reaccionabilidad de la proteína, pH 6'5.

Las soluciones anteriores se preparan semanalmente. La adición de la albúmina se realiza en el momento de su utilización.

- cAMP patrón.

A partir de la solución preparada por espectrofotometría (2.5.1-a) conseguimos por diluciones sucesivas las concentraciones de cAMP que nos interesan para establecer la curva patrón. (fig. 15).

A partir de la solución patrón (800 pmol/ml), obtenemos las siguientes diluciones:

Sol.1:	800 pmol/ml .....	16 pmoles/20,ul
" 2:	400 pmol/ml .....	8 pmoles/20,ul
" 3:	200 pmol/ml .....	4 pmoles/20,ul
" 4:	100 pmol/ml .....	2 pmoles/20,ul
" 5:	50 pmol/ml .....	1 pmoles/20,ul
" 6:	25 pmol/ml .....	0'5 pmol/20,ul
" 7:	10 pmol/ml .....	0'20pmol/20,ul
" 8:	5 pmol/ml .....	0'10pmol/20,ul

Las diluciones se realizan con el medio de incubación. Se guardan a  $0^{\circ}$ - $4^{\circ}C$  hasta su utilización.

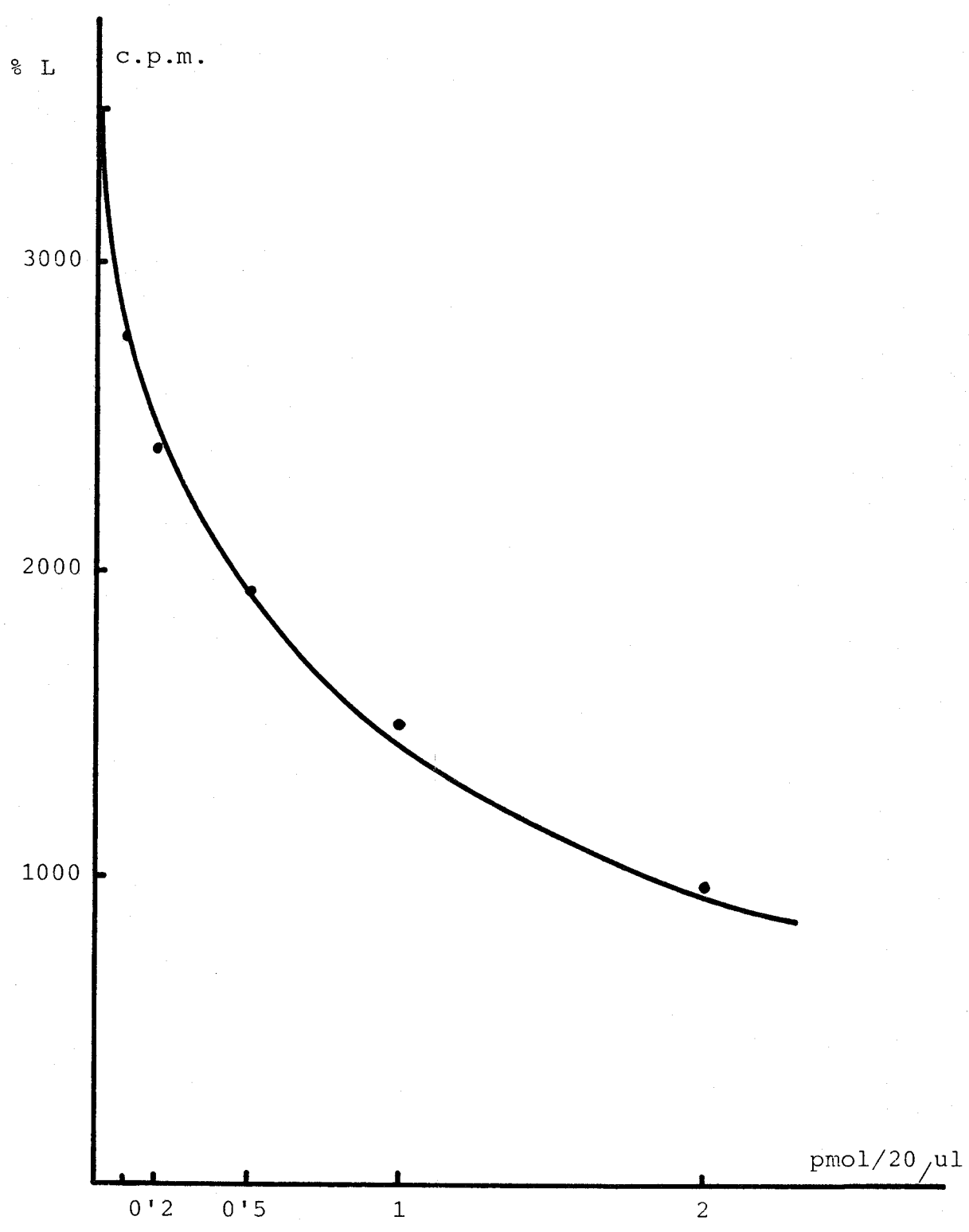


Fig.15 CURVA STANDARD DE cAMP



### Procedimiento.

En tubos de plástico, en agua-hielo (0-4°C) se pipetea las siguientes soluciones:

- 0'050 ml de solución tampón.
- 0'020 ml de las soluciones de cAMP patrón, o de las muestras problema.
- 0'020 ml de solución de proteína-quinasa (a la dilución: 1:2).
- 0'010 ml de la solución de la proteína inhibidora.

Agitamos brevemente en un mixer. Se deja reaccionar a 0-4°C durante 60 min. En estos tubos la única variable la constituye la concentración de cAMP. Se utiliza también otros dos tubos control:

- "Cero": con iguales componentes, pero sin cAMP. El volumen se compensa con tampón.
- "Blanco": únicamente contiene solución tampón.

Cada uno de los puntos señalados se determina por triplicado.

### B) Incubación.

Transcurridos 60 min, se añade a cada tubo, (incluido el "Cero" y "Blanco"):

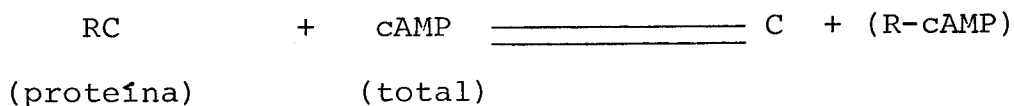
- 0'01 ml de cAMP ( $H^3$ ) (1 pmol/tubo).

Incubamos en baño de  $H_2O$ -hielo durante 90 min. La adición de este volumen debe de hacerse de forma muy cuidadosa. La cantidad de cAMP ( $H^3$ ) adicionado depende

de la sensibilidad que queremos obtener en el método. El criterio principal a seguir es que la proteína-quinasa se encuentra saturada de adenosín monofosfato cíclico.

C) Separación del complejo cAMP-proteína.

En este tiempo se ha alcanzado el equilibrio cinético de la reacción:



La detención de la reacción y separación posterior del complejo R-cAMP de los otros componentes que no han reaccionado se realiza por la técnica del carbón activado.

Técnica del carbón activado.

Transcurrido el tiempo de incubación se añade a cada tubo 0'100 ml de una suspensión, fría, de carbón (2'6%), activado con albúmina sérica bovina (2%).

Se centrifuga a 3.000xg durante 15 min. Se forman alícuotas de 0'100 ml del sobrenadante que se disuelven a 10 ml de líquido de centelleo PCS (para muestras líquidas). Se agita durante 2 min cada vial y en estas condiciones se mide su radioactividad en el contador beta (PG,4000. Intertechnique).

La suspensión de carbón (2'6%) y albúmina (2%) se prepara 15-20 min antes de su utilización. Debe de

estar a 0-4°C y en constante agitación. Las partículas de carbón tienen una estructura interna recorrida por infinidad de canales microscópicos, donde pueden penetrar y adsorberse numerosas sustancias (por ejemplo cAMP, albúmina, dextrano, etc,). Si se saturan esos canalillos carbonados con sustancias de determinados PM, seleccionamos e impedimos la adsorción del carbón para otras con PM superiores. A este proceso de saturación del carbón con albúmina se llama "activación". Las moléculas pequeñas, como el cAMP, son adsorbidas por él, pero los complejos macromoleculares permanecen en solución (como la proteína quinasa enlazada al cAMP). Se obtiene así una buena separación entre las formas libre y complejas del cAMP.

## 2.6. DETERMINACION DE DNA EN ISLOTES AISLADOS.

Basado en el método Fluorimétrico de Kissane y Robins (1958), con ligeras modificaciones. Consistente en que los aldehidos tales como la deoxiribosa dan productos fluorescentes al reaccionar con DABA 2 HCl (ácido 3-5 diaminobenzoico, en forma de clorhidrato).

2.6.1. Material: standard DNA de timo de vaca SIGMA. Preparar una solución de 1 mg/ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  1 N (preparar 10 ml) y conservarlo a 4°C (se conserva 2 o 3 meses). Tanto al prepararlo como cada día que se utilice debe agitarse durante 10 min (no demasiado fuerte pues puede fragmentarse).

Agente de coloración: ácido 3-5 diaminobenzoico (SIGMA).

El frasco debe estar siempre en la oscuridad a 4°C. El día de la prueba disolver 3 g de DABA en tubo de ensayo en 10 ml HCl 4 N y añadir unos 20 mg de carbón activo. Agitar y centrifugar durante 10 min a 3.000 r.p.m.

Pasar el sobrenadante a otro tubo y añadir otra vez la misma cantidad de carbón.

Agitar y centrifugar 10 min a 3.000 r.p.m.

Pasar el sobrenadante a un tubo revestido de aluminio y taparlo, conservándolo a 4° hasta su uso; debe ser antes de 90 min.

### 2.6.2. Método.

Curva standard. Preparar el día antes de la prueba. Una solución de KRB pH 7'4 y 0'1% de BSA (como hemos indicado anteriormente) y añadir a cada tubo de la curva 1 ml.

A partir del stock de 1 mg/ml preparar con  $\text{NH}_4\text{OH}$  1 N 1 ml de las diluciones 500, 250, 125, 63'5 y 31'2  $\mu\text{g}$  de DNA/ml.

Poner por triplicado además del ml de KRB con albúmina (indicado anteriormente) 0'1 ml en tubos de vidrio de 5 ml de capacidad y evaporar a sequedad bajo corriente de aire a temperatura ambiente. Con otro tubo que sólo lleva 1 ml de KRB y albúmina se obtendrá la serie: 0'3'12, 6'25, 25, 50  $\mu\text{g}$ /DNA por tubo (ver fig. n° 16).

### Muestras.

Partimos de 20 islotes aislados de KRB pH 7'4 y 0'1% de BSA. Se congelan a  $-20^\circ\text{C}$  hasta el día de la prueba.

El día de la prueba se descongelan y se sonicán durante 10 s. Todo el proceso siguiente se realiza en hielo a  $4^\circ\text{C}$  con reactivos fríos:

Añadir 2'5 ml de TCA 10% agitar y centrifugar durante 10 min a 3.000 r.p.m. Aspirar el sobrenadante cuidadosamente (aunque quede 0'2 ml no importa para no arrastrar el precipitado).

Añadir 3 ml de eter dietílico, tapar, agitar y centrifugar 10 min a 3.000 r.p.m. Aspirar el sobrenadante como en

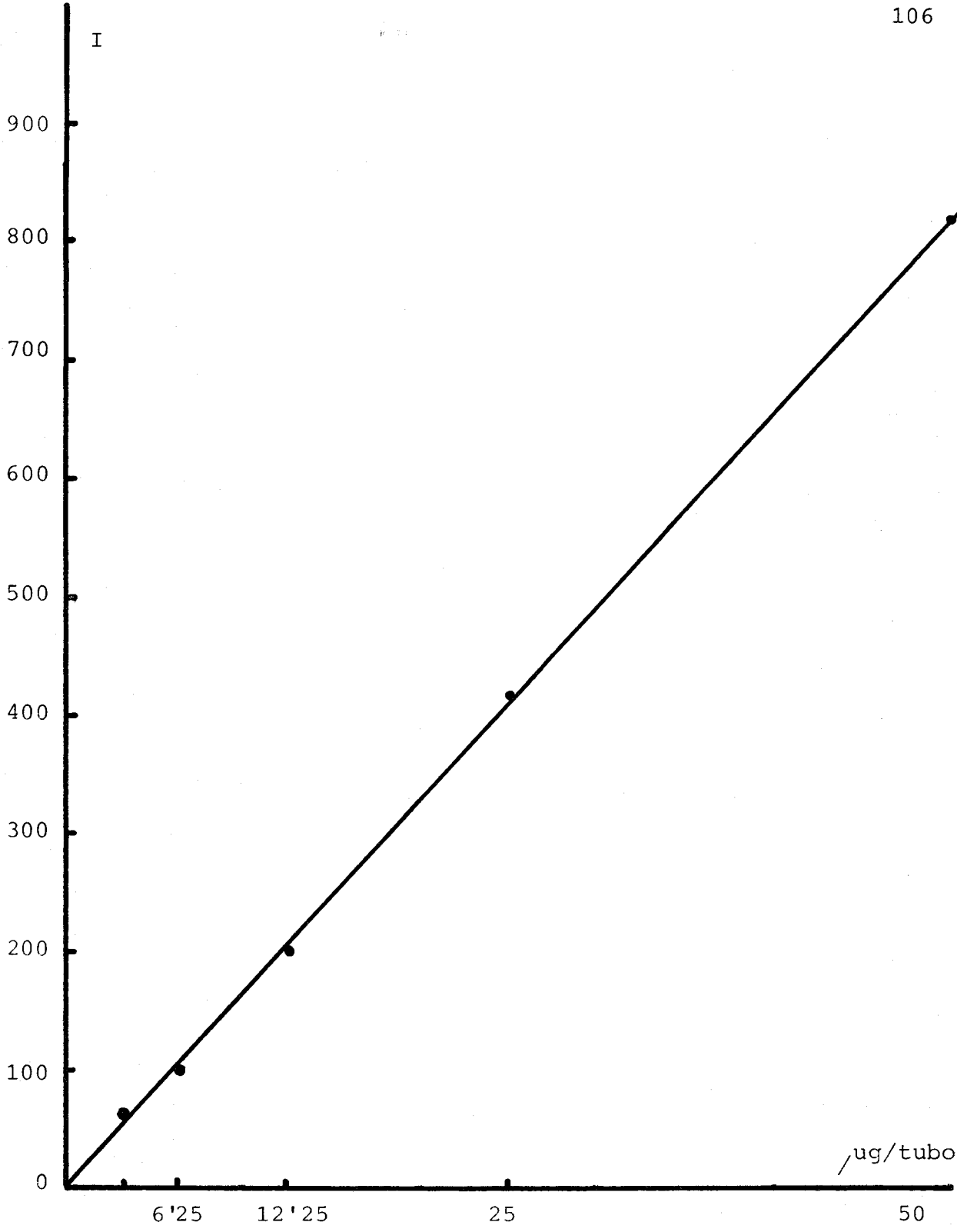


Fig. 16 CURVA STANDARD DE DNA

el caso anterior.

Añadir 3 ml de etanol absoluto, tapar y agitar.

Centrifugar 10 min a 3.000 r.p.m. Aspirar como en el caso anterior el sobrenadante.

Evaporar a sequedad bajo corriente de aire a temperatura ambiente.

### 2.6.3. Reacción.

Añadir a todos los tubos (blancos, standard y problema)

0'1 ml de DABA preparado como se indica anteriormente.

Añadir 1 ml de ácido perclórico 0'6 N y agitar.

Tomar 400  $\mu$ l de cada tubo y mezclarlo con 2 ml de ácido perclórico 0'6 N en otro tubo. La solución fluorescente es estable al menos durante 120min.

Leer frente al blanco la intensidad (I) en fluorímetro para  $\lambda$  absorción = 410 m $\mu$ ,  $\lambda$  emisión = 520 m $\mu$ .

Representar la intensidad(I) emitida frente a  $\mu$ g de DNA tubo para los standard. La lectura directa de la I de los problemas dará  $\mu$ g de DNA por tubo. Como hemos partido de 20 islotes obtendremos los  $\mu$ g de DNA correspondiente a dichos islotes.

## 2.7. DISEÑO EXPERIMENTAL.

### Grupo I. Controles; ayuno y estimulación con glucosa.

I<sub>1</sub>: Controles: a) glucosa 2'75 mM. b) glucosa 16'7 mM.  
c) glucosa 33'4 mM.

I<sub>2</sub>: 4 días de ayuno: a) glucosa 2'75 mM. b) glucosa  
16'7 mM. c) glucosa 33'4 mM.

I<sub>3</sub>: 8 días de ayuno: a) glucosa 2'75 mM. b) glucosa  
16'7 mM. c) glucosa 33'4 mM.

### Grupo II. Ayuno y estimulación con calcio 7'5 mM.

II<sub>1</sub>: Controles: a) glucosa 2'75 mM + calcio 7'5 mM.  
b) glucosa 16'7 mM + calcio 7'5 mM.

II<sub>2</sub>: 4 días de ayuno: a) glucosa 2'75 mM + calcio  
7'5 mM. b) glucosa 16'7 mM + calcio 7'5 mM.

II<sub>3</sub>: 8 días de ayuno: a) glucosa 2'75 mM + calcio  
7'5 mM. b) glucosa 16'7 mM + calcio 7'5 mM.

### Grupo III. Ayuno y estimulación con teofilina 5 mM.

III<sub>1</sub>: Controles: a) glucosa 2'75 mM + teofilina 5 mM.  
b) glucosa 16'7 mM + teofilina 5 mM.

III<sub>2</sub>: 4 días de ayuno: a) glucosa 2'75 mM + teofilina  
5 mM. b) glucosa 16'7 mM + teofilina 5 mM.

III<sub>3</sub>: 8 días de ayuno: a) glucosa 2'75 mM + teofilina  
5 mM. b) glucosa 16'7 mM + teofilina 5 mM.



Grupo IV. Ayuno y realimentación con dieta standard.

IV<sub>1</sub>: 4 días de ayuno + 2 días de realimentación:

a) glucosa 2'75 mM. b) glucosa 16'7 mM.

Grupo V. Ayuno y realimentación con glucosa selectiva por vía oral.

V<sub>1</sub>: 4 días de ayuno + 2 días de realimentación:

a) glucosa 2'75 mM. b) glucosa 16'7 mM.

Grupo VI. Ayuno y realimentación con dibutiril AMPc 2mM.

VI<sub>1</sub>: Controles: a) glucosa 2'75 mM + db-cAMP 2 mM.

b) glucosa 16'7 mM + db-cAMP 2 mM.

VI<sub>2</sub>: 4 días de ayuno: a) glucosa 2'75 mM + db-cAMP 2 mM.

3º RESULTADOS.

## RESULTADOS.

Los resultados correspondientes a las experiencias realizadas se describen en las páginas siguientes, clasificados sistemáticamente en apartados. Cada uno de ellos comprende una breve descripción comentada, junto con las correspondientes tablas (datos individuales, valores medios y errores standard) y figuras. El desarrollo es el siguiente:

- 1.- Contenido de DNA en islotes de Langerhans de ratas alimentadas y de ratas sometidas a ayuno.
- 2.- Secreción de insulina inducida por glucosa en islotes de Langerhans.
  - 2.1.- Glucosa (2'75 y 16'7 mM). Controles, 4 y 8 días de ayuno.
  - 2.2.- Glucosa (2'75, 16'7 y 33'4 mM). Controles y 4 días de ayuno.
- 3.- Secreción de glucagón en presencia de glucosa en islotes de Langerhans.
  - 3.1.- Glucosa (2'75 y 16'7 mM). Controles, 4 y 8 días de ayuno.
  - 3.2.- Glucosa (2'75, 16'7 y 33'4 mM). Controles y 8 días de ayuno.

4.- Efecto de la realimentación con dieta standard o con dieta selectiva (glucosa 20 % por via oral) sobre la secreción de hormonas pancreáticas en islotes de ratas sometidas a ayuno previo.

4.1.- Secreción de insulina.

4.2.- Secreción de glucagón.

5.- Efecto de altas concentraciones de  $Ca^{2+}$  sobre la secreción de hormonas pancreáticas en presencia de glucosa.

Controles 4 y 8 días de ayuno.

5.1.- Secreción de insulina.

5.2.- Secreción de glucagón.

6.- Importancia del AMPc en los mecanismos de secreción de insulina y glucagón en islotes de ratas alimentadas y de ratas sometidas a ayuno.

6.1.- Niveles intracelulares de AMPc en islotes de ratas alimentadas. Modificaciones durante el ayuno. Efecto de la teofilina y de la glucosa.

6.2.- Efecto de la teofilina sobre la secreción de insulina en presencia de glucosa.

6.3.- Efecto del dibutiril-AMPc sobre la secreción de insulina en presencia de glucosa.

6.4.- Efecto del dibutiril-AMPC sobre la secreción de glucagón en presencia de glucosa.

3.1. CONTENIDO DE DNA EN ISLOTES DE LANGERHANS DE RATAS ALI-  
MENTADAS Y DE RATAS SOMETIDAS A AYUNO.

TABLA N° 1

	DNA ( ng/islote )	
	<u>Controles</u>	<u>4 días ayuno</u>
	200	200
	260	250
	250	290
	265	150
	300	160
	150	250
	325	100
	240	150
	300	250
	125	240
	150	200
	160	260
	125	325
$\bar{X}$	219	217
ESM	20	18
n	13	13

No se observan diferencias significativas entre ambos grupos.

### 3.2.- SECRECION DE INSULINA INDUCIDA POR GLUCOSA EN ISLOTES DE LANGERHANS.

#### 3.2.1. Glucosa (2'75 y 16'7). Controles, 4 y 8 días de ayuno.

La figura n° ( 17 ) representa la secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en islotes aislados de ratas controles y sometidas a 4 y 8 días de ayuno.

La secreción basal de insulina (glucosa 2'75 mM) disminuyó significativamente al aumentar el periodo de ayuno; un descenso análogo se obtuvo con glucosa 16'7 mM. Por otra parte, es patente la pérdida de la capacidad insulinosecretora de los islotes tras largos periodos de ayuno, puesto que los valores obtenidos a los 8 días de ayuno no difieren significativamente a las dos concentraciones de glucosa utilizadas. En cambio a los 4 días de ayuno los islotes poseen aún una capacidad discriminatoria de los niveles de glucosa.

Los valores individuales, la media y el error standard para cada una de las experiencias indicadas, aparecen en las tablas n° 2, 3 y 4.

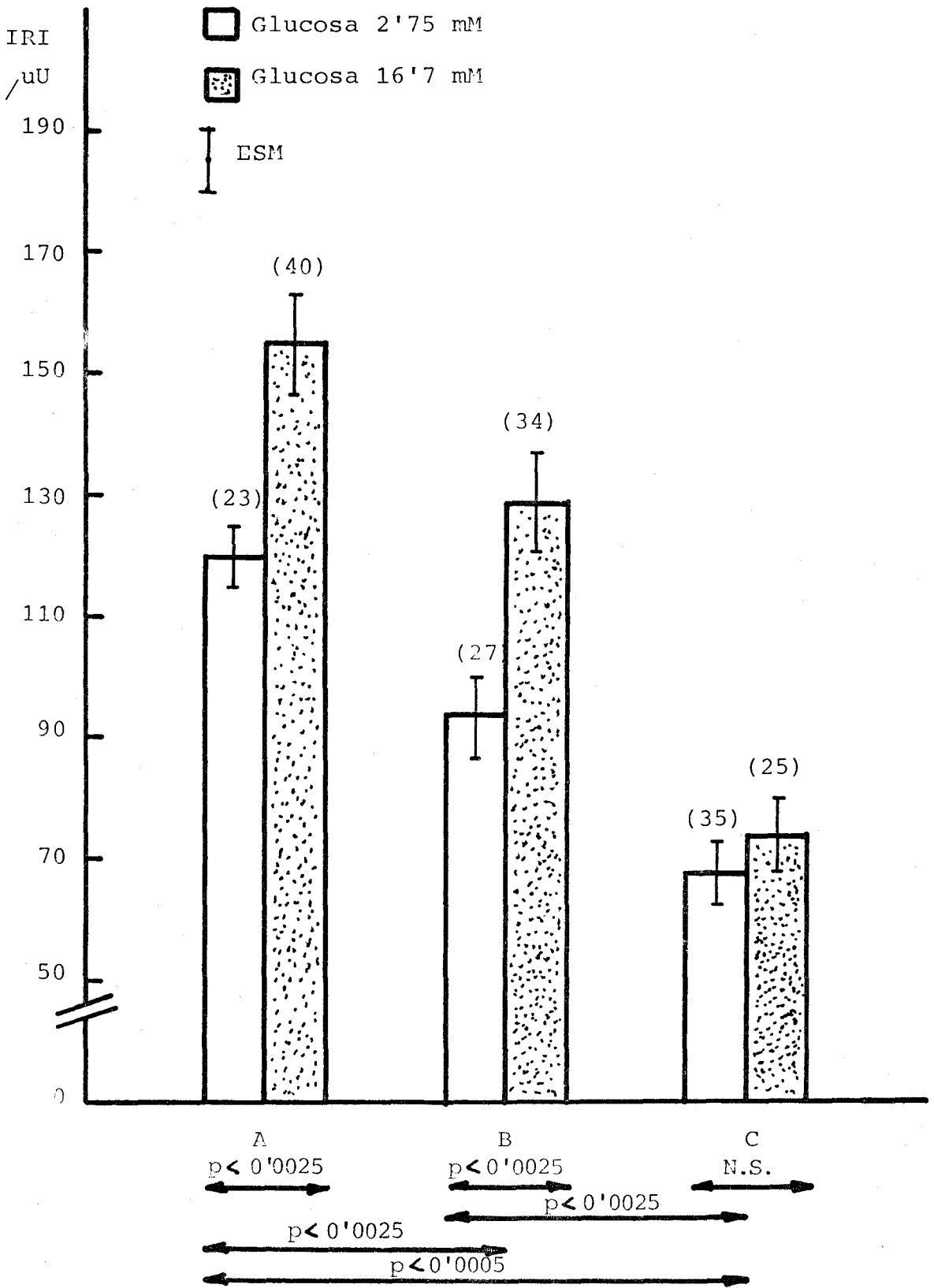


Fig.17 Influencia del ayuno sobre la secreción de insulina inducida por glucosa. A, ratas que han sido alimentadas (controles); B, ratas sometidas a 4 días de ayuno; C, ratas sometidas a 8 días de ayuno. Resultados expresados en  $\mu$ U de insulina liberadas en 30 min por 5 islotes. En abscisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.



TABLA N° 2

Secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en islotes aislados del grupo control.

<u>Incubación n°</u>	<u>Insulina ( <math>\mu</math>U/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	146	112
2	112	117
3	95	162
4	95	91
5	95	130
6	107	104
7	112	145
8	146	124
9	112	162
10	162	91
11	128	100
12	107	108
13	107	148
14	127	97
15	127	117
16	116	91
17	108	248
18	86	187
19	154	196
20	150	166
21	171	166
22	108	171
23	91	182
24		146
25		92
26		166

(sigue)

TABLA N° 2

(continuación)

Insulina (,uU/30min/5 islotes)

<u>Incubación n°</u>	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
27		162
28		171
29		232
30		199
31		311
32		245
33		106
34		132
35		88
36		162
37		224
38		207
39		207
40		154
	$\bar{X}$	
	120'1	155'5
	ESM	
	5'1	8'3
	n	
	23	40

TABLA N° 3

Secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en islotes aislados del grupo de 4 días de ayuno.

<u>Incubación n°</u>	<u>Insulina ( <math>\mu</math>U/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	119	187
2	111	153
3	173	207
4	122	136
5	51	105
6	71	173
7	63	85
8	43	105
9	119	71
10	85	105
11	136	76
12	63	97
13	51	131
14	77	105
15	37	182
16	106	238
17	85	114
18	85	63
19	76	71
20	71	145
21	136	97
22	60	114
23	102	68
24	114	187
25	145	148
26	106	106
27	131	114

(sigue)

TABLA N° 3

(continuación)

<u>Incubación n°</u>	<u>Insulina (,uU/30min/5 islotes)</u>		
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>	
28		97	
29		104	
30		128	
31		165	
32		165	
33		122	
34		230	
	$\bar{X}$	94	129'2
	ESM	6'8	8
	n	27	34

TABLA N° 4

Secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en islotes aislados del grupo de 8 días de ayuno.

<u>Incubación n°</u>	<u>Insulina ( <math>\mu</math>U/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	51	71
2	85	128
3	71	34
4	60	29
5	63	26
6	17	63
7	71	113
8	60	110
9	63	77
10	17	37
11	71	85
12	60	63
13	85	55
14	110	68
15	85	77
16	131	48
17	29	51
18	51	110
19	34	113
20	29	105
21	34	105
22	106	71
23	77	77
24	34	55
25	60	88
26	88	

(sigue)

TABLA N° 4

(continuación)

Insulina ( $\mu$ U/30min/5 islotes)

<u>Incubación n°</u>	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
27	128	
28	63	
29	42	
30	85	
31	96	
32	131	
33	55	
34	71	
35	77	
	$\bar{X}$	
	68'3	74'4
	ESM	
	5'1	5'9
	n	
	35	25

3.2.2. Glucosa (2'75, 16'7 y 33'4 mM). Controles y 4 días de ayuno.

La figura n°(18) representa la influencia de la glucosa sobre la secreción de insulina, a tres concentraciones (glucosa 2'75, 16'7 y 33'4 mM) en islotes aislados de ratas controles y sometidas a 4 días de ayuno.

La secreción basal de insulina (glucosa 2'75 mM) disminuyó significativamente con el periodo de ayuno; los mismos resultados se obtuvieron con glucosa 16'7 mM y 33'4 mM. Por otra parte es patente, tanto en el grupo control como en el de 4 días de ayuno, un aumento de la secreción de insulina al elevar la concentración de glucosa (de 2'75 a 16'7 mM), siendo muy significativa la diferencia entre ambas concentraciones. Sin embargo no se observan diferencias significativas a altas concentraciones del carbohidrato (de 16'7 mM a 33'4 mM).

Los valores individuales, la media y el error standard para cada una de las experiencias indicadas, aparecen en las tablas n°5 y 6.

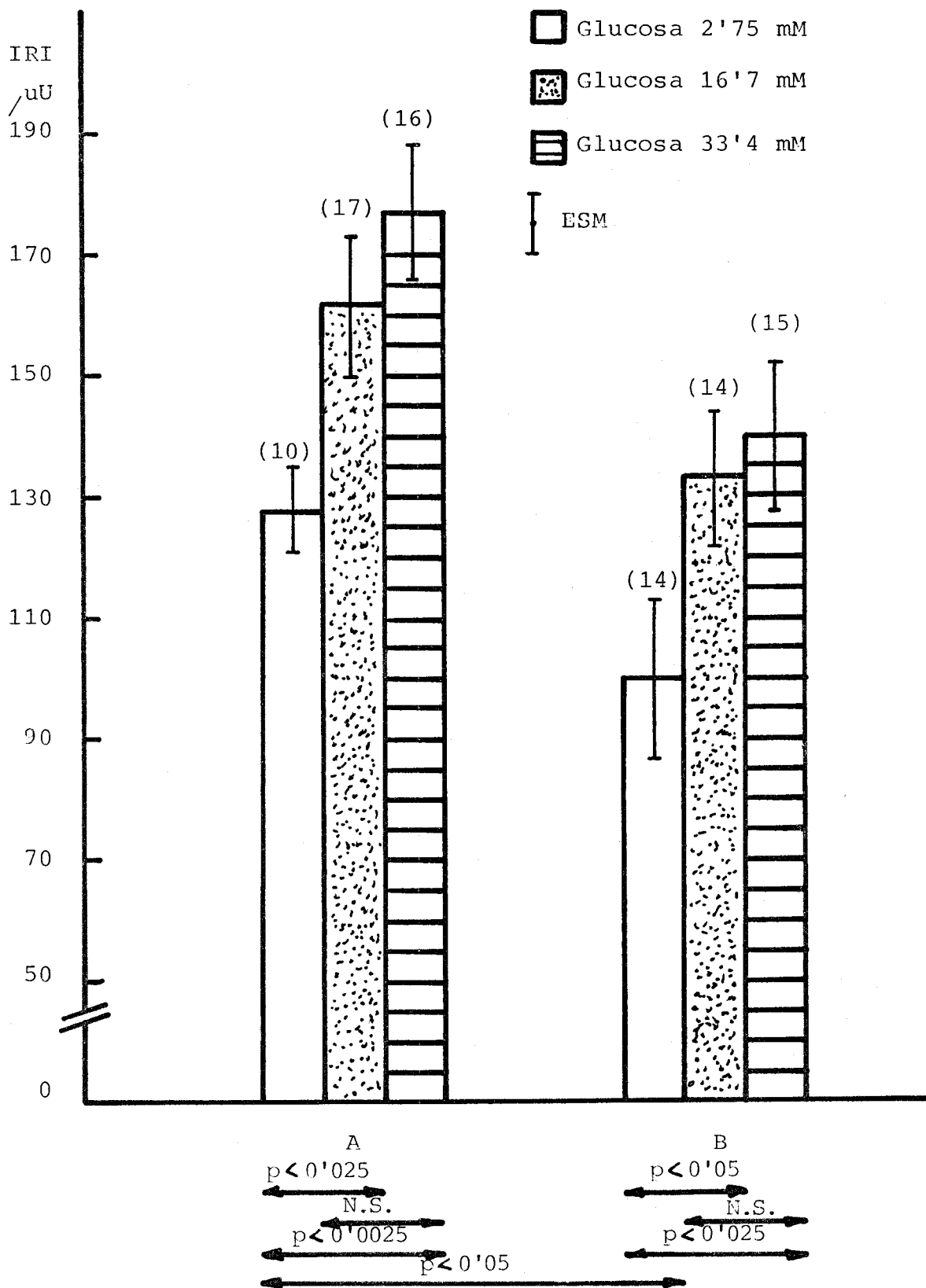


Fig.18. Influencia de la glucosa sobre la secreción de insulina en el ayuno. A, ratas que han sido alimentadas (controles); B, ratas sometidas a 4 días de ayuno. Resultados expresados en  $\mu$ U en insulina liberadas en 30 min por 5 islotes. En abscisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.



TABLA N° 5

Secreción de insulina a tres concentraciones de glucosa (2'75, 16'7 y 33'4 mM) en islotes aislados del grupo control.

Incubación n°	Insulina ( $\mu$ U/30 min/5 islotes)			
	Glucosa 2'75mM	Glucosa 16'7mM	Glucosa 33'4mM	
1	112	100	138	
2	117	112	92	
3	112	92	175	
4	117	200	187	
5	117	200	142	
6	150	250	200	
7	112	212	212	
8	175	150	117	
9	125	162	237	
10	152	212	215	
11		195	217	
12		145	182	
13		190	255	
14		177	147	
15		120	137	
16		145	182	
17		97		
	$\bar{X}$	128'9	162'3	177'2
	ESM	7'4	11'8	11'7
	n	10	17	16

TABLA N° 6

Secreción de insulina a tres concentraciones de glucosa (2'75, 16'7 y 33'4 mM) en islotes aislados del grupo de 4 días de ayuno.

<u>Incubación n°</u>	<u>Insulina ( ,uU/30 min/5 islotes)</u>			
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>	<u>Glucosa 33'4mM</u>	
1	30	155	80	
2	42	100	90	
3	90	187	237	
4	112	100	175	
5	55	137	125	
6	80	200	117	
7	155	187	167	
8	162	80	93	
9	80	140	155	
10	47	87	117	
11	90	82	145	
12	142	132	85	
13	152	132	190	
14	165	150	157	
15			177	
	$\bar{X}$	100'1	133'5	140'7
	ESM	13'3	11'1	12
	n	14	14	15

### 3.3.- SECRECION DE GLUCAGON EN PRESENCIA DE GLUCOSA EN ISLOTES DE LANGERHANS.

#### 3.3.1. Glucosa (2'75 y 16'7 mM). Controles, 4 y 8 días de ayuno.

La figura n° ( 19 ) representa la secreción de glucagón en presencia de glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en islotes aislados de ratas controles y sometidas a 4 y 8 días de ayuno.

La secreción basal de glucagón (glucosa 2'75 mM) aumentó significativamente al crecer el periodo de ayuno; un efecto similar se obtuvo con glucosa 16'7 mM. Por otra parte se observó una disminución de la secreción de glucagón al aumentar los niveles de glucosa, siendo patente en el grupo control y a los 4 días de ayuno. Sin embargo, hay una pérdida de la capacidad discriminadora de los niveles de glucosa sobre la secreción de glucagón en los islotes tras largos periodos de ayuno (8 días), puesto que los valores obtenidos no difieren significativamente a ambas concentraciones del carbohidrato.

Los valores individuales, la media y el error standard de cada una de las experiencias indicadas, aparecen en las tablas n°7, 8 y 9.

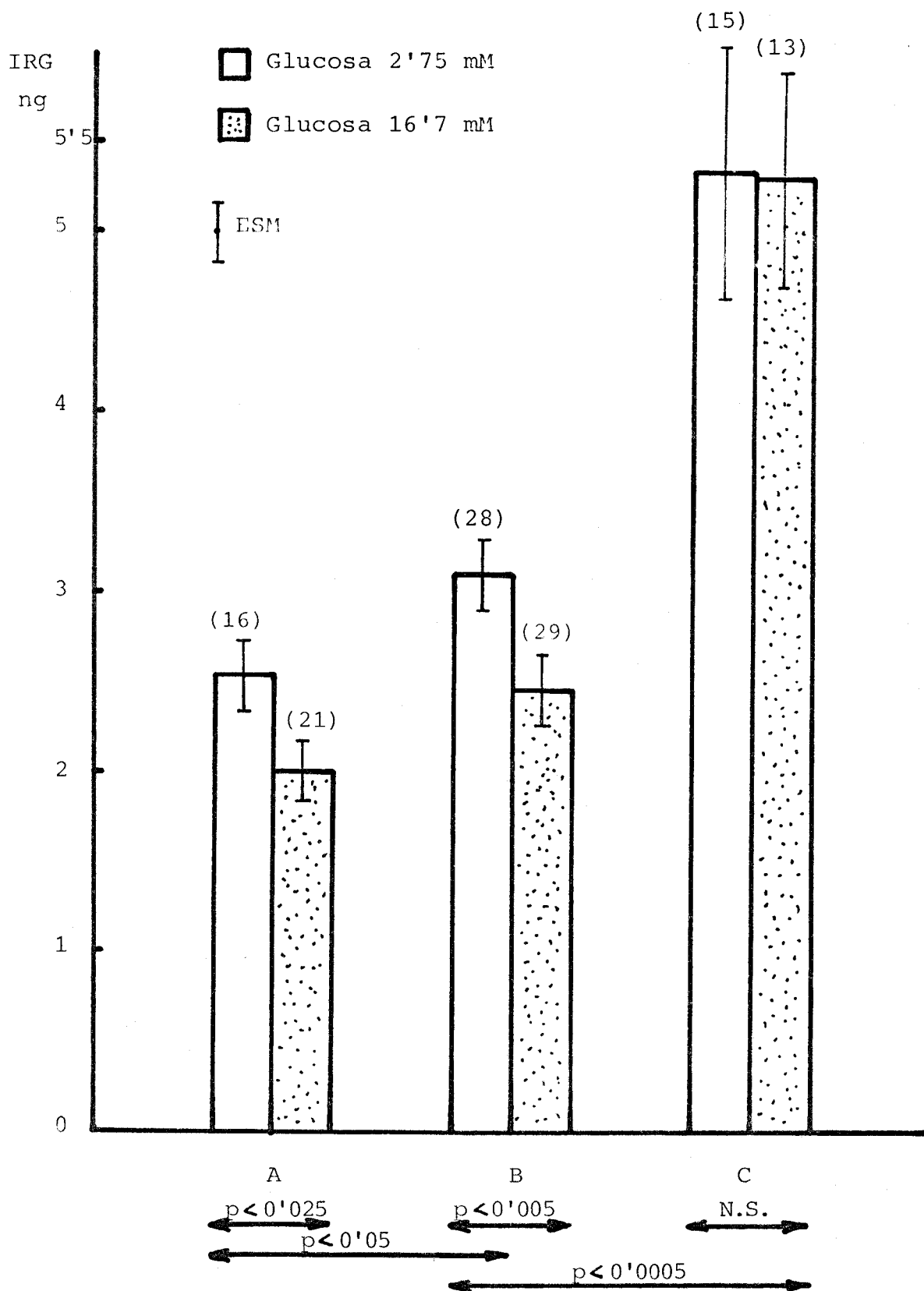


Fig.19 Influencia del ayuno sobre la secreción de glucagón en presencia de glucosa.

A, ratas que han sido alimentadas (controles); B, ratas sometidas a 4 días de ayuno; C, ratas sometidas a 8 días de ayuno.

Resultados expresados en ng de glucagón liberados en 30 min por 5 islotes. En abcisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.

TABLA N° 7

Secreción de glucagón en presencia de glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en islotes aislados del grupo control.

<u>Incubación n°</u>	<u>Glucagón (ng/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	3'8	1'6
2	1'6	2
3	4'2	1'2
4	2'5	1
5	2'5	2'2
6	1'6	2'2
7	2	2
8	1'8	2'4
9	3'2	3
10	2	2'8
11	3'6	1
12	3'2	2
13	1'8	0'8
14	2'6	1'6
15	2'2	1'8
16	2'4	2
17		3
18		2'1
19		2'4
20		3
21		2'4
	$\bar{x}$	2'02
	ESM	0'15
	n	21

TABLA N° 8

Secreción de glucagón en presencia de glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en islotes aislados en el grupo de 4 días de ayuno.

<u>Incubación n°</u>	<u>Glucagón (ng/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	3	2
2	4'6	1'4
3	2	1
4	3	1'4
5	3'6	1
6	4'2	3
7	3	3'5
8	2	3'5
9	3	1'2
10	3'6	2'2
11	4'2	1'6
12	3	2'4
13	2	2'8
14	3'4	2'2
15	2'6	2'4
16	2'6	3
17	4'8	2
18	2'6	2'4
19	2	3'6
20	3	2'6
21	2'4	3'6
22	3	3'8
23	4	3'2
24	2	3'4
25	5'8	2'2
26	2'2	2'2

(sigue)

TABLA N° 8 (continuación)

<u>Incubación n°</u>	<u>Glucagón (ng/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75 mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
27	3	3'5
28	2'2	2'2
29		1'5
$\bar{X}$	3'1	2'44
ESM	0'18	0'16
n	28	29

TABLA N° 9

Secreción de glucagón en presencia de glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en islotes aislados en el grupo de 8 días de ayuno.

<u>Incubación n°</u>	<u>Glucagón (ng/30min/5 islotes)</u>		
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>	
1	2'4	6	
2	8'8	8'8	
3	9'2	8'2	
4	9'2	8	
5	6'8	7	
6	5'8	5	
7	8'5	3'5	
8	6'4	6	
9	5'8	2'8	
10	2'5	4'4	
11	3'8	3	
12	3'2	2'4	
13	2'6	4	
14	2'4		
15	3'4		
	$\bar{X}$	5'38	5'33
	ESM	0'71	0'63
	n	15	13



3.3.2. Glucosa (2'75, 16'7 y 33'4 mM). Controles y 8 días de ayuno.

La figura n° ( 20 ) representa la influencia de la glucosa, a tres concentraciones (2'75, 16'7 y 33'4 mM) sobre la secreción de glucagón en islotes aislados de ratas controles y sometidos a 8 días de ayuno.

la secreción basal de glucagón (glucosa 2'75 mM) aumentó significativamente durante el periodo de ayuno; los mismos resultados se obtuvieron con glucosa 16'7 mM y 33'4 mM. En el grupo control se observa una disminución sobre la secreción de glucagón, al aumentar la concentración de glucosa, siendo significativo el descenso de glucosa 2'75 mM a 16'7 mM; sin embargo no existen diferencias significativas a altas concentraciones de glucosa (de 16'7 mM a 33'4 mM) sobre la secreción de la hormona. En el grupo de 8 días de ayuno no se observan diferencias sobre la secreción de glucagón en las tres concentraciones de glucosa, por pérdida de la capacidad discriminatoria de los niveles del carbohidrato, tras largos periodos de ayuno.

Los valores individuales, la media y el error standard de cada una de las experiencias indicadas, aparecen en las tablas n° 10 y 11.

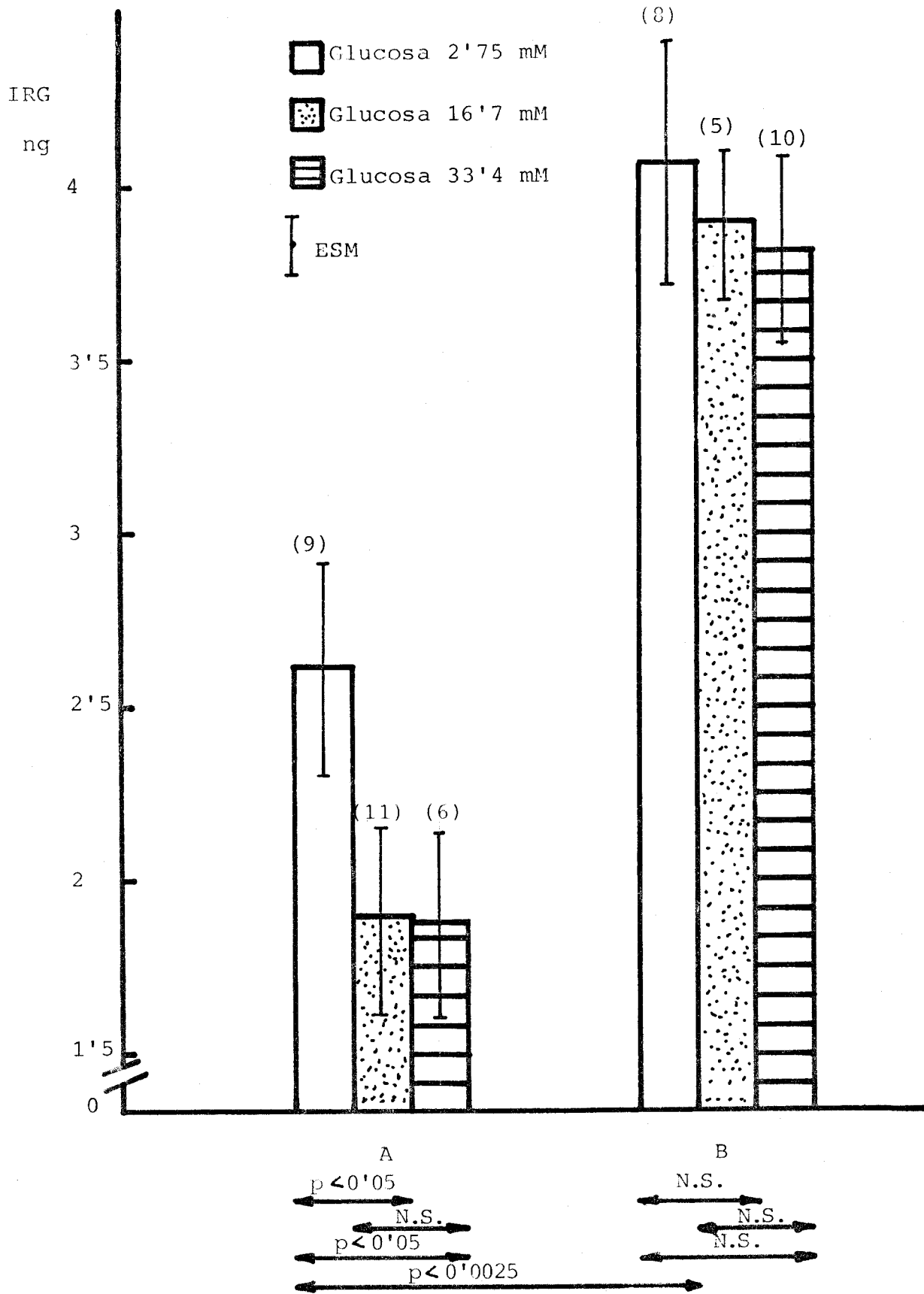


Fig.20 Influencia de la glucosa sobre la secreción de glucagón durante el ayuno prolongado.

A, ratas que han sido alimentadas (controles); B, ratas sometidas a 8 días de ayuno.

Resultados expresados en ng de glucagón liberados en 30min por 5 islotes. En abcisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.

TABLA N° 10

Secreción de glucagón a tres concentraciones de glucosa  
(2'75, 16'7 y 33'4 mM) en islotes aislados del grupo control.

<u>Incubación n°</u>	<u>Glucagón (ng/30min/5 islotes)</u>			
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>	<u>Glucosa 33'4mM</u>	
1	2'2	1'6	1	
2	2'2	1'9	1'9	
3	1'6	2'4	2'7	
4	1'7	2'3	2'3	
5	2'5	1'8	1'5	
6	3'5	2'9	1'9	
7	2'2	2'1		
8	4	1'2		
9	3'6	0'9		
10		3'1		
11		0'5		
	$\bar{X}$	2'62	1'89	1'88
	ESM	0'30	0'25	0'27
	n	9	11	6

TABLA N° 11

Secreción de glucagón a tres concentraciones de glucosa (2'75, 16'7 y 33'4 mM) en islotes aislados en el grupo de 8 días de ayuno.

Incubación n°	Glucagón (ng/30min/5 islotes)			
	Glucosa 2'75mM	Glucosa 16'7mM	Glucosa 33'4mM	
1	6'2	3'8	4	
2	3'9	3'9	4	
3	3'4	4'5	3'7	
4	4'3	3'4	3'3	
5	3'7	3'9	4'9	
6	3'9		3'3	
7	3'1		3	
8	4'2		5'5	
9			2'9	
10			3'6	
	$\bar{X}$	4'09	3'90	3'82
	ESM	0'36	0'20	0'27
	n	8	5	10

3.4.- EFFECTO DE LA REALIMENTACION CON DIETA STANDARD, O CON DIETA SELECTIVA (GLUCOSA 20 % POR VIA ORAL) SOBRE LA SECRECION DE HORMONAS PANCREATICAS EN ISLOTES DE RATAS SOMETIDAS A AYUNO PREVIO.

3.4.1. Secreción de insulina.

La figura n° ( 21 ) representa de un modo global, a efectos comparativos, la secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en islotes aislados de ratas controles (A), sometidas a 4 días de ayuno (B), sometidas a 4 días de ayuno seguidos de 2 días de realimentación con dieta standard (C), o con glucosa selectiva al 20 % por vía oral (D).

Se observa en dicha gráfica que no existen diferencias significativas entre ambos tipos de realimentación, referente a la secreción de insulina, provocada por el ayuno.

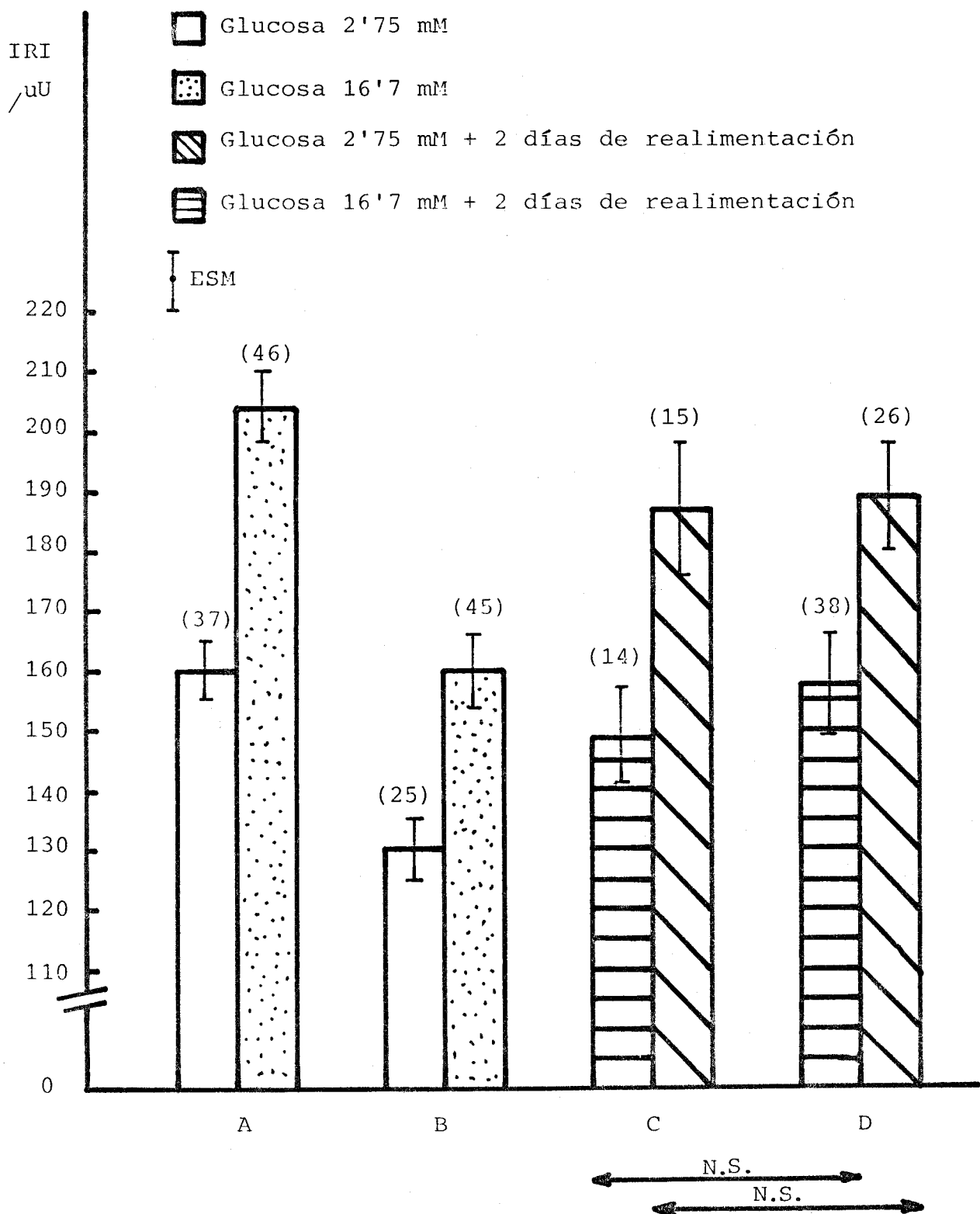


Fig.21 Influencia del ayuno y realimentación sobre la secreción de insulina inducida por glucosa.

A, ratas que han sido alimentadas (controles); B, ratas sometidas a 4 días de ayuno; C, ratas sometidas a 4 días de ayuno seguidos de 2 días de realimentación con dieta standard; D, ratas sometidas a 4 días de ayuno seguidos de 2 días de realimentación selectiva con glucosa al 20 %.

Resultados expresados en  $\mu\text{U}$  de insulina liberadas en 30 min por 5 islotes. En abscisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.

La figura n° ( 22 ) representa la secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en islotes aislados de ratas controles (A), sometidas a 4 días de ayuno (C) y sometidas a 4 días de ayuno y seguidos de 2 días de realimentación con glucosa al 20 % por vía oral.

Por una parte se observa una disminución de la secreción de insulina producida por el ayuno, con respecto al grupo control, a ambas concentraciones de glucosa. Por otra parte, se observa que la realimentación con glucosa selectiva desbloquea la inhibición de la secreción de insulina provocada por el ayuno a ambas concentraciones del carbohidrato, llegando incluso a igualar los niveles del grupo de ratas alimentadas (controles).

Los valores individuales, la media y el error standard de cada una de las experiencias indicadas, aparecen en las tablas n° 12, 13 y 14.

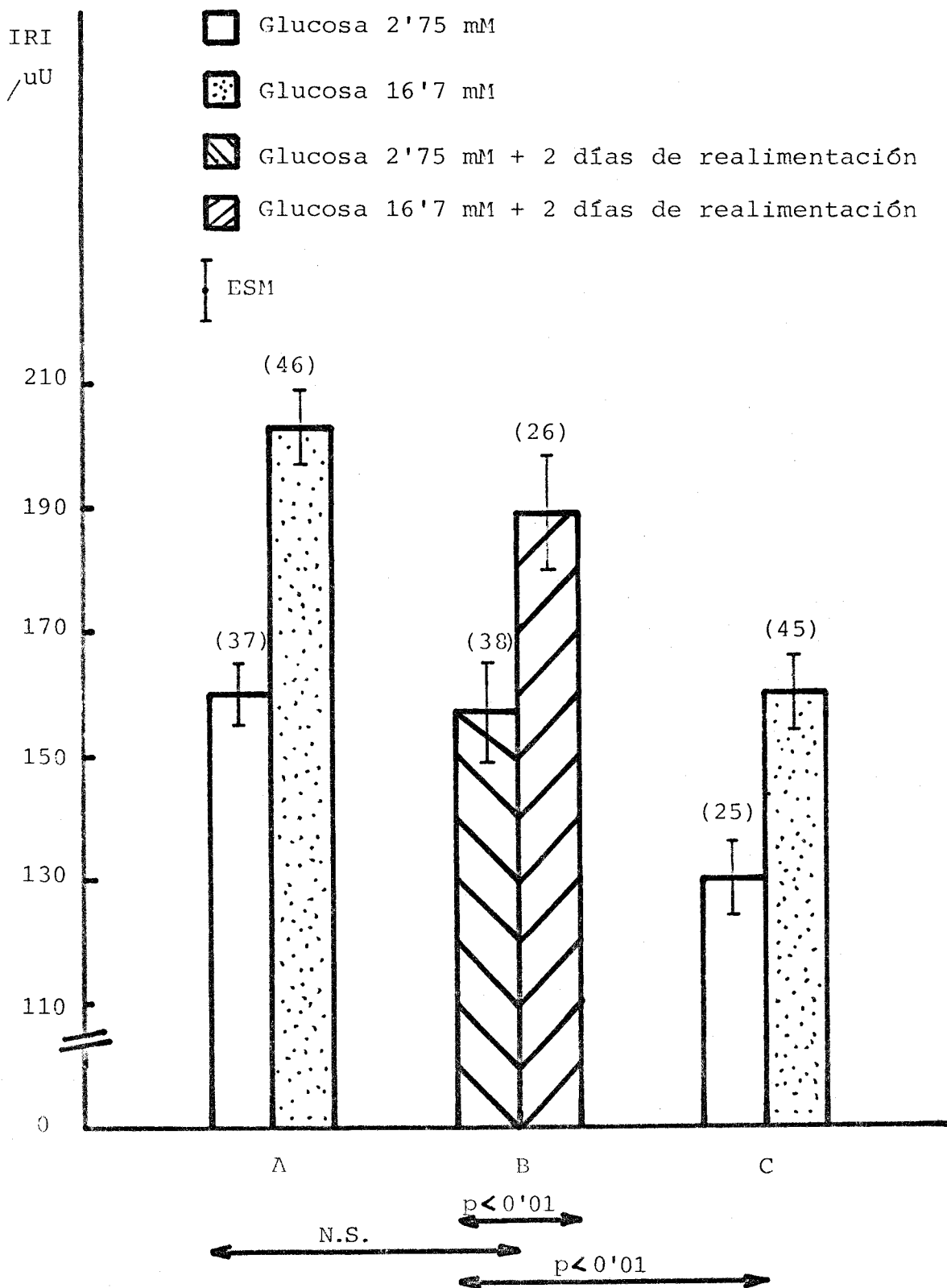


Fig.22 Influencia del ayuno y realimentación selectiva con glucosa sobre la secreción de insulina.

A, ratas que han sido alimentadas (controles); B, ratas sometidas a 4 días de ayuno seguidos de 2 días de realimentación selectiva con glucosa al 20%; C, ratas sometidas a 4 días de ayuno.

Resultados expresados en  $\mu$ U de insulina liberadas en 30 min por 5 islotes. En abscisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.



La figura n° ( 23 ) representa la secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en islotes aislados de ratas controles (A), sometidas a 4 días de ayuno (C) y sometidas a 4 días de ayuno y seguidos de 2 días de realimentación con dieta standard.

Se observa una disminución de la secreción de insulina provocada por el ayuno, con respecto al grupo de ratas alimentadas (controles), a ambas concentraciones del carbohidrato. También se observa que la realimentación con dieta standard desbloquea la inhibición de la secreción de insulina provocada por el ayuno, a ambas concentraciones de glucosa, llegando incluso a igualar los valores producidos por el grupo control.

Los valores individuales, la media y el error standard de cada una de las experiencias indicadas, aparecen en las tablas n° 12, 13 y 15.

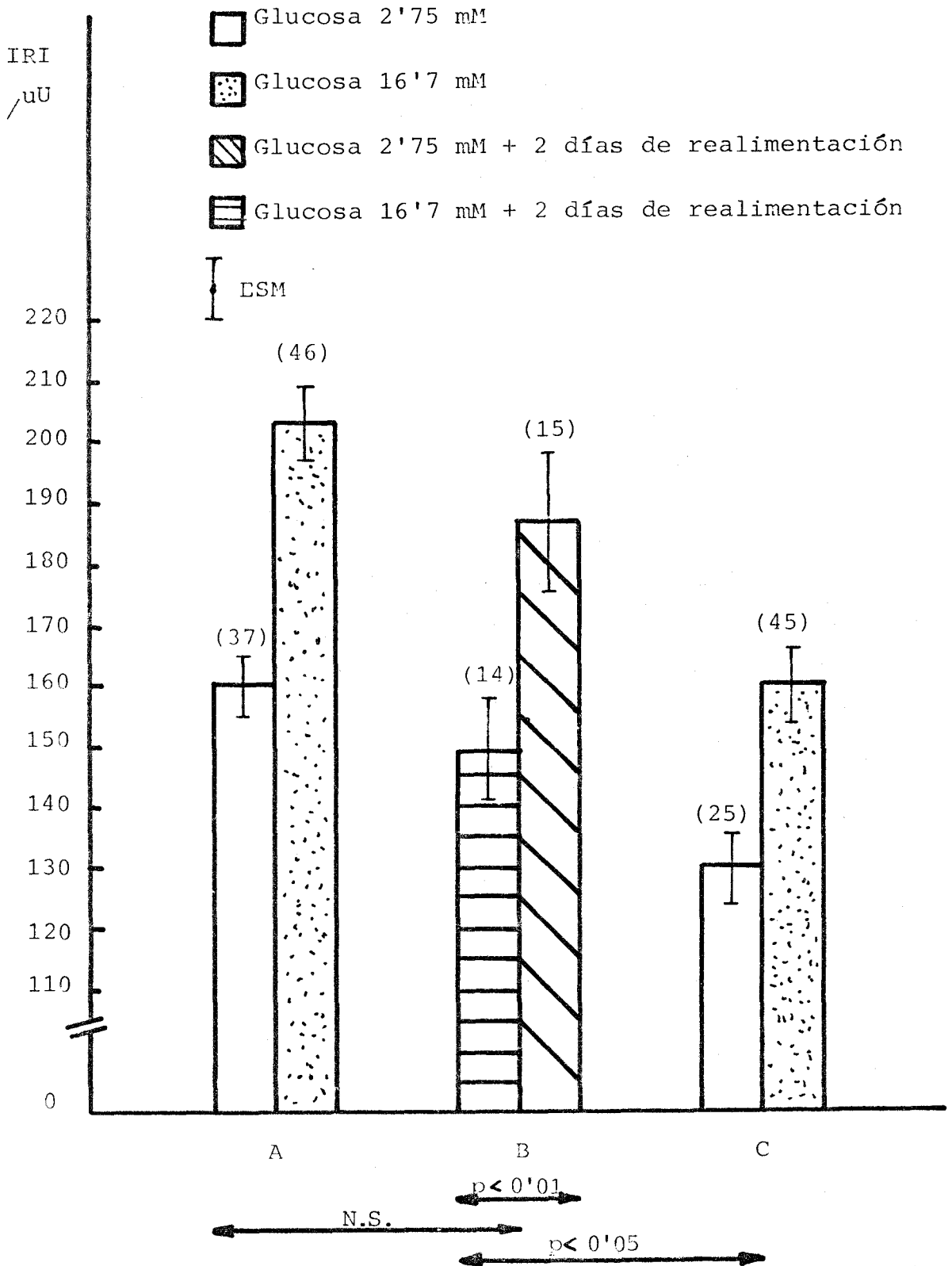


Fig.23 Influencia del ayuno y realimentación con dieta standard sobre la secreción de insulina inducida por glucosa.

A, ratas que han sido alimentadas (controles); B, ratas sometidas a 4 días de ayuno seguidos de 2 días de realimentación con dieta standard; C, ratas sometidas a 4 días de ayuno.

Resultados expresados en  $\mu\text{U}$  de insulina liberadas en 30 min por 5 islotes. En abcisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.

TABLA N° 12

Secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75mM y 16'7mM) en islotes aislados del grupo control.

<u>Incubación n°</u>	<u>Insulina (µU/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	210	250
2	175	155
3	205	200
4	205	255
5	115	195
6	150	165
7	162	110
8	162	170
9	170	150
10	115	125
11	150	187
12	205	230
13	165	250
14	180	220
15	112	180
16	187	287
17	170	220
18	180	205
19	170	160
20	160	225
21	150	210
22	135	270
23	195	215
24	100	275
25	175	130
26	130	165

TABLA N° 12 (Continuación)

Insulina (,uU/30min/5 islotes)

<u>Incubación n°</u>	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
27	175	175
28	162	187
29	137	250
30	150	265
31	200	250
32	140	265
33	150	250
34	137	205
35	187	185
36	150	175
37		150
38		260
39		230
40		237
41		155
42		220
43		195
44		137
45		200
46		187
	$\bar{X}$	
	160'7	203'9
	ESM	
	4'7	6'6
	n	
	37	46

TABLA N° 13

Secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75mM y 16'7mM) en islotes aislados del grupo de 4 días de ayuno.

<u>Incubación n°</u>	<u>Insulina ( <math>\mu</math>U/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	145	90
2	125	185
3	135	200
4	95	112
5	135	137
6	120	120
7	160	150
8	170	220
9	170	130
10	145	100
11	150	112
12	125	112
13	165	170
14	150	150
15	100	220
16	125	160
17	95	205
18	112	225
19	120	220
20	137	170
21	87	200
22	100	187
23	162	170
24	155	235
25	87	195
26		180

TABLA N° 13 (Continuación)

Insulina (  $\mu$ U/30min/5 islotes)

<u>Incubación n°</u>	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
27		125
28		100
29		150
30		138
31		200
32		175
33		115
34		162
35		87
36		175
37		175
38		130
39		150
40		175
41		225
42		135
43		100
44		170
45		170
	$\bar{X}$	160'3
	ESM	6'1
	n	45

130'8

5'4

25

TABLA N° 14

Secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75mM y 16'7mM) en islotes aislados del grupo de 4 días de ayuno y seguidos de dos días de realimentación con glucosa al 20% por vía oral.

<u>Incubación n°</u>	<u>Insulina ( ,uU/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	145	212
2	205	212
3	135	235
4	370	200
5	212	140
6	165	150
7	215	185
8	200	170
9	110	145
10	170	150
11	140	160
12	120	330
13	130	180
14	100	170
15	140	250
16	120	170
17	110	165
18	145	140
19	125	150
20	150	212
21	170	210
22	100	250
23	130	220
24	160	187
25	100	150
26	212	165

TABLA N°14

(Continuación)

Insulina (  $\mu$ U/30min/5 islotes)

<u>Incubación n°</u>	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
27	110	
28	125	
29	140	
30	125	
31	145	
32	250	
33	180	
34	165	
35	160	
36	135	
37	215	
38	162	
	$\bar{X}$	
	157'7	188'8
	ESM	
	8'5	8'8
	n	
	38	26



TABLA N° 15

Secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en islotes aislados del grupo de 4 días de ayuno seguidos de dos días de realimentación con dieta standard.

<u>Incubación n°</u>	<u>Insulina ( <math>\mu</math>U/30 min/5 islotes)</u>		
	<u>Glucosa 2'75 mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>	
1	180	212	
2	125	175	
3	150	170	
4	125	225	
5	140	195	
6	175	187	
7	140	175	
8	120	245	
9	170	175	
10	137	175	
11	150	135	
12	225	300	
13	120	137	
14	125	145	
15		150	
	$\bar{X}$	148'7	186'8
	ESM	8'3	11'8
	n	14	15

### 3.4.2. Secreción de glucagón.

La figura n°( 24 ) representa de un modo global, a efectos comparativos, la secreción de glucagón en presencia de glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en islotes aislados de ratas controles (A), sometidas a 4 días de ayuno (B), y sometidas a 4 días de ayuno y seguidos de 2 días de realimentación con dieta standard (C) o con glucosa selectiva al 20 % por vía oral (D).

No se observan diferencias significativas entre ambos tipos de realimentación con glucosa 2'75 mM en el medio, pero existen diferencias significativas con glucosa 16'7 mM.

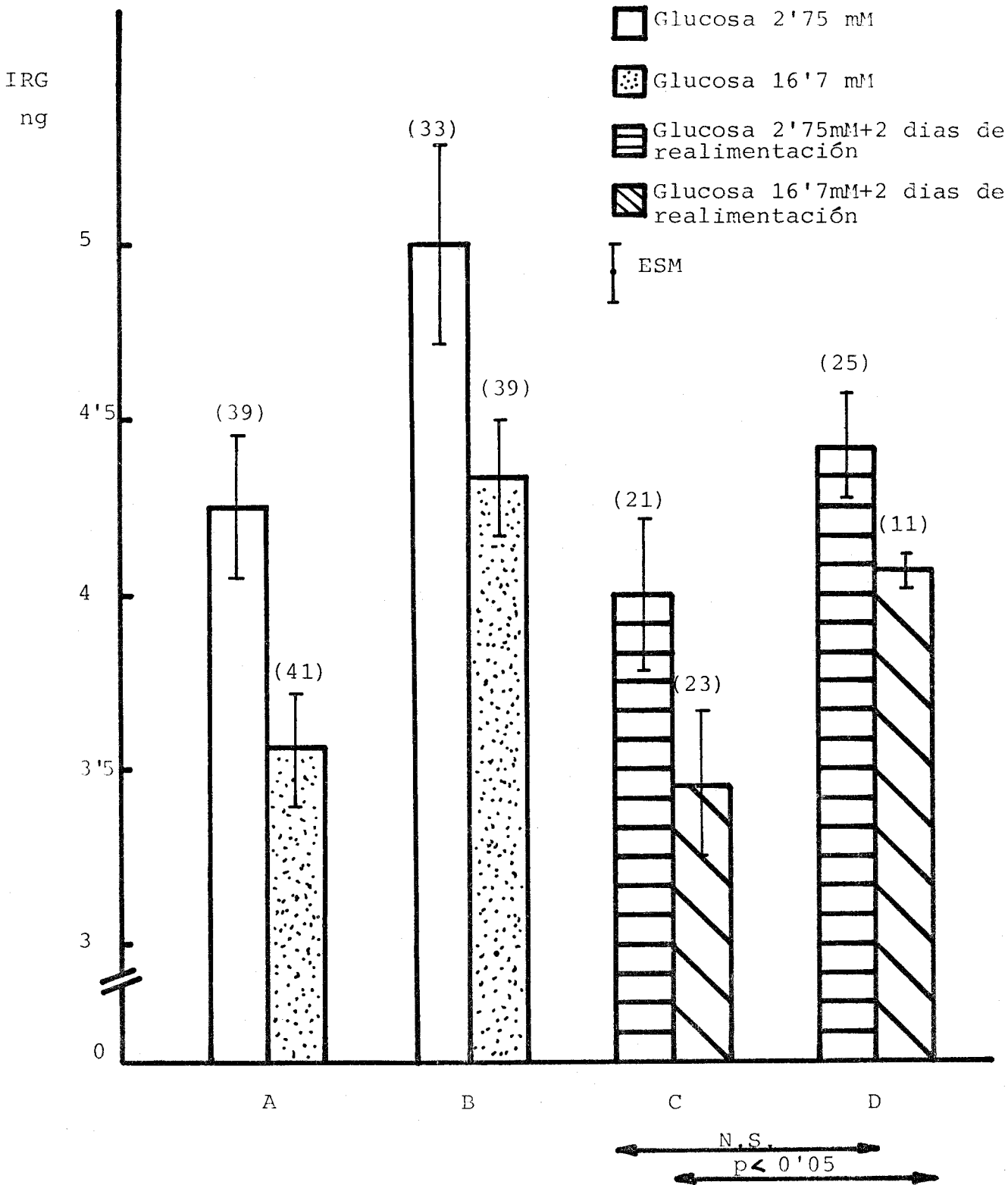


Fig. 24 Influencia del ayuno y realimentación sobre la secreción de glucagón en presencia de glucosa.

A, ratas que han sido alimentadas (controles); B, ratas sometidas a 4 días de ayuno; C, ratas sometidas a 4 días de ayuno seguidos de 2 días de realimentación con dieta standard; D, ratas sometidas a 4 días de ayuno seguido de 2 días de realimentación selectiva con glucosa al 20%.

Resultados expresados en ng de glucagón liberados en 30 min por 5 islotes. En abcisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.

La figura n°( 25 ) representa la secreción de glucagón en presencia de glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en islotes aislados de ratas controles (A), sometidas a 4 días de ayuno (B) y sometidas a 4 días de ayuno y seguidos de 2 días de realimentación con glucosa al 20 % por via oral.

Por una parte, se observa que la secreción basal de glucagón (glucosa 2'75 mM) aumenta significativamente durante el ayuno, como también ocurrió en presencia de glucosa 16'7 mM. También se comprueba una disminución de la secreción de glucagón al aumentar los niveles de glucosa, siendo patente tanto en el grupo control como a los 4 días de ayuno. Por otra parte, en la realimentación con glucosa se observa un descenso de la secreción de glucagón, contrarrestando así el aumento provocado por el ayuno, llegando a igualar a los valores de las ratas alimentadas (controles) con glucosa 2'75 mM en el medio. No fue así con glucosa 16'7 mM, pero tras un periodo de mayor realimentación quizás se podría conseguir.

Los valores individuales, la media y el error standard de cada una de las experiencias realizadas, aparecen en las tablas n°16, 17 y 18.

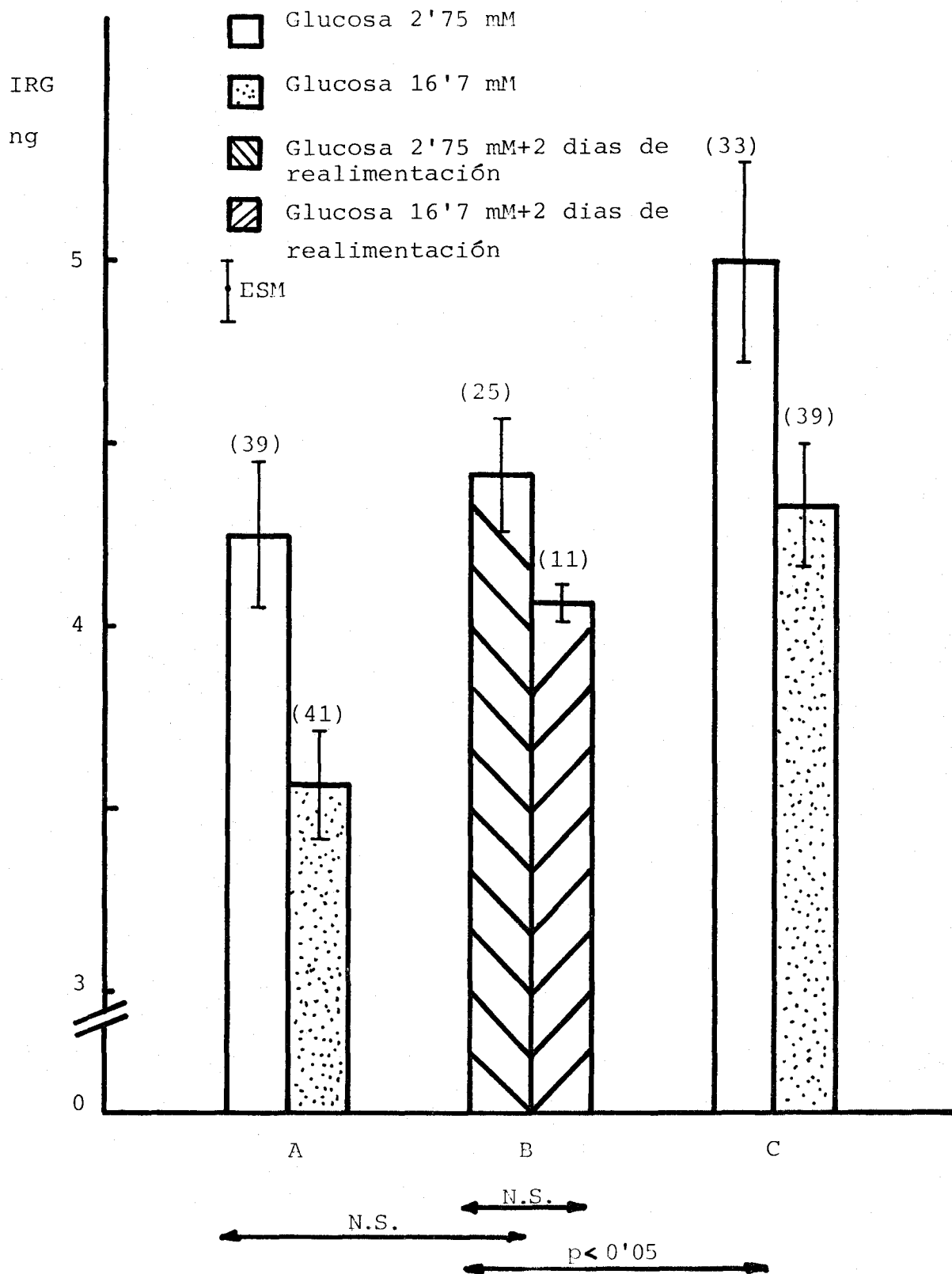


Fig. 25 Influencia del ayuno y realimentación selectiva con glucosa sobre la secreción de glucagón. A, ratas que han sido alimentadas (controles); B, ratas sometidas a 4 días de ayuno seguido de 2 días de realimentación selectiva con glucosa al 20%; C, ratas sometidas a 4 días de ayuno. Resultados expresados en ng de glucagón liberados en 30 min por 5 islotes. En abscisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.

La figura n° ( 26 ) representa la secreción de glucagón en presencia de glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en islotes aislados de ratas controles (A), sometidas a 4 días de ayuno (C) sometidas a 4 días de ayuno seguidas de 2 días de realimentación con dieta standard (B).

Por una parte, se observa que la secreción basal de glucagón (glucosa 2'75 mM) aumenta significativamente durante el ayuno, como también ocurrió en presencia de glucosa 16'7 mM. También se comprueba una disminución de la secreción de glucagón al aumentar los niveles de glucosa, siendo patente tanto en el grupo control como a los 4 días de ayuno. Por otra parte, la realimentación con dieta standard, dá lugar a un descenso de la secreción de glucagón, contrarrestando así el aumento provocado por el ayuno, llegando incluso a igualar los niveles de glucagón de las ratas controles en presencia de ambas concentraciones de glucosa.

Los valores individuales, la media y el error standard, de cada una de las experiencias realizadas, aparecen en las tablas n°16, 17 y 19.

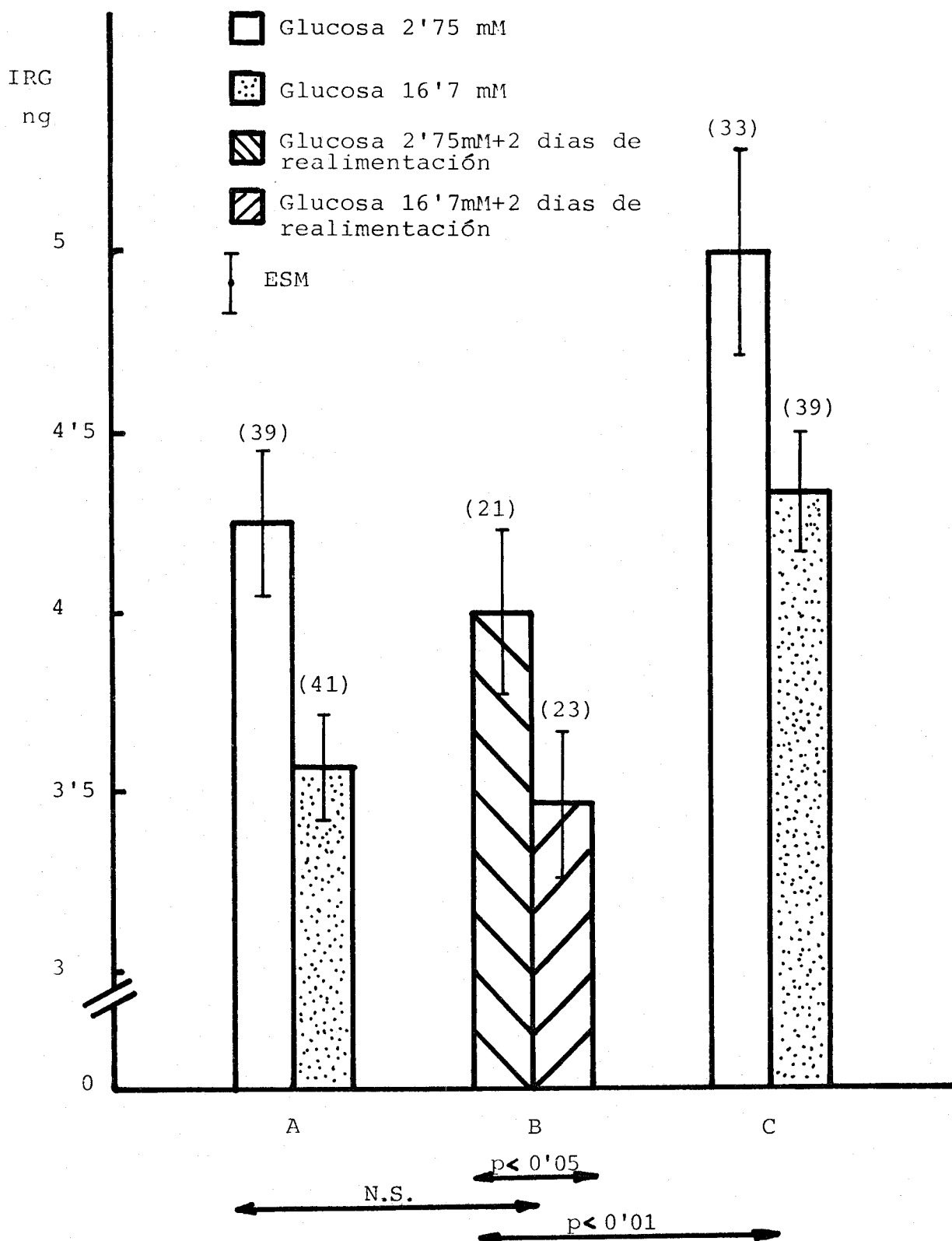


Fig.26 Influencia del ayuno y realimentación con dieta standard sobre la secreción de glucagón en presencia de glucosa. A, ratas que han sido alimentadas (controles); B, ratas sometidas a 4 días de ayuno seguido de 2 días de realimentación con dieta standard; C, ratas sometidas a 4 días de ayuno. Resultados expresados en ng de glucagón liberados en 30 min por 5 islotes. En abcisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.

TABLA N° 16

Secreción de glucagón en presencia de glucosa a dos concentraciones (2'75mM y 16'7mM) en islotes aislados del grupo control.

Glucagón (ng/30min/5 islotes)

<u>Incubación n°</u>	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	3'7	4
2	2'3	3'6
3	5'3	4'5
4	4'4	3'8
5	4'3	5'5
6	4'4	5'1
7	6'1	4
8	5	4'2
9	7	4'2
10	3'6	3'9
11	5'3	4'2
12	5	3'9
13	5'8	3
14	3'1	1'4
15	4'8	4
16	4'7	6'2
17	3'8	3'2
18	3'6	2'2
19	4'1	4'5
20	2'7	5'6
21	5'5	3
22	3'6	3'6
23	2	2'8
24	6'5	2'9
25	2'4	2'9
26	4'5	4'4



TABLA N°16

(Continuación)

<u>Incubación n°</u>	<u>Glucagón (ng/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
27	5'3	2'5
28	4'7	3'2
29	3'3	3'7
30	3'1	3
31	2	2'8
32	2'9	2
33	2'2	3'2
34	6	1'7
35	3'6	3'3
36	5'5	4'4
37	4'6	4'1
38	4'5	1'8
39	4'3	3'5
40		4'4
41		2'8
	$\bar{X}$	
	4'25	3'58
	ESM	
	0'20	0'17
	n	
	39	41

TABLA N° 17

Secreción de glucagón en presencia de glucosa a dos concentraciones (2'75mM y 16'7mM) en islotes aislados del grupo de 4 días de ayuno.

<u>Incubación n°</u>	<u>Glucagón (ng/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	7'5	6'3
2	8'5	4'9
3	7'5	3'8
4	4'7	5'4
5	7	4'3
6	7'1	4'2
7	4'8	4'5
8	7	5'1
9	4'2	4'5
10	5'3	3'5
11	5'3	3'2
12	5'4	3'6
13	4	4'1
14	4'2	5'2
15	4'3	4'2
16	3'3	4'5
17	3'8	3'4
18	4'2	3'9
19	4'2	3'2
20	4'7	3'9
21	7'2	4'6
22	4'2	4
23	4'3	4'3
24	3'5	4'3
25	3'7	4'8
26	4'1	3'5

TABLA N° 17

(Continuación)

<u>Incubación n°</u>	<u>Glucagón (ng/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
27	3'3	3'5
28	3'5	3'7
29	6'3	3'2
30	3'6	3
31	3'2	4'5
32	3'2	4
33	8	3'6
34		4'5
35		4
36		4'1
37		6'6
38		6'9
39		8
	$\bar{X}$	4'38
	ESM	0'17
	n	39

TABLA N° 18

Secreción de glucagón en presencia de glucosa a dos concentraciones (2'75mM y 16'7mM) en islotes aislados del grupo de 4 días de ayuno y seguidos de dos días de realimentación con glucosa al 20% por vía oral.

<u>Incubación n°</u>	<u>Glucagón (ng/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	2'5	3'9
2	3'6	3'9
3	4'5	4
4	4	4'2
5	4'6	4'2
6	4'3	4'2
7	5'2	4'2
8	4'5	3'9
9	4'3	3'7
10	4'4	4'2
11	5'6	4'5
12	4'2	
13	5'4	
14	4'9	
15	4'8	
16	3'5	
17	5'3	
18	4'8	
19	3'5	
20	4'8	
21	4	
22	5'1	
23	4'6	
24	4'3	
25	3'1	
	$\bar{X}$	4'08
	ESM	0'07
	n	11

TABLA N° 19

Secreción de glucagón en presencia de glucosa a dos concentraciones (2'75mM y 16'7mM) en islotes aislados del grupo de 4 días de ayuno y seguidos de dos días de realimentación con dieta standard.

Glucagón (ng/30min/5 islotes)

<u>Incubación n°</u>	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	3'2	4'4
2	4'2	3'6
3	3'5	5'1
4	5'7	3'6
5	6'7	3'4
6	3'4	3
7	4	4'5
8	4'2	4'2
9	4	3'6
10	3'4	3'3
11	3'8	4'8
12	4'1	4
13	4'2	3'8
14	5'8	3'4
15	4'1	2'7
16	3'1	1'3
17	4'5	2'5
18	3	3'7
19	3	2'3
20	2'7	3'8
21	3	1'3
22		4'5
23		2'7
	$\bar{X}$	3'46
	ESM	0'21
	n	23

3.5.- EFEECTO DE ALTAS CONCENTRACIONES DE  $Ca^{++}$  SOBRE LA SECRECIÓN DE HORMONAS PANCREÁTICAS EN PRESENCIA DE GLUCOSA. CONTROLES, 4 Y 8 DÍAS DE AYUNO.

3.5.1. Secreción de insulina.

La figura n° ( 27 ) representa la secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en un medio de incubación suplementado con calcio 7'5 mM, en islotes aislados de ratas controles y sometidas a 4 y 8 días de ayuno.

La secreción basal de insulina (glucosa 2'75 mM y calcio 7'5 mM) disminuyó significativamente al aumentar el periodo de ayuno; los mismos resultados se obtuvieron con glucosa 16'7 mM y calcio 7'5 mM. Por otra parte, es patente la pérdida de la capacidad insulinosecretora de los islotes tras largos periodos de ayuno, puesto que los valores obtenidos a los 8 días de ayuno no difieren significativamente a las dos concentraciones de glucosa utilizada y en presencia de altas concentraciones de calcio en el medio (7'5 mM). En cambio a los 4 días de ayuno los islotes poseen aún una capacidad discriminatoria de los niveles de glucosa en presencia de calcio 7'5mM.

Los valores individuales, la media y el error standard de cada una de las experiencias realizadas, aparecen en las tablas n° 20, 21 y 22.

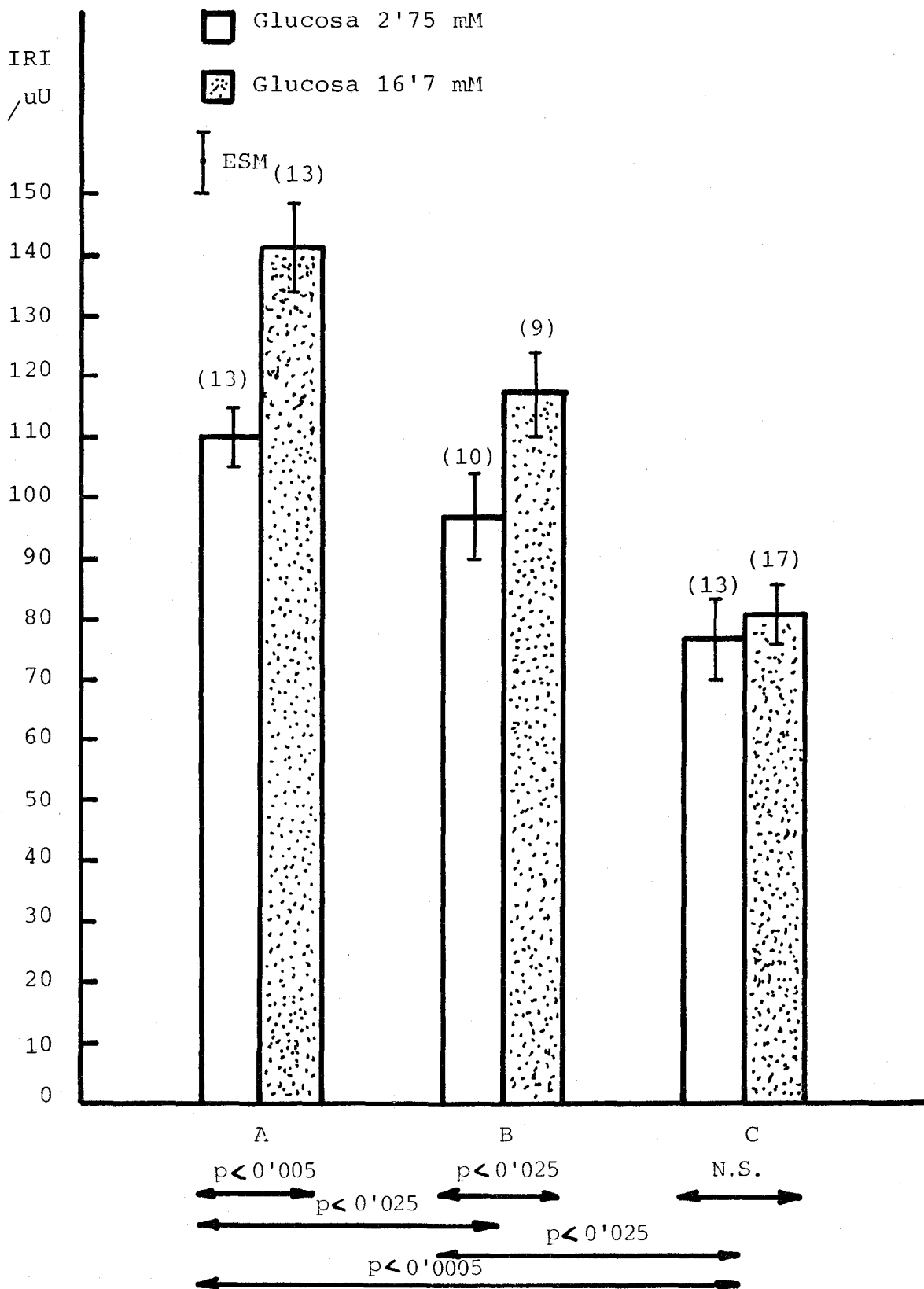


Fig.27 Secreción de insulina inducida por glucosa en presencia de calcio 7'5 mM en el ayuno prolongado.

A, ratas que han sido alimentadas (controles); B, ratas sometidas a 4 días de ayuno; C, ratas sometidas a 8 días de ayuno.

Resultados expresados en  $\mu\text{U}$  de insulina liberadas en 30 min por 5 islotes. En abscisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.

TABLA N° 20

Secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75 mM 16'7 mM) y suplementado el medio de incubación con calcio 7'5 mM en islotes aislados del grupo control.

<u>Incubación n°</u>	<u>Insulina ( ,uU/30min/ 5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	90	175
2	100	105
3	102	155
4	120	115
5	117	105
6	102	167
7	130	178
8	120	130
9	105	143
10	103	122
11	128	147
12	147	155
13	142	138
	$\bar{X}$	
	115'8	141'1
	ESM	
	5	7'1
	n	
	13	13



TABLA N° 21

Secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75mM y 16'7 mM) y suplementado el medio de incubación con calcio 7'5 mM en islotes aislados del grupo de 4 días de ayuno.

<u>Incubación n°</u>	<u>Insulina (uU/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	95	127
2	85	118
3	112	95
4	80	112
5	83	150
6	105	115
7	90	93
8	68	130
9	123	114
10	130	
	$\bar{X}$	
	97'1	117'1
	ESM	
	6'6	6'2
	n	
	10	9

TABLA N° 22

Secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75mM y 16'7 mM) y suplementado el medio de incubación con calcio 7'5mM en islotes aislados del grupo de 8 días de ayuno.

<u>Incubación n°</u>	<u>Insulina (,uU/30min/5 islotes)</u>		
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>	
1	105	105	
2	45	55	
3	40	75	
4	45	48	
5	80	83	
6	107	90	
7	67	45	
8	75	90	
9	68	100	
10	85	110	
11	97	80	
12	73	68	
13	112	70	
14		80	
15		80	
16		90	
17		105	
	$\bar{x}$	76'8	80'8
	ESM	6'9	4'8
	n	13	17

### 3.5.2. Secreción de glucagón.

La figura n° ( 28 ) representa la secreción de glucagón en presencia de glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en un medio de incubación suplementado con calcio 7'5 mM, en islotes aislados de ratas controles y sometidas a 4 días de ayuno.

La secreción basal de glucagón (glucosa 2'75 mM y calcio 7'5 mM) aumentó significativamente durante el ayuno; no siendo así en presencia de glucosa 16'7 mM y calcio 7'5 mM. Por otra parte, se observa en ambos grupos (control y 4 días de ayuno), una disminución de la secreción de glucagón al aumentar los niveles de glucosa (de 2'75 mM a 16'7 mM), en presencia de calcio 7'5 mM.

Los valores individuales, la media y el error standard de cada una de las experiencias realizadas, aparecen en las tablas n° 23 y 24.

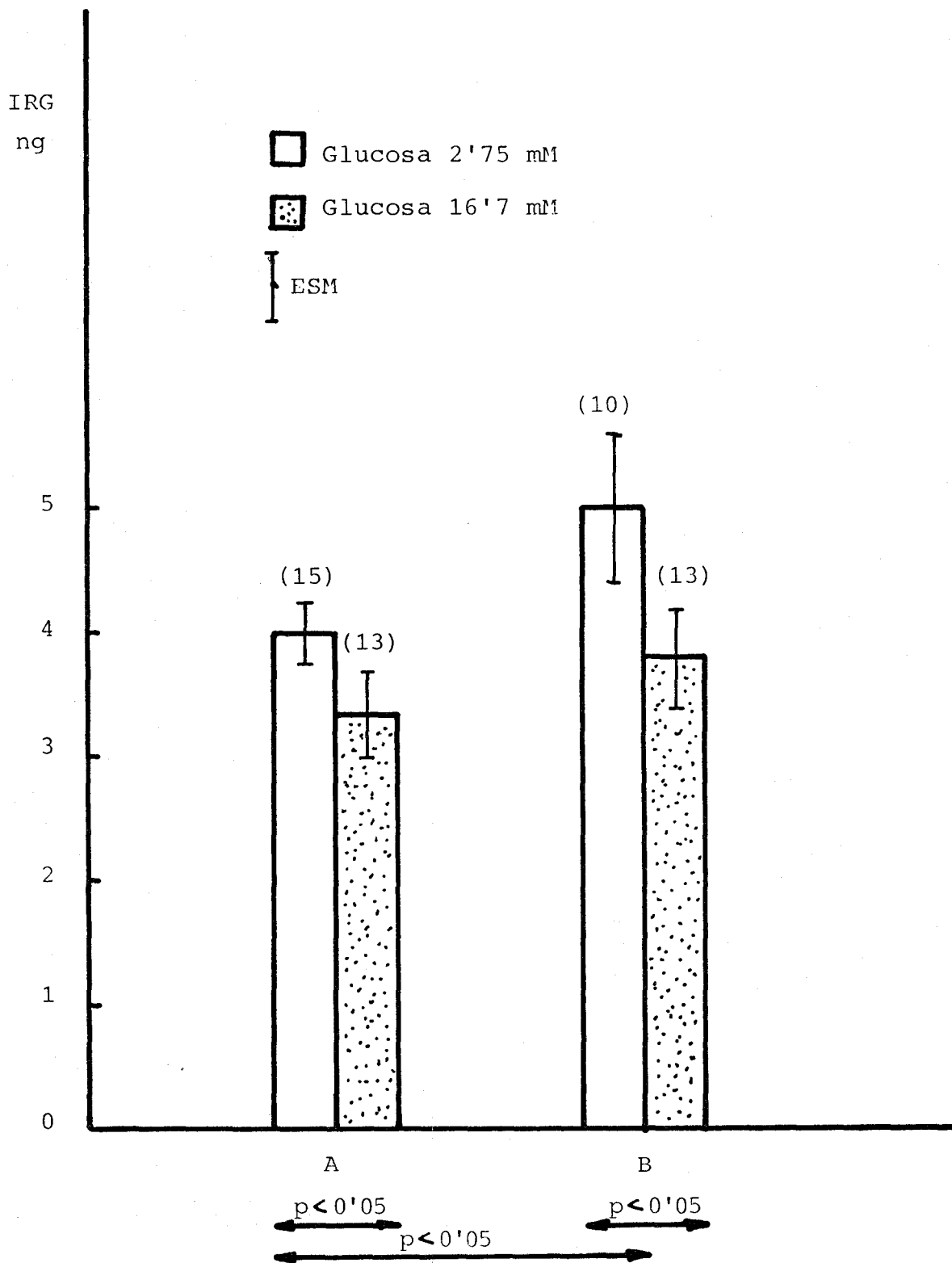


Fig.28 Secreción de glucagón en presencia de calcio 7'5 mM y glucosa durante el ayuno.

A, ratas que han sido alimentadas (controles); B, ratas sometidas a 4 días de ayuno.

Resultados expresados en ng de glucagón liberados en 30 min por 5 islotes. En abcisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.

TABLA N°23

Secreción de glucagón en presencia de glucosa a dos concentraciones (2'75mM y 16'7 mM) y suplementado el medio de incubación con calcio 7'5 mM en islotes aislados del grupo control.

<u>Incubación n°</u>	<u>Glucagón (ng/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	2'3	2'7
2	3'4	2'9
3	2'6	1'5
4	4'1	3'3
5	3'1	4'5
6	4'3	3'7
7	3'1	3'1
8	4'2	3'7
9	5'1	4'7
10	4'7	0'8
11	5'4	4'2
12	4'5	4'3
13	4'2	4'2
14	5	
15	5	
	$\bar{X}$	3'37
	ESM	0'34
	n	13

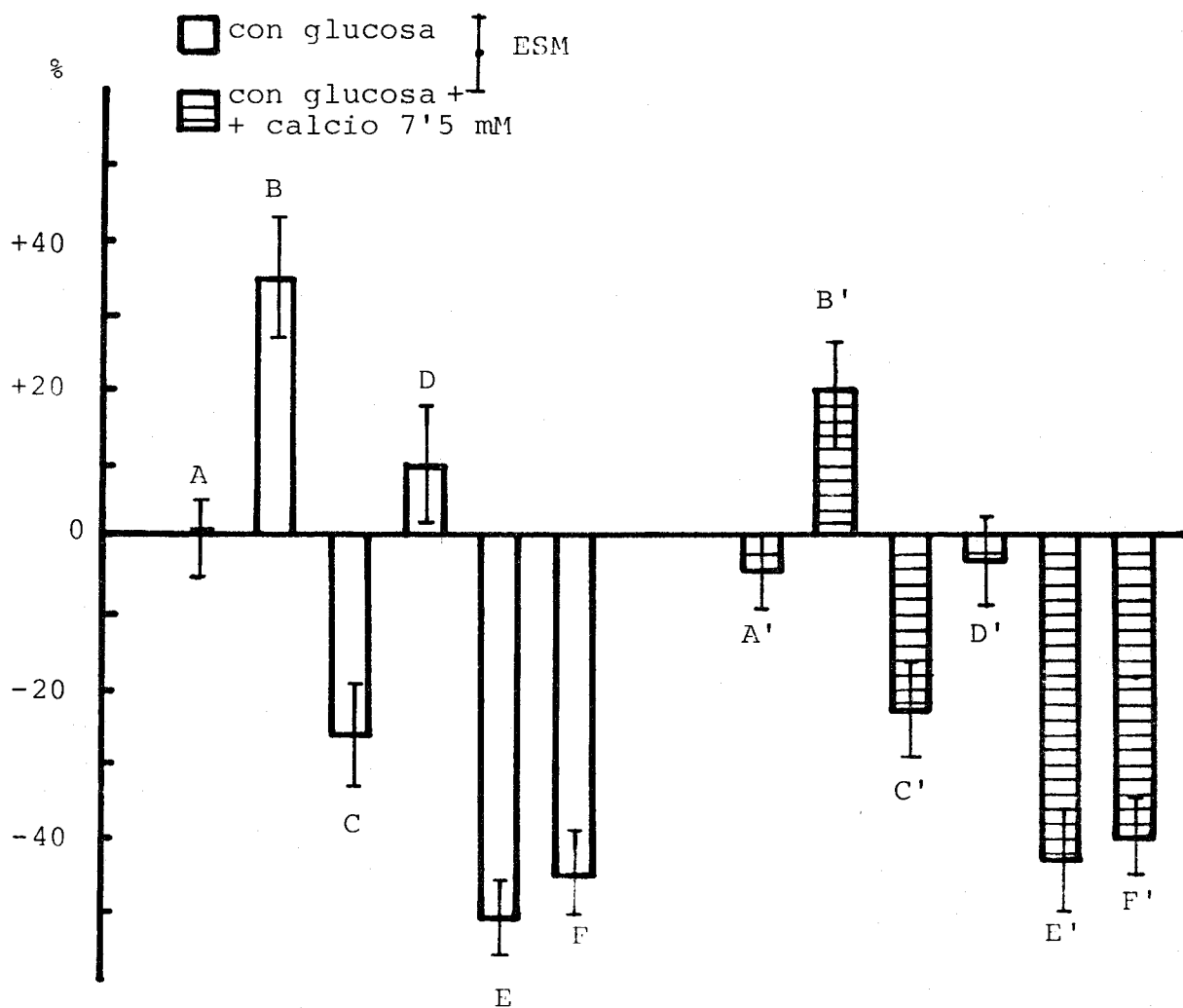
TABLA N° 24

Secreción de glucagón en presencia de glucosa a dos concentraciones (2'75mM y 16'7mM) y suplementado el medio de incubación con calcio 7'5 mM en islotes aislados del grupo de 4 días de ayuno.

<u>Incubación n°</u>	<u>Glucagón (ng/30min/5 islotes)</u>		
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>	
1	4'2	4'7	
2	3'2	4'4	
3	4	1'8	
4	8	3'4	
5	6'5	3'6	
6	7	2'9	
7	6'5	4'6	
8	2'9	2'5	
9	3'9	3'9	
10	3'9	3'8	
11		1'8	
12		6	
13		6	
	$\bar{X}$	5'02	3'80
	ESM	0'59	0'39
	n	10	13

En la figura (29) se representan las modificaciones de la secreción de insulina expresada en % de variación sobre el valor de insulina basal en el grupo control (glucosa 2'75 mM), en islotes aislados de ratas controles (A, A', B y B'), sometidas a 4 días de ayuno (C, C', D y D') y sometidas a 8 días de ayuno (E, E', F y F') a dos concentraciones de glucosa (2'75 mM y 16'7 mM), con calcio 7'5 mM en el medio (A', B', C', D', E' y F') o con glucosa (A, B, C, D, E, F).

No se observan variaciones significativas sobre la secreción de insulina al suplementar el medio de calcio 7'5 mM, puesto que a los 4 días de ayuno se pasa de  $(-26 \pm 6'8) \%$  con glucosa 2'75 mM a  $(-22'9 \pm 6'6) \%$  a la misma concentración del carbohidrato en presencia de un exceso de calcio (7'5 mM). Lo mismo se observa a los 8 días de ayuno pasando de  $(-51'7 \pm 5'1) \%$  con glucosa en el medio a  $(-42'7 \pm 7) \%$  en presencia de un exceso de calcio (7'5 mM). Estos mismos resultados se obtienen con glucosa 16'7 mM. Por lo tanto al suplementar el medio con calcio 7'5 mM, no se desbloquea la inhibición de la secreción de insulina provocada por el ayuno, puesto que los resultados indican que no existen diferencias apreciables.



A, C y E .... glucosa 2'75 mM  
 B, D y F .... glucosa 16'7 mM  
 A,B,A'yB' ... controles  
 C,D,C'yD' ... 4 días ayuno  
 E,F,E'yF' ... 8 días ayuno

A',C'yE'...glucosa 2'75mM  
 +calcio 7'5mM  
 B',D'yF'...glucosa 16'7mM  
 +calcio 7'5mM

Fig.29 Modificaciones de la secreción de insulina expresada en % de variación sobre el valor de insulina basal en el grupo control (glucosa 2'75 mM). La columna en blanco representan las experiencias con glucosa. Las rayadas representan las mismas experiencias con calcio 7'5 mM en el medio. Los grupos son: controles A y B; 4 días de ayuno C y D; 8 días de ayuno E y F. Así mismo se repiten las mismas experiencias con calcio 7'5 mM: controles A' y B'; 4 días de ayuno C' y D'; 8 días de ayuno E' y F'.



3.6.- IMPORTANCIA DEL AMPc EN LOS MECANISMOS DE SECRECIÓN DE INSULINA Y GLUCAGÓN EN ISLOTES DE RATAS ALIMENTADAS Y RATAS SOMETIDAS A AYUNO.

3.6.1. Niveles intracelulares de AMPc en islotes de ratas alimentadas. Modificaciones durante el ayuno. Efecto de la teofilina y la glucosa.

La figura n°( 30 ) representa la influencia del ayuno y de la teofilina sobre los niveles de cAMP intracelular en islotes de Langerhans, realizándose todas las experiencias con glucosa 16'7mM, en islotes aislados de ratas controles (A) sometidas a 4 días de ayuno (B) y sometidas a 4 días de ayuno y suplementado el medio de incubación con teofilina 10 mM.

Por una parte se observa una disminución del contenido intracelular de cAMP provocado por el ayuno (comparando el grupo control con el de 4 días de ayuno), coincidiendo con la pérdida de actividad insulinosecretora de la célula beta y el aumento de la secreción de glucagón. Por otra parte, al suplementar el medio de incubación con teofilina 10 mM en ratas de 4 días de ayuno, se observa un aumento del contenido intracelular de cAMP, llegando incluso a igualar los valores del grupo control y coincidiendo a su vez con un aumento de la secreción de insulina llegándose a desbloquear la inhibición de la

secreción de dicha hormona provocada por el ayuno.

Los valores individuales, la media y el error standard para cada una de las experiencias indicadas, aparecen en las tabla: n°25.

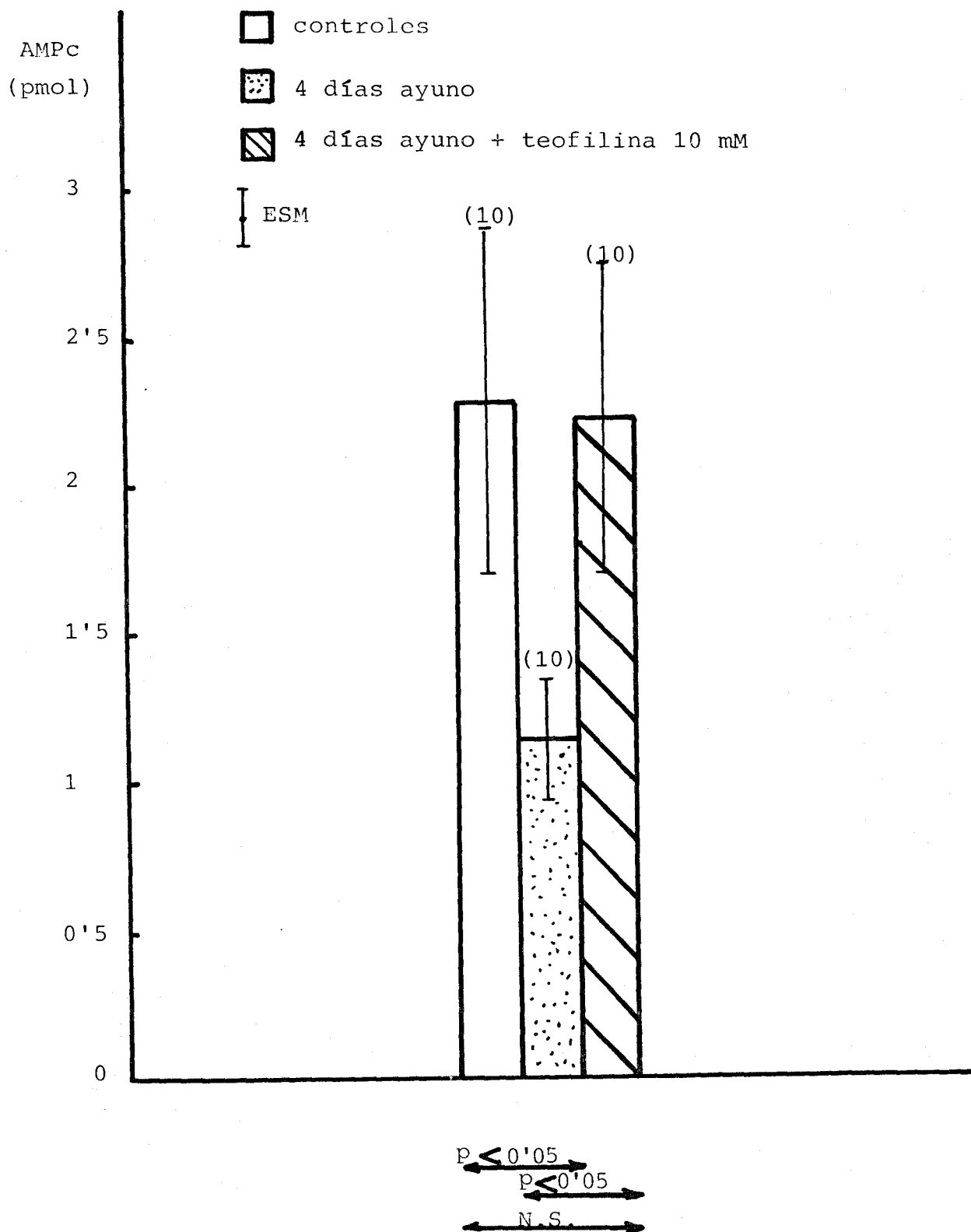


Fig. 30 Influencia del ayuno y la teofilina sobre los niveles de cAMP intracelular en islotes de Langerhans. Todas las experiencias se realizaron con glucosa 16.7 mM. Resultados expresados en pmol de cAMP producidos en 30 min de incubación por 25 islotes. En abscisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.

TABLA N° 25

Contenido intracelular de cAMP en islotes de Langerhans con glucosa 16'7mM en el medio de incubación en ratas controles (A), sometidas a 4 días de ayuno (B) y sometidas a 4 días de ayuno y suplementado el medio de incubación con teofilina 10mM (C).

Incubación n°	pmol de cAMP/30min/25 islotes			
	Controles	4 días ayuno	4 días ayuno+ +teofilina 10mM	
1	1'68	0'45	1'50	
2	1'38	0'45	0'93	
3	1'90	1'87	1'50	
4	1'13	0'30	1'05	
5	3'75	2'00	3'37	
6	1'68	0'26	1'68	
7	6'85	1'68	3'38	
8	2'00	1'05	1'50	
9	1'40	1'13	6'25	
10	1'12	1'20	1'50	
	$\bar{X}$	2'289	1'131	2'266
	ESM	0'590	0'210	0'547
	n	10	10	10

La figura n° ( 31 ) representa la influencia de la glucosa (2'75 mM 6 16'7 mM) sobre los niveles de cAMP intracelular en islotes de Langerhans de ratas alimentadas (controles).

En dicha gráfica se observa una elevación del contenido de cAMP intracelular al aumentar los niveles de glucosa en el medio de incubación; coincidiendo este aumento de los niveles de cAMP intracelular con la elevación de la secreción de insulina al aumentar el contenido del carbohidrato, como así mismo una disminución sobre la secreción de glucagón.

Los valores individuales, la media y el error standard para cada una de las experiencias indicadas, aparecen en las tabla n°26.

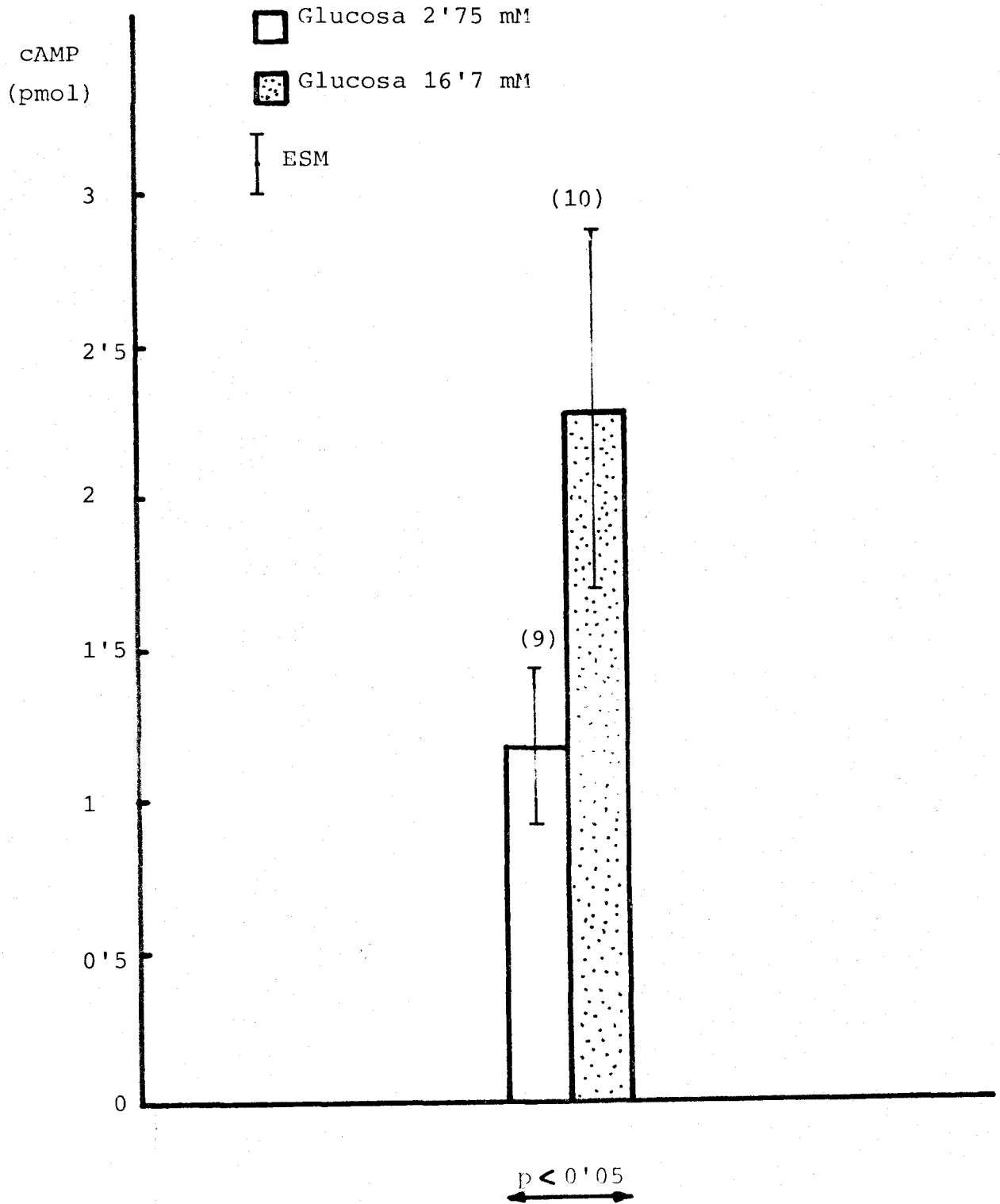


Fig. 31 Influencia de la glucosa sobre los niveles de cAMP intracelular en islotes de Langerhans. Las experiencias se realizaron con ratas alimentadas (controles). Resultados expresados en pmol de cAMP producidos en 30 min de incubación por 25 islotes. En abcisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.

TABLA N° 26

Contenido intracelular de cAMP en islotes de Langerhans a dos concentraciones de glucosa (2'75mM y 16'7mM) en ratas controles.

pmol de cAMP/30min/25 islotes

<u>Incubación n°</u>	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	0'97	1'68
2	1'10	1'38
3	2'60	6'85
4	0'55	1'90
5	1'40	3'75
6	0'80	1'13
7	2'00	2'00
8	1'00	1'13
9	0'18	1'68
10		1'40
	$\bar{X}$	
	1'177	2'289
	ESM	
	0'261	0'590
	n	
	9	10

3.6.2. Efecto de la teofilina sobre la secreción de insulina en presencia de glucosa.

La figura n°( 32 ) representa de un modo global, a efectos comparativos, la secreción de insulina en presencia de teofilina 5 mM a dos concentraciones de glucosa (2'75 mM y 16'7 mM) en islotes aislados de ratas controles y sometidas a 4 y 8 días de ayuno.



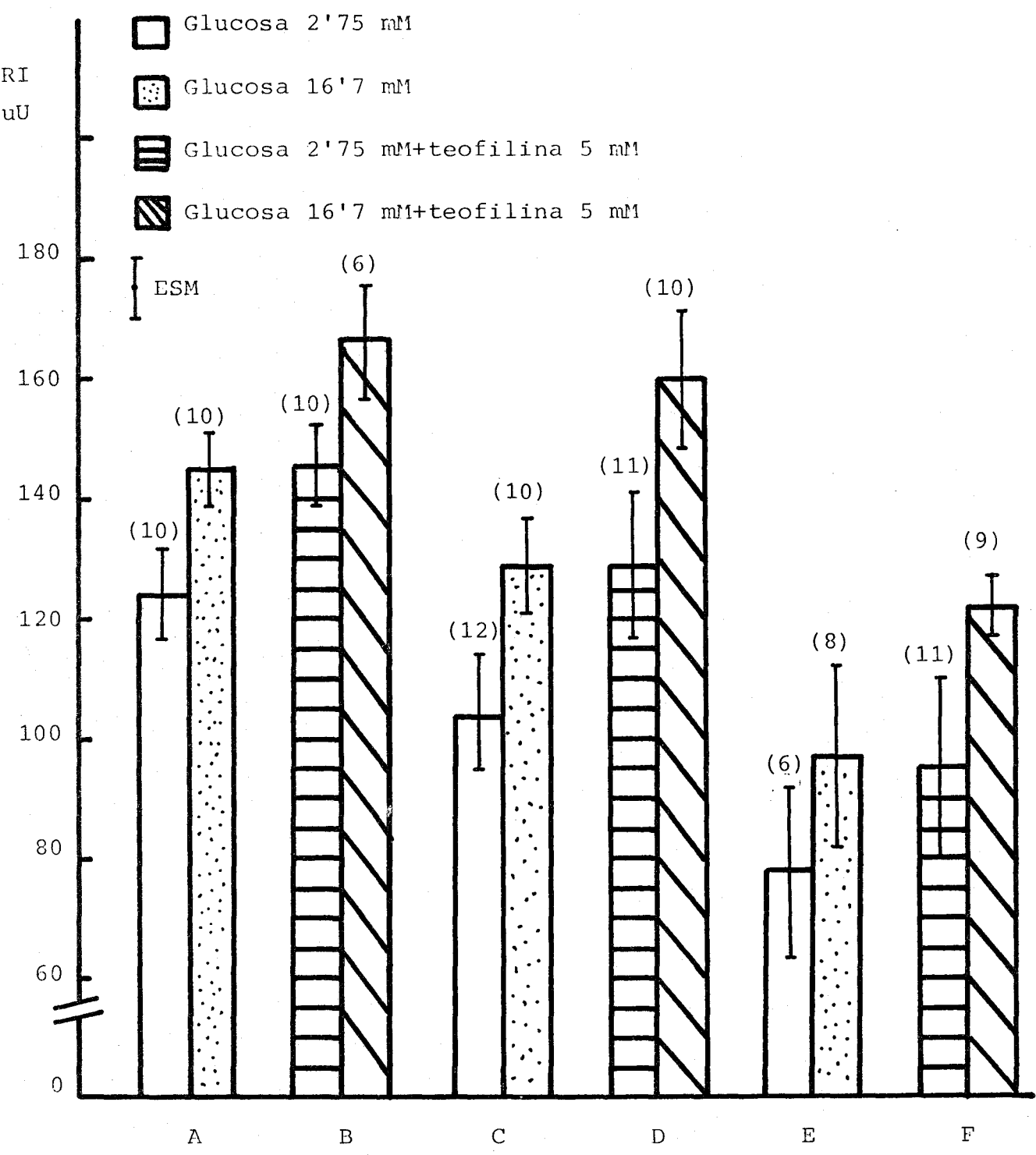


Fig.32 Influencia de la teofilina sobre la secreción de insulina durante el ayuno.

A y B, ratas que han sido alimentadas (controles); C y D, ratas sometidas a 4 días de ayuno; E y F, ratas sometidas a 8 días de ayuno.

Resultados expresados en  $\mu$ U de insulina liberadas en 30 min por 5 islotes. El número de experiencias figura entre paréntesis.

La figura n° ( 33 ) representa la secreción de insulina, en presencia de teofilina 5 mM y a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) de glucosa en islotes aislados de ratas controles sometidas a 4 días de ayuno.

La secreción de insulina, aumentó significativamente al elevarse la concentración de glucosa (de 16'7 mM con respecto a la basal 2'75 mM); así como al suplementar el medio de incubación con teofilina 5 mM a ambas concentraciones de glucosa. A los 4 días de ayuno existe una disminución sobre la secreción de insulina; tanto a glucosa 2'75 mM como a 16'7 mM. Sin embargo al suplementar el medio de incubación con teofilina 5 mM, la secreción de insulina aumenta hasta igualar el valor de los grupos controles; llegando incluso a desbloquear la secreción de la hormona provocada por el ayuno, ocurriendo esta circunstancia a ambas concentraciones del carbohidrato.

Los valores individuales, la medio y el error standard de cada una de las experiencias indicadas, aparecen en las tablas n° 27, 28, 30 y 31.

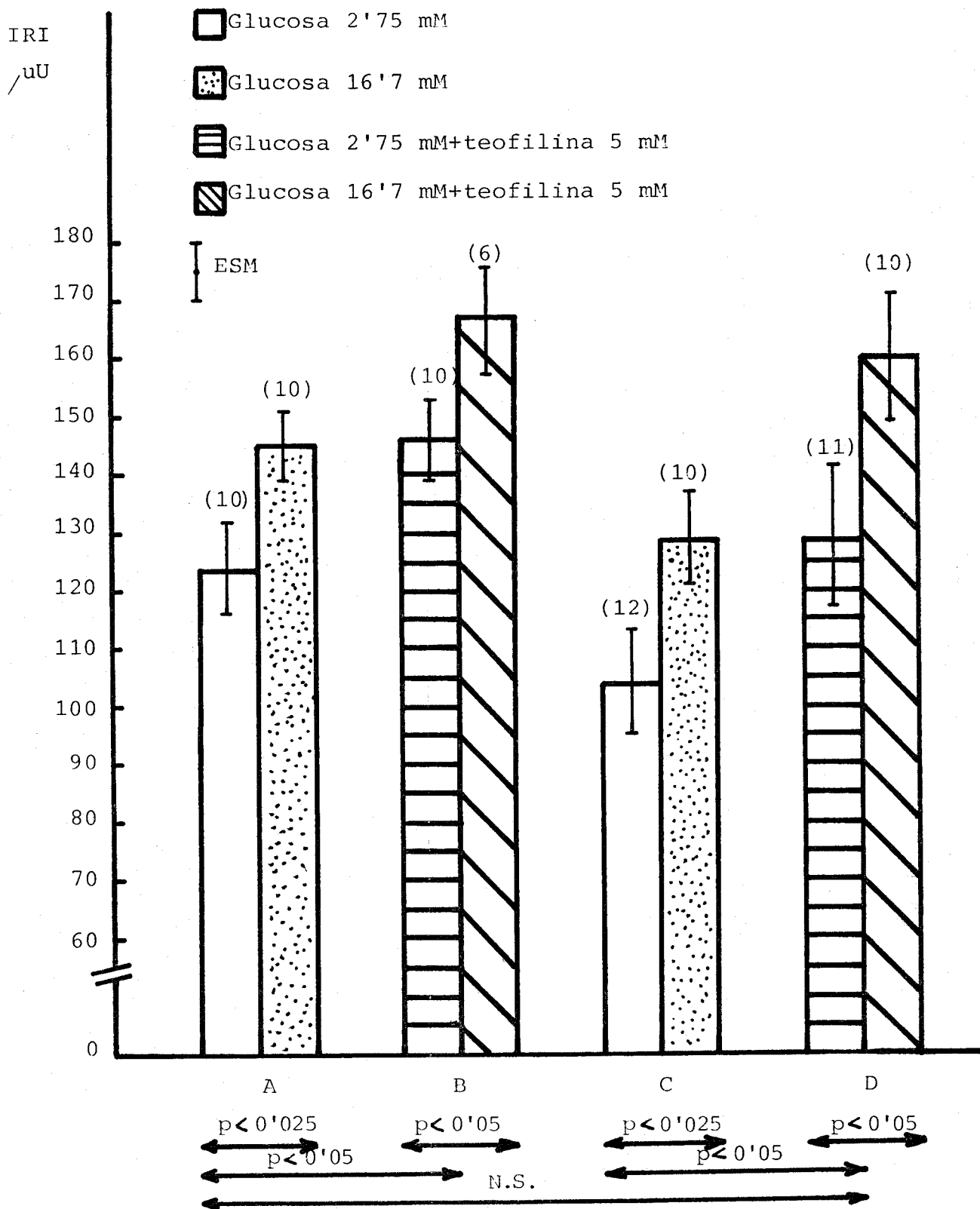


Fig.33 Influencia de la teofilina sobre la secreción de insulina durante el ayuno.

A y B, ratas que han sido alimentadas (controles); C y D, ratas sometidas a 4 días de ayuno.

Resultados expresados en  $\mu\text{U}$  de insulina liberadas en 30 min por 5 islotes. En abcisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.

La figura n° ( 34 ) representa la secreción de insulina en presencia de teofilina 5 mM a dos concentraciones de glucosa (2'75 mM y 16'7 mM) en islotes aislados de ratas controles y sometidas a 8 días de ayuno.

La secreción basal de insulina (glucosa 2'75 mM) disminuyó significativamente tras un periodo de ayuno muy prolongado (8 días). Los mismos resultados se obtuvieron con glucosa 16'7 mM. Por otra parte, al suplementar el medio de incubación con teofilina 5 mM, aumenta significativamente la secreción de insulina con respecto al grupo control que sólo contenía en el medio glucosa, ocurriendo este hecho a ambas concentraciones del carbohidrato. Sin embargo, a los 8 días de ayuno cuando el medio de incubación contiene teofilina 5 mM, no se llega a desbloquear la inhibición de la secreción de insulina provocada por el ayuno, llegando incluso a perder la capacidad discriminatoria de los niveles de glucosa aún cuando el medio estaba suplementado con teofilina 5 mM.

Los valores individuales, la media y el error standard para cada una de las experiencias indicadas, aparecen en las tablas n° 27, 29, 30 y 32.

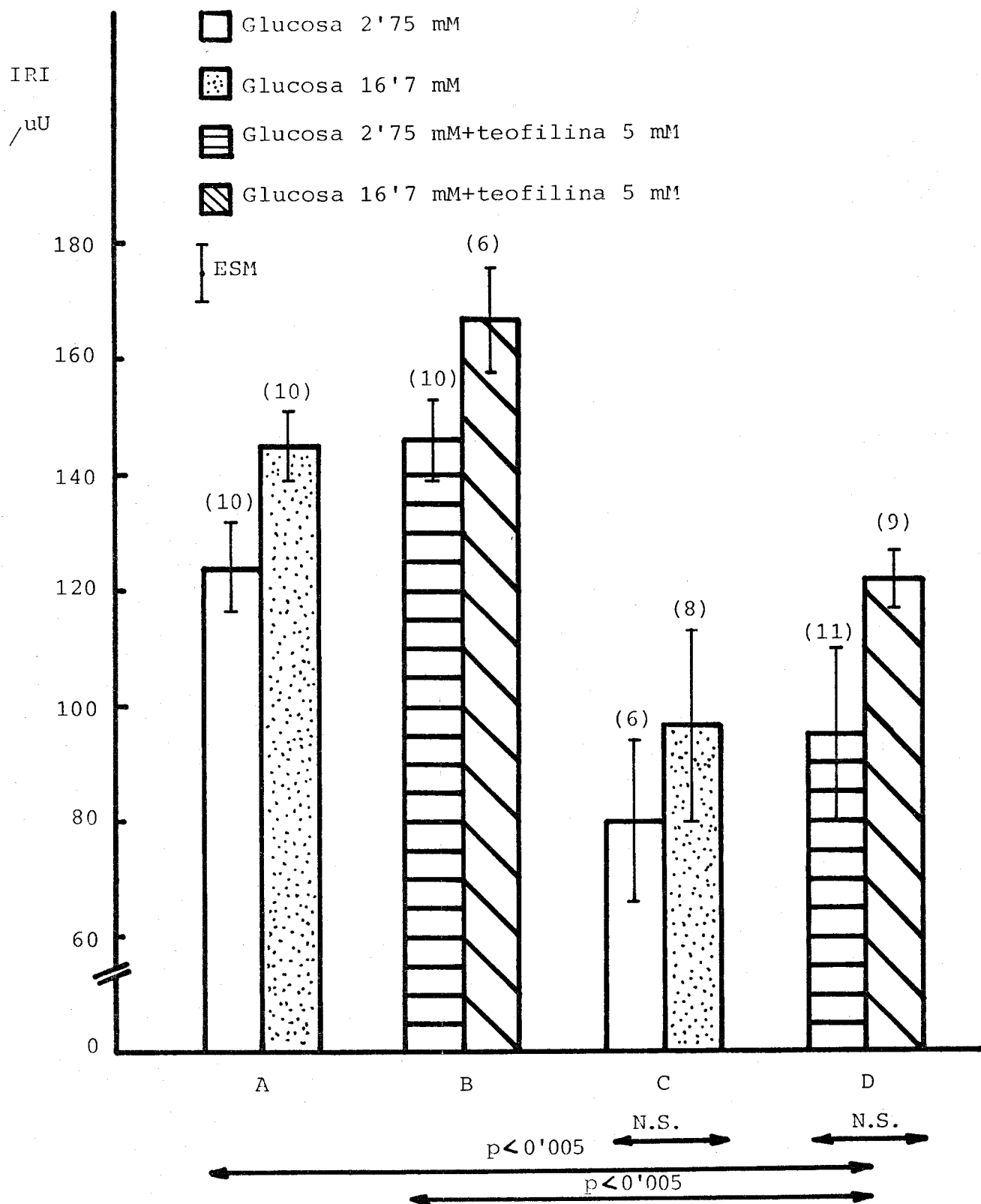


Fig.34 Influencia de la teofilina sobre la secreción de insulina durante el ayuno prolongado.

A y B, ratas que han sido alimentadas (controles); C y D, ratas sometidas a 8 días de ayuno.

Resultados expresados en  $\mu$ U de insulina liberadas en 30 min por 5 islotes. En abscisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.

La figura n°( 35 ) representa la secreción de insulina en presencia de teofilina 5 mM a dos concentraciones de glucosa (2'75 mM y 16'7 mM) en islotes aislados de ratas sometidas a 4 y 8 días de ayuno.

La secreción de insulina disminuyó significativamente al aumentar el periodo de ayuno (de 4 a 8 días); observándose este comportamiento a ambas concentraciones de glucosa. Por otra parte, al suplementar el medio de incubación con teofilina 5 mM, aumentó significativamente la secreción de la hormona a los 4 días de ayuno; comprobándose este hecho a ambas concentraciones del carbohidrato. A los 8 días de ayuno no se obtiene al suplementar el medio con teofilina 5 mM un aumento significativo de la secreción de la hormona, con respecto al grupo que contiene glucosa, perdiendo así el islotes la capacidad de discriminación de diferentes concentraciones del carbohidrato, a la vez que se observa una pérdida de reactividad de la célula beta al añadir teofilina al medio.

Los valores individuales, la media y el error standard para cada una de las experiencias indicadas, aparecen en las tablas n°28, 29, 31 y 32.

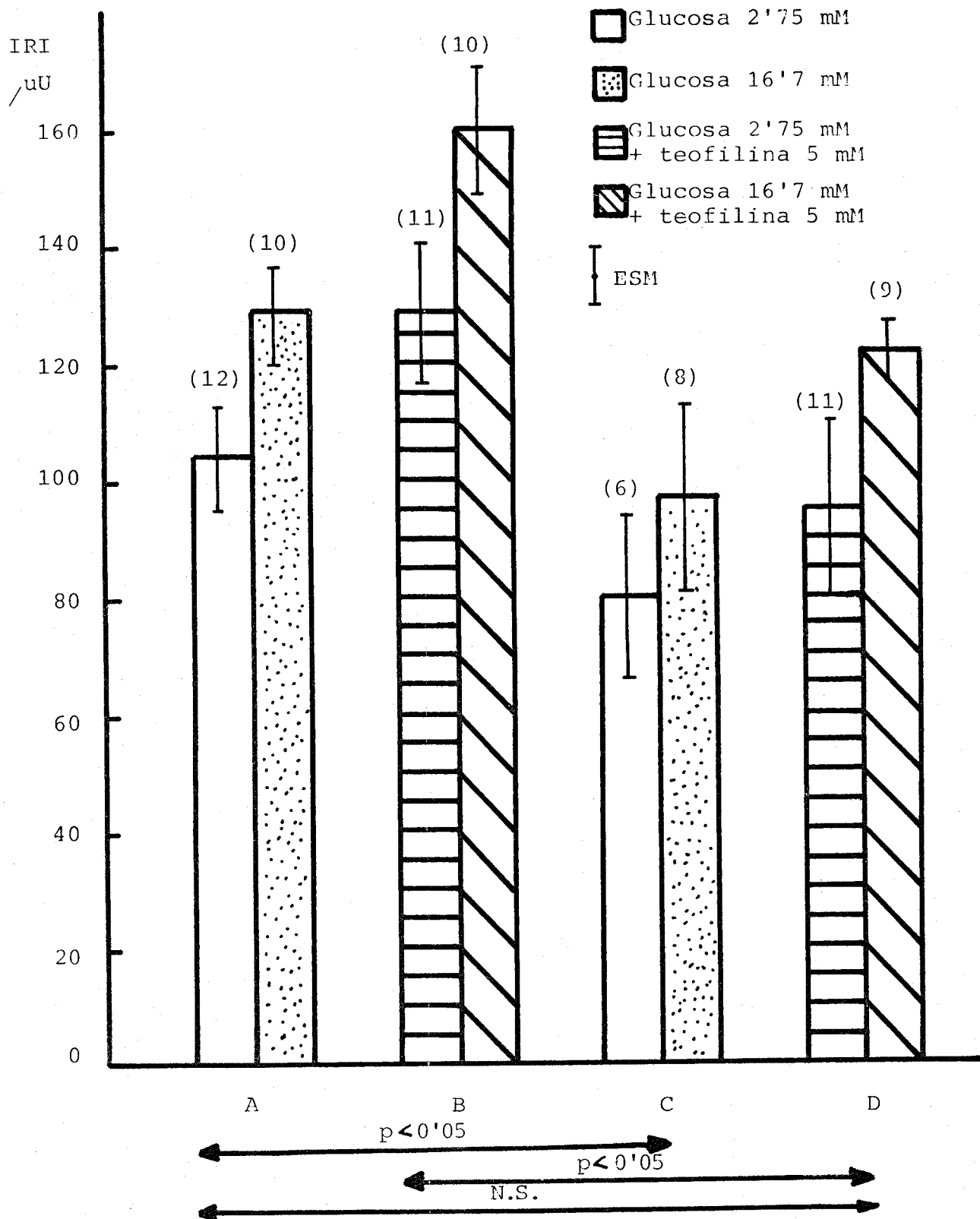


Fig.35 Influencia de la teofilina sobre la secreción de insulina durante el ayuno.

A y B, ratas sometidas a 4 días de ayuno; C y D, ratas sometidas a 8 días de ayuno.

Resultados expresados en  $\mu\text{U}$  de insulina liberadas en 30 min por 5 islotes. En abcisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.

TABLA N° 27

Secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75mM y 16'7mM) en islotes aislados del grupo control.

<u>Incubación n°</u>	<u>Insulina (μU/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	95	125
2	105	175
3	163	165
4	125	138
5	135	150
6	95	138
7	110	138
8	125	158
9	120	155
10	168	114
	$\bar{X}$	
	124'1	145'6
	ESM	
	8'5	6'2
	n	
	10	10



TABLA N° 28

Secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75mM y 16'7 mM) en islotes aislados del grupo de 4 días de ayuno.

<u>Incubación n°</u>	<u>Insulina ( <math>\mu</math>U/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	83	140
2	85	125
3	100	175
4	90	155
5	120	100
6	160	145
7	70	108
8	120	118
9	145	125
10	100	98
11	75	
12	100	
	$\bar{X}$	
	104	128'9
	ESM	
	8'3	8'3
	n	
	12	10

TABLA N° 29

Secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75mM y 16'7mM) en islotes aislados del grupo de 8 días de ayuno.

<u>Incubación n°</u>	<u>Insulina ( ,uU/30min/5 islotes)</u>		
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>	
1	130	130	
2	90	145	
3	90	68	
4	53	70	
5	38	100	
6	70	100	
7		25	
8		143	
	$\bar{X}$	78'5	97'6
	ESM	14'5	15'8
	n	6	8

TABLA N° 30

Secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75mM y 16'7mM) y suplementado el medio de incubación con teofilina 5 mM en islotes aislados del grupo control.

<u>Incubación n°</u>	<u>Insulina (<math>\mu</math>U/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	135	148
2	138	150
3	145	165
4	180	180
5	158	158
6	170	200
7	125	
8	155	
9	105	
10	150	
	$\bar{X}$	
	146'1	166'8
	ESM	
	7'3	8'9
	n	
	10	6

TABLA N° 31

Secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75mM y 16'7mM) y suplementado el medio de incubación con teofilina 5 mM en islotes aislados del grupo de 4 días de ayuno.

<u>Incubación n°</u>	<u>Insulina ( ,uU/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	78	133
2	110	175
3	123	180
4	150	193
5	135	110
6	83	180
7	148	195
8	185	138
9	85	108
10	138	190
11	190	
	$\bar{X}$	
	129'5	160'2
	ESM	
	12'2	11'5
	n	
	11	10

TABLA N° 32

Secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75mM y 16'7mM) y suplementado el medio de incubación con teofilina 5 mM en islotes aislados del grupo de 8 días de ayuno.

Insulina ( $\mu$ U/30min/5 islotes)

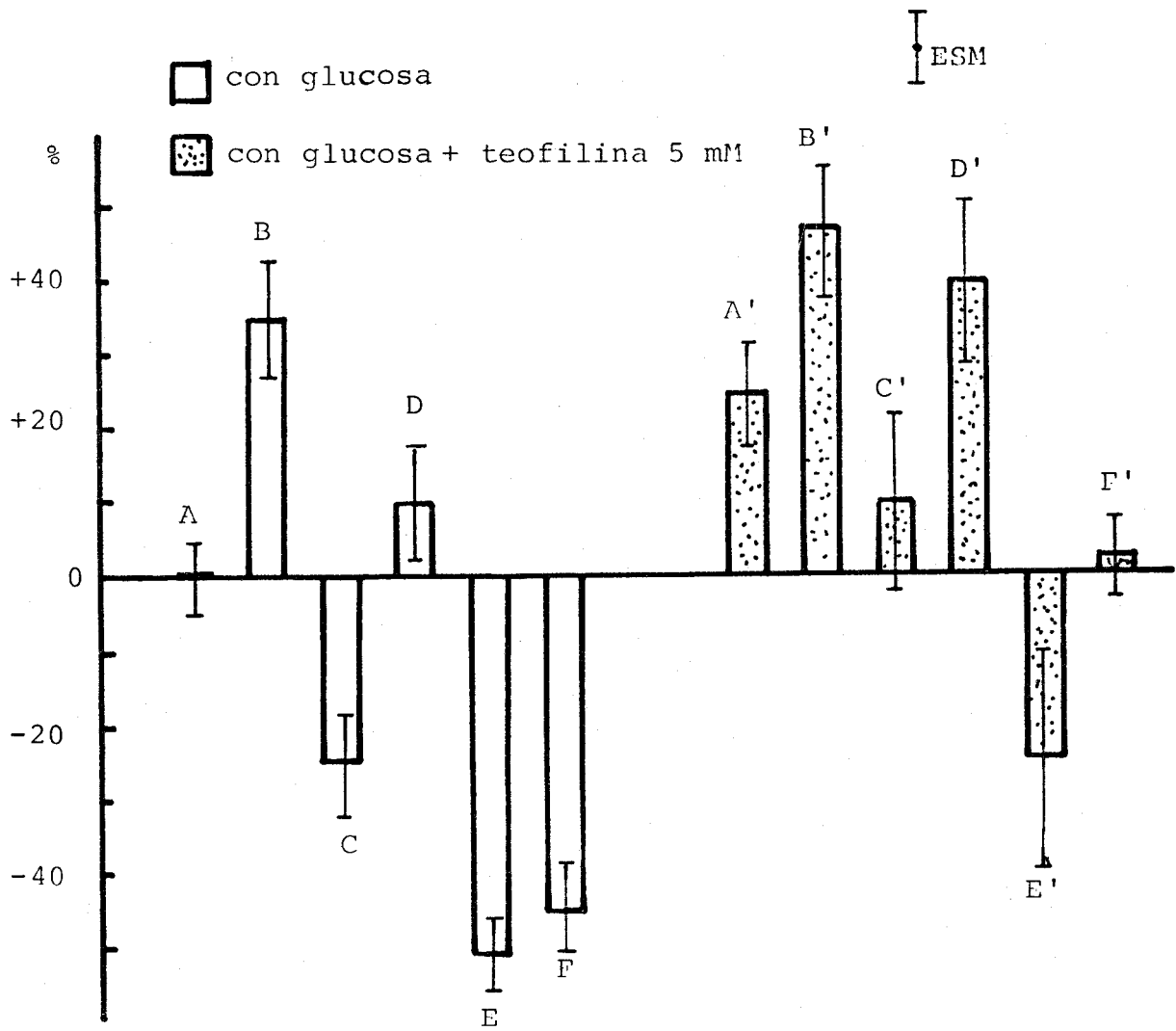
<u>Incubación n°</u>	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	170	113
2	75	130
3	138	130
4	125	118
5	58	95
6	70	118
7	108	113
8	68	140
9	168	145
10	35	
11	35	
$\bar{x}$	95'5	122'4
ESM	15'5	5'4
n	11	9

La figura n°( 36 ) representa las modificaciones de la secreción de insulina expresada en % de variaciones sobre el valor de insulina basal en el grupo control (glucosa 2'75 mM), en islotes aislados de ratas controles (A, A', B y B'), sometidas a 4 días de ayuno (C, C', D, D') y sometidas a 8 días de ayuno (E, E' F, F') a dos concentraciones de glucosa ( 2'75 mM y 16'7 mM), con glucosa (A,B,C,D,E y F) y con glucosa y teofilina 5 mM (A', B',C',D',E' y F').

Al suplementar el medio con teofilina 5 mM, se observan variaciones significativas con respecto al medio que solo contiene glucosa. Puesto que de un valor de % de  $0 \pm 5$  con glucosa 2'75 mM en el grupo control se pasa a  $+ 25'1 \pm 7'1$  cuando el medio se suplementa con teofilina. Así mismo a los 4 días de ayuno se pasa de un %  $-26 \pm 6'8$  con glucosa 2'75 mM en el medio a  $+ 9'5 \pm 12'4$  cuando el medio contiene teofilina. Igualmente a los 8 días de ayuno se pasa de % de  $- 51'7 \pm 5'1$  con glucosa 2'75 mM a  $- 24'5 \pm 15'8$  cuando se suplementa el medio con teofilina. Similares resultados se obtienen con glucosa 16'7 mM. Por lo tanto, en el grupo control y a los 4 días de ayuno hay un aumento muy significativo de la secreción de insulina cuando se suplementa el medio con teofilina 5 mM, llegando incluso a los 4 días de ayuno a desbloquearse la inhibición de la

secreción de insulina provocada por el ayuno.

No se observa este comportamiento a los 8 días de ayuno, debido quizás a pérdida de reactividad de la célula beta tras largos periodos de privación de alimento.



A, C y E .... glucosa 2'75 mM

B, D y F .... glucosa 16'7 mM

A, B, A'yB' .. controles

C, D, C'yD' .. 4 días ayuno

E, F, E'yF' .. 8 días ayuno

A', C'yE' .. glucosa 2'75mM+  
+teofilina 5mM

B', D'yF' .. glucosa 16'7mM+  
+teofilina 5mM

Fig. 36 Modificaciones de la secreción de insulina expresada en % de variación sobre el valor de insulina basal en el grupo control (glucosa 2'75 mM). La columna en blanco representan las experiencias con glucosa. Las punteadas representan las mismas experiencias con teofilina 5 mM en el medio. Los grupos son: controles A y B; 4 días de ayuno C y D; 8 días de ayuno E y F. Así mismo se repiten las mismas experiencias con teofilina 5 mM: controles A' y B'; 4 días de ayuno C' y D'; 8 días de ayuno E' y F'.



### 3.6.3. Efecto del dibutiril-AMPC sobre la secreción de insulina en presencia de glucosa.

La figura n°( 37 ) representa la influencia del db-cAMP sobre la secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en ratas controles y sometidas a 4 días de ayuno: A y C (sin db-cAMP), B y D (con db-cAMP 2 mM).

Por una parte, en el grupo de ratas alimentadas se observa un incremento muy significativo, a ambas concentraciones de glucosa, cuando se suplementa el medio con db-cAMP 2 mM. Por otra parte, en el grupo de ratas de 4 días de ayuno se observa igualmente un aumento muy significativo al suplementar el medio con db-cAMP respecto al grupo que solo contiene glucosa en el medio, llegando incluso con glucosa 2'75 mM y db-cAMP 2 mM a desbloquearse la inhibición de la secreción de insulina provocada por el ayuno, igualando los valores del grupo control.

Los valores individuales, la media y el error standard para cada una de las experiencias indicadas, aparecen en las tablas n°12, 13, 33 y 34.

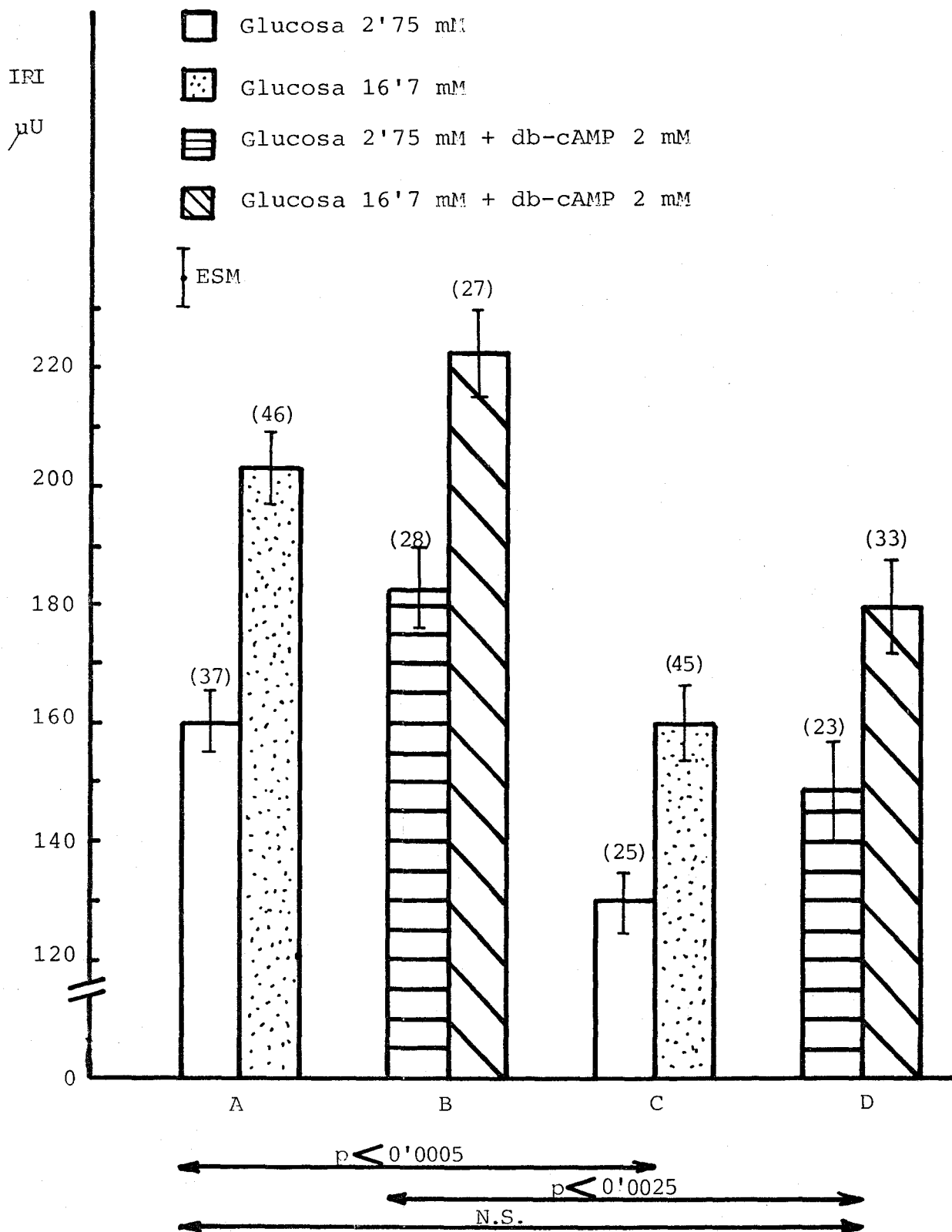


Fig.37 Influencia del db-cAMP sobre la secreción de insulina durante el ayuno. A y B, ratas que han sido alimentadas (controles); C y D, ratas sometidas a 4 días de ayuno. Resultados expresados en  $\mu$ U de insulina liberadas en 30 min por 5 islotes. En abscisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.

La figura n°( 38 ) representa la influencia del db-cAMP sobre la secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en ratas controles; A (sin db-cAMP), B (con db-cAMP 2 mM).

Por una parte, al aumentar la concentración de glucosa en el medio de incubación se observa un incremento muy significativo de la secreción de insulina, en ambos grupos. Por otra parte, la secreción basal de insulina (2'75 mM) se encuentra significativamente aumentada al suplementar el medio de incubación con db-cAMP 2 mM. Los mismos resultados se obtuvieron en presencia de glucosa 16'7 mM y db-cAMP 2 mM.

Los valores individuales, la media y el error standard de cada una de las experiencias indicadas, aparecen en las tablas n° 12 y 33.

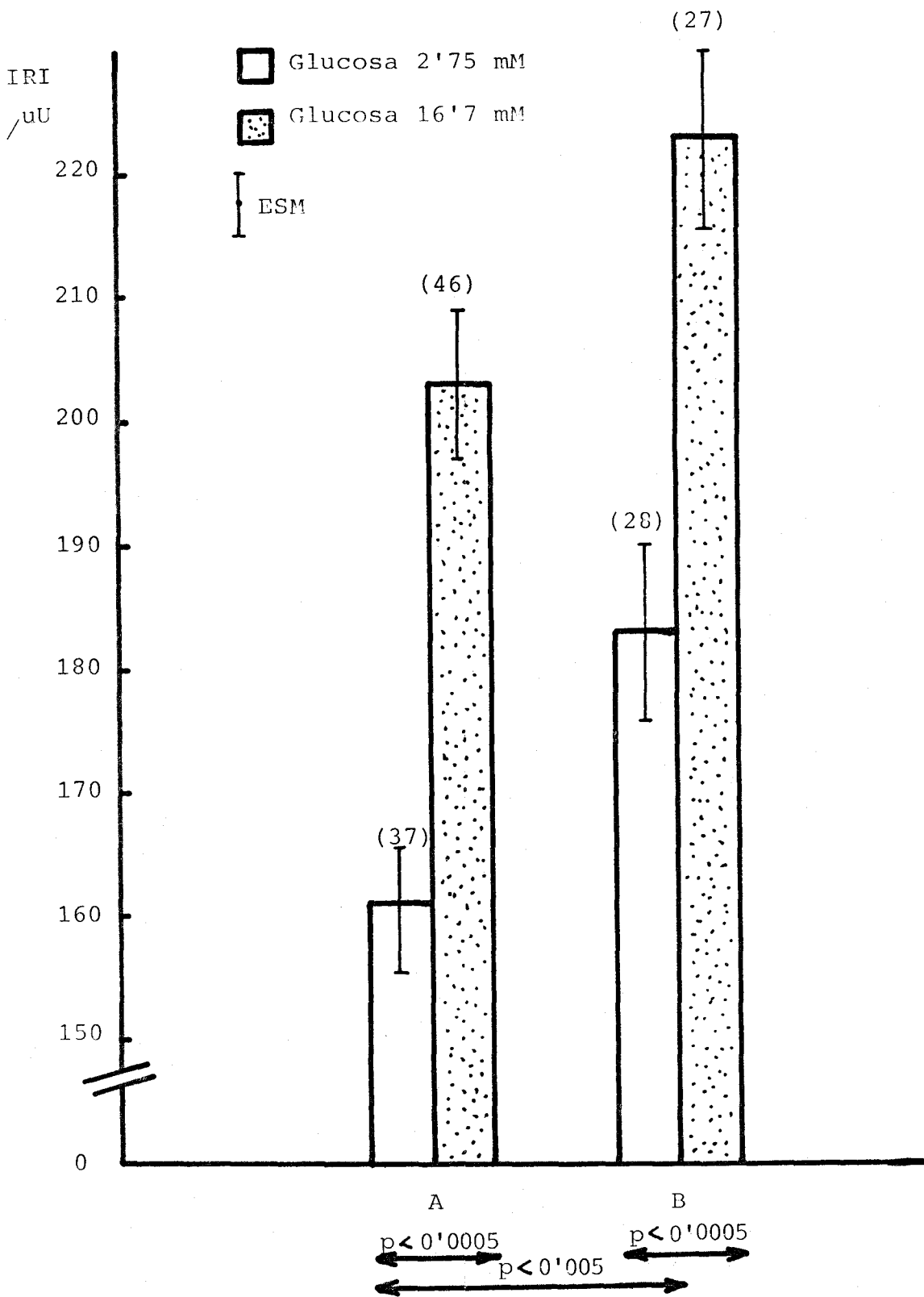


Fig.38 Influencia del db-cAMP sobre la secreción de insulina en ratas controles.

A, ratas que han sido alimentadas (controles); B, ratas que han sido alimentadas (controles) y suplementado el medio de incubación con db-cAMP 2 mM.

Resultados expresados en  $\mu$ U de insulina liberadas en 30 min por 5 islotes. En abscisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.

La figura n°( 39 ) representa la influencia del db-cAMP sobre la secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en ratas sometidas a 4 días de ayuno : A ( sin db-cAMP), B (con db-cAMP 2 mM) .

Por una parte, al aumentar la concentración de glucosa en el medio de incubación se observa un incremento de la secreción de insulina en ambos grupos, conservando la célula beta a los 4 días de ayuno la capacidad discriminatoria sobre los niveles de glucosa Por otra parte, al suplementar el medio de incubación con db-cAMP 2 mM, se observa un incremento de la secreción de insulina a ambas concentraciones del carbohidrato, con respecto al grupo de 4 días de ayuno sin db-cAMP en el medio.

Los valores individuales, la media y el error standard de cada una de la experiencias indicadas, aparecen en las tablas n°13 y 34.

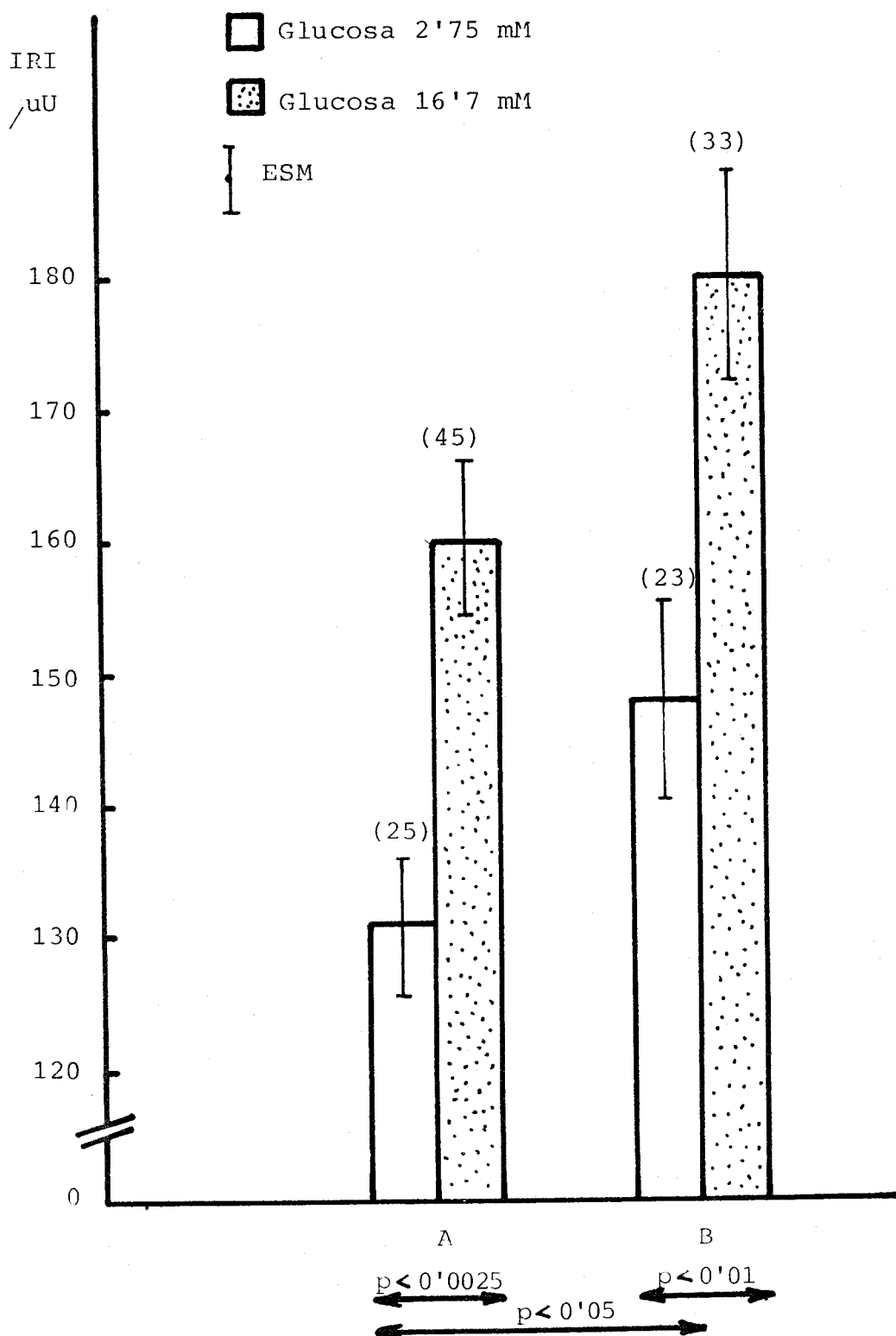


Fig.39 Influencia del db-cAMP sobre la secreción de insulina en ratas sometidas a 4 días de ayuno.  
 A, ratas sometidas a 4 días de ayuno; B, ratas sometidas a 4 días de ayuno y suplementado el medio de incubación con db-cAMP 2 mM. Resultados expresados en µU de insulina liberadas en 30 min por 5 islotes. En abcisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.

TABLA N° 33

Secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75mM y 16'7mM) y suplementado el medio de incubación con db-cAMP 2mM en islotes aislados del grupo de ratas controles.

<u>Incubación n°</u>	<u>Insulina ( ,uU/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	137	150
2	145	200
3	180	270
4	112	200
5	170	237
6	235	170
7	145	260
8	175	300
9	205	280
10	245	255
11	212	180
12	235	245
13	212	245
14	155	212
15	175	225
16	205	245
17	237	212
18	187	155
19	200	225
20	237	245
21	187	250
22	205	225
23	175	205
24	145	175
25	137	290
26	112	205

TABLA N° 33

(Continuación)

<u>Incubación n°</u>	<u>Insulina (,uU/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
27	215	170
28	150	
	$\bar{X}$	
	183'2	223'4
	ESM	
	7'4	7'9
	n	
	28	27



TABLA N°34

Secreción de insulina inducida por glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) y suplementado el medio de incubación con db-cAMP 2 mM en islotes aislados del grupo de ratas sometidas a 4 días de ayuno.

<u>Incubación n°</u>	<u>Insulina ( <math>\mu</math>U/30 min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75 mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	200	100
2	175	187
3	135	150
4	200	145
5	160	125
6	135	150
7	100	145
8	100	245
9	105	238
10	100	220
11	100	270
12	170	215
13	100	205
14	150	110
15	200	200
16	160	210
17	150	165
18	112	220
19	205	175
20	170	280
21	187	220
22	137	195
23	175	162
24		150
25		175
26		150

TABLA N° 34

(Continuación)

<u>Incubación n°</u>	<u>Insulina (,uU/30min/5 islotes)</u>		
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>	
27		175	
28		150	
29		165	
30		137	
31		100	
32		137	
33		275	
	$\bar{X}$	148'9	180'1
	ESM	8'5	7'9
	n	23	33

3.6.4. Efecto del dibutiril-cAMP sobre la secreción de glucagón en presencia de glucosa.

La figura n°( 40 ) representa la influencia del db-cAMP sobre la secreción de glucagón en presencia de glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en ratas controles y sometidas a 4 días de ayuno: A y C ( sin db-cAMP), B y D ( con db-cAMP 2 mM).

Se observa en el grupo de ratas alimentadas una disminución muy significativa a ambas concentraciones de glucosa, cuando se suplementa el medio con db-cAMP 2 mM, sobre la secreción de glucagón. Este mismo efecto se observa en el grupo de ratas de 4 días de ayuno; llegando incluso a igualar a ambas concentraciones del carbohidrato los niveles obtenidos en el grupo control, contrarrestándose así el aumento de la secreción de glucagón provocado durante el ayuno.

Los valores individuales, la media y el error standard de cada una de las experiencias indicadas, aparecen en las tablas n° 16, 17, 35 y 36.

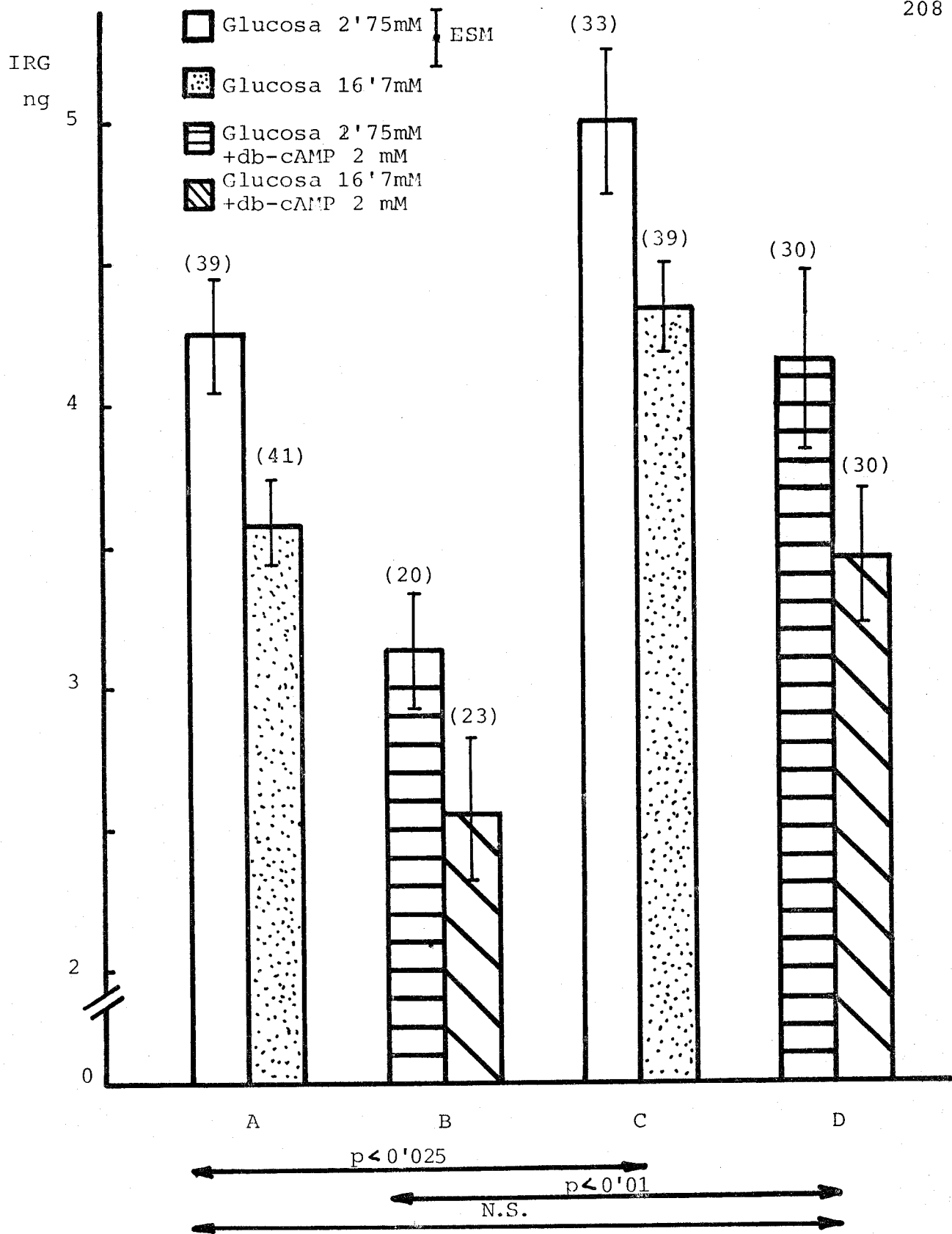


Fig.40 Influencia del db-cAMP sobre la secreción de glucagón durante el ayuno.

A y B, ratas que han sido alimentadas (controles); B y C, ratas sometidas a 4 días de ayuno.

Resultados expresados en ng de glucagón liberados en 30 min por 5 islotes. En abcisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.

La figura n° ( 41 ) representa la influencia del db-cAMP sobre la secreción de glucagón en presencia de glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en ratas alimentadas (controles): A ( sin db-cAMP), B (con db-cAMP 2 mM) .

Por una parte, se observa una disminución de la secreción de glucagón al aumentar los niveles de glucosa en ambos grupos. Se observa también una disminución de la secreción de glucagón al suplementar el medio de db-cAMP 2 mM a ambas concentraciones del carbohidrato, siendo en este caso el db-cAMP un modulador negativo de la secreción de glucagón.

Los valores individuales, la media y el error standard de cada una de las experiencias indicadas, aparecen en las tablas n°16 y 35.

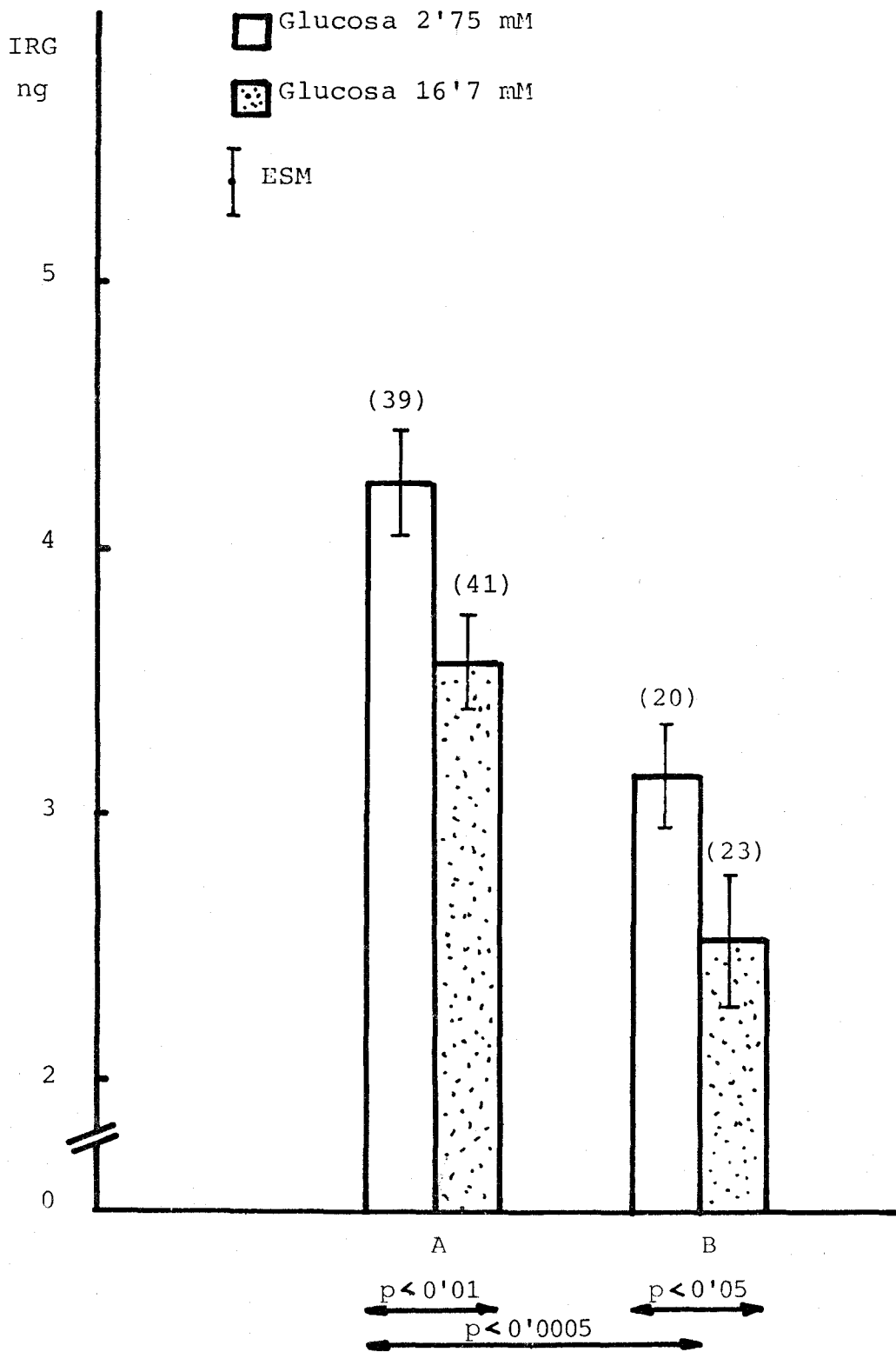


Fig.41 Influencia del db-cAMP sobre la secreción de glucagón en ratas controles.

A, ratas que han sido alimentadas (controles); B, ratas que han sido alimentadas (controles) y suplementado el medio de incubación con db-cAMP 2 mM.

Resultados expresados en ng de glucagón liberados en 30 min por 5 islotes. En abcisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.

La figura n° ( 42 ) representa la influencia del db-cAMP sobre la secreción de glucagón en presencia de glucosa a dos concentraciones (2'75 mM y 16'7 mM) en ratas sometidas a 4 días de ayuno: A (sin db-cAMP), B (con db-cAMP 2 mM).

Se observa durante el ayuno una disminución de la secreción de glucagón al aumentar los niveles de glucosa a ambas concentraciones del carbohidrato. También se observa una disminución de la secreción de glucagón al suplementar el medio de incubación con db-cAMP 2 mM, a ambas concentraciones de glucosa en islotes de ratas ayunadas de 4 días, siendo también en este caso el db-cAMP un modulador negativo de la secreción de la hormona.

Los valores individuales, la media y el error standard de cada una de las experiencias indicadas, aparecen en las tablas n°17 y 36.

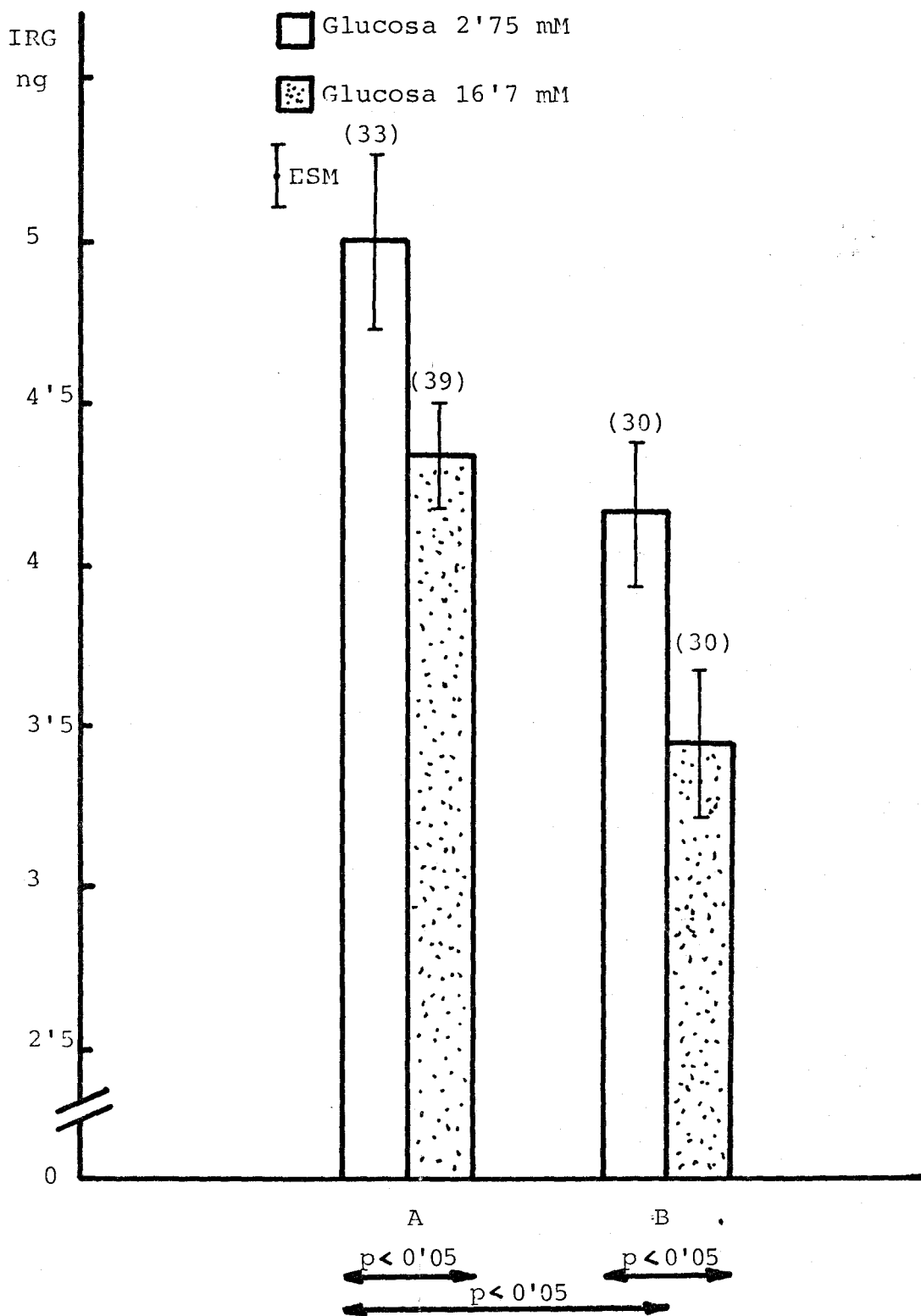


Fig. 41 Influencia del db-cAMP sobre la secreción de glucagón en ratas sometidas a 4 días de ayuno.

A, ratas sometidas a 4 días de ayuno; B, ratas sometidas a 4 días de ayuno y suplementado el medio de incubación con db-cAMP 2 mM.

Resultados expresados en ng de glucagón liberados en 30 min por 5 islotes. En abcisas se expresa el grado de significación. El número de experiencias figura entre paréntesis.



TABLA N° 35

Secreción de glucagón en presencia de glucosa a dos concentraciones (2'75mM y 16'7mM) y suplementado el medio de incubación con db-cAMP 2mM en islotes aislados del grupo control.

<u>Incubación n°</u>	<u>Glucagón (ng/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	3'5	3'1
2	4'2	1'2
3	4	3'4
4	3'4	3'7
5	4'1	2'8
6	4	4
7	3'9	4'1
8	4'2	3'4
9	3'8	1'3
10	2'6	2'6
11	4	3'5
12	2'7	3'4
13	2	2'2
14	2'8	3
15	2	2
16	2'7	3'4
17	2'8	4'5
18	2	2'5
19	2'2	0'6
20	2'2	0'6
21		0'8
22		1'3
23		1'2
	$\bar{X}$	2'55
	ESM	0'26
	n	23

TABLA N° 36

Secreción de glucagón en presencia de glucosa a dos concentraciones (2'75mM y 16'7mM) y suplementado el medio de incubación con db-cAMP 2mM en islotes aislados del grupo de 4 días de ayuno.

<u>Incubación n°</u>	<u>Glucagón (ng/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
1	3	3'8
2	3	2
3	3'3	2'5
4	3'7	2'4
5	2'7	2'9
6	2'4	2'3
7	4'2	3
8	3'1	2'6
9	2'2	4'2
10	3'6	5'8
11	2'3	4'8
12	3	4'5
13	2	2'4
14	3'3	5'5
15	3'3	6
16	3	4'1
17	5'8	4'2
18	4'7	4'2
19	5'6	3'8
20	8'2	2'5
21	4'3	3'4
22	4	2'9
23	4'8	2'6
24	4'7	5'7
25	3	3'9
26	7'9	3

TABLA N° 36

(Continuación)

<u>Incubación n°</u>	<u>Glucagón (ng/30min/5 islotes)</u>	
	<u>Glucosa 2'75mM</u>	<u>Glucosa 16'7mM</u>
27	6'7	1'1
28	4	1'9
29	8'5	2'4
30	4'8	2'8
$\bar{X}$	4'17	3'44
ESM	0'33	0'23
n	30	30

40 DISCUSSION.

A lo largo de todas las experiencias realizadas en esta línea de trabajo se ha asumido que el número de células por islote es el mismo, tanto en condiciones control (ratas alimentadas) como de privación de alimento (ratas sometidas a periodos variables de ayuno). Esta hipótesis parece válida dado que el contenido de DNA en los islotes fue constante en los diversos grupos estudiados (tabla 1), en concordancia con resultados previos de la literatura (Hedeskov y Capito, 1974; Wolters et al 1977; Bouman et al. 1979). No se conoce, sin embargo, si la proporción relativa de células alfa y beta se modifica dependiendo del estado nutricional.

El modelo experimental que se ha utilizado (incubación de islotes) permite valorar la liberación de hormonas pancreáticas en presencia de determinados secretagogos tras un tiempo prefijado. No pueden por lo tanto estudiarse las distintas fases de secreción hormonal, como ocurre en el caso de la perifusión de islotes o de la perfusión de páncreas aislados, donde se aprecia una primera etapa rápida de secreción de insulina y una segunda etapa de síntesis y secreción en respuesta al secretagogo. Este aspecto, sin embargo, no interfiere con los resultados dado que la primera etapa de liberación de la insulina almacenada tiene lugar en los primeros cinco minutos de exposición a la glucosa, mientras que las incubaciones que se han realizado se mantuvieron durante 30 minutos, tiempo suficiente para poder observar globalmente el efecto

del secretagogo tanto sobre la liberación de la hormona previamente almacenada en el islote como de la sintetizada posteriormente.

Las preparaciones de islotes de Langerhans utilizadas, eran biológicamente válidas, en tanto en cuanto poseyeron la capacidad de responder a diferentes concentraciones de glucosa y otros secretagogos, como lo prueban los resultados obtenidos sobre secreción de insulina y glucagón o contenido de AMPc.

En ratas controles, la glucosa 16'7 mM provocó un incremento de la secreción de insulina sobre la respuesta con glucosa 2'75 mM. Sin embargo, concentraciones más altas de glucosa (33'4 mM) no indujeron un aumento adicional significativo de la insulino liberación observada con glucosa 16'7 mM (figs.17y18). Estos resultados coinciden con datos previos de la literatura (ver para revisión: Ashcroft, 1976; Matthews, 1977; Malaisse et al, 1979) confirmándose que el mecanismo responsable de la secreción de insulina mediada por glucosa se satura a concentraciones del carbohidrato superiores a 16'7 mM. Resultados anteriores de nuestro laboratorio (Goberna, 1978; Arilla, 1979) obtenidos en páncreas perfundido demuestran, que si se relacionan diferentes concentraciones de glucosa con la secreción de insulina correspondiente, se obtiene una curva de tipo sigmoidal cuya rama ascen-

dente se encuentra entre 5'5 y 16'7 mM de glucosa, no aumentando posteriormente la insulino liberación en presencia de concentraciones mayores del carbohidrato; este hecho sugiere la existencia de una molécula (glucosensor o transportador de glucosa) en la membrana de la célula beta con propiedades alostéricas, cuya afinidad se modificaría en presencia de distintas concentraciones de glucosa, dando lugar a través de una serie de etapas intermedias a la correspondiente secreción de insulina.

En coincidencia con otros autores (Buchanan et al 1969; Hedekov y Capito, 1974; Levy et al. 1976; Wolters et al 1977; Bouman et al. 1979), el ayuno originó un progresivo deterioro de la capacidad secretora de la célula beta (fig. 17) frente a las dos concentraciones de glucosa utilizadas (2'75 y 16'7 mM). El ayuno de 4 días dió lugar a una insulino liberación menor que la de los controles, tanto con glucosa 2'75 como 16'7 mM, si bien los islotes poseían una capacidad de respuesta cualitativamente igual en ambos grupos. Sin embargo, tras largos periodos de ayuno (8 días), la capacidad del islote para discriminar entre distintos niveles de glucosa desapareció totalmente puesto que no hubo diferencias significativas entre la secreción de insulina observada con glucosa 2'75 o 16'7 mM. Así pues, el periodo de 4 días de ayuno no es capaz de modificar la capacidad de reconocimiento del islote sobre los niveles de glucosa, mientras

que tras 8 días se anula la sensibilidad a altos niveles del carbohidrato. A este respecto, es interesante hacer notar que el ayuno de 8 días es una situación casi terminal para las ratas utilizadas en estas experiencias, dado que son incapaces de sobrevivir más de 9-10 días en estas condiciones.

En lo que se refiere a la secreción de glucagón, la glucosa en concentraciones elevadas (16'7 mM), se comportó como un supresor. En islotes de ratas controles, la liberación de glucagón observada con glucosa 16'7 mM fué significativamente menor que con glucosa 2'75 mM, en concordancia con otros autores (Pagliara et al, 1975; Fussganger et al, 1977). Concentraciones más altas de glucosa (33'4 mM) no provocaron una inhibición adicional a la obtenida con glucosa 16'7 mM; este resultado es idéntico al observado previamente en la secreción de insulina en el sentido de que debe existir un mecanismo responsable de la inhibición de la secreción de glucagón por glucosa que se sature a concentraciones elevadas del carbohidrato (figs. 19 y 20).

El ayuno, como era de esperar, provocó un aumento progresivo sobre la secreción de glucagón (fig. 19). El ayuno de 4 días dió lugar a una secreción de glucagón más elevada que el grupo control, tanto a glucosa 2'75 mM como a 16'7 mM; si bien, como ocurre en la secreción de insulina los islotes conservan aún la capacidad discriminadora de los niveles de glucosa. Sin embargo tras



largos periodos de ayuno (8 días), el islote pierde la capacidad de diferenciar sobrecargas del carbohidrato, como se observa en la figuras (19y20) (no existen diferencias entre la secreción de glucagón con glucosa 2'75 , 16.7 y 33'4 mM a los 8 días de ayuno). Estas observaciones concuerdan con la literatura (Adibi y Drash, 1970; Marliss et al. 1970).

A la vista de los resultados expuestos podemos indicar que tras 4 días de ayuno hay una disminución de la secreción de insulina y un aumento de la de glucagón en presencia de glucosa con respecto al grupo control, pero en ambos casos los islotes pancreáticos conservan la capacidad de distinguir entre diferentes concentraciones del carbohidrato. Todo lo contrario ocurre a los 8 días de ayuno, donde disminuye aún más el descenso de la liberación de insulina y el aumento de la secreción de glucagón; pero los islotes han perdido la capacidad de reconocimiento de los distintos niveles de glucosa.

Resumiendo, el ayuno prolongado además de provocar un continuo descenso en la secreción de insulina y un progresivo aumento sobre la secreción de glucagón en presencia de glucosa, bloquea la respuesta de las células A y B pancreáticas a altos niveles de glucosa después de 8 días de privación de alimento, pero no así a los 4 días de ayuno. Esta simultánea pérdida de la sensibilidad observada después de 8 días de ayuno, podría sugerir, que la

insulina y el glucagón son segregados por mecanismo con una base común.

A este respecto, podría discutirse si la inhibición de la secreción de glucagón que se observa al aumentar la concentración de glucosa en el medio de incubación se debe al propio carbohidrato, a la insulina endógena que se libera concomitantemente o a ambos factores. La interacción mutua de las hormonas pancreáticas en su propia secreción fué sugerida por primera vez por Samols et al. (1972). Este mecanismo sería responsable de un control negativo de la secreción de glucagón por la insulina, como se observa durante el ayuno (descenso de la secreción de insulina paralelo al aumento de la secreción de glucagón).

La realimentación durante dos días de ratas sometidas previamente a un ayuno de 4 días, dio lugar a un desbloqueo de la secreción de insulina inducida por glucosa, obteniéndose niveles similares a los del grupo control, tanto si la realimentación se realizó con dieta standard o de modo selectivo con glucosa 20% por vía oral (fig. 21 ). Un resultado similar se obtuvo en el caso de la secreción de glucagón, descendiendo los niveles a los valores controles, si bien esta disminución no fué estadísticamente significativa con glucosa 16'7 mM en la realimentación con glucosa 20% por vía oral

(fig. 24 ). Las alteraciones en el estado nutricional de un animal provocan cambios compensatorios en la secreción de diversas hormonas que, consiguientemente, modifican una serie de parámetros metabólicos (Cahill, 1970; Klain, 1977). El ayuno, un estado nutricional extremo, estimula la secreción de hormonas catabólicas tales como el glucagón, a la vez que inhibe la de otras como la insulina. En contraste, la realimentación después de un periodo de ayuno revierte la actividad de los mecanismos secretores de ambas hormonas (Muller et al. 1971), volviéndose a la normalidad.

El complejo mecanismo de secreción de insulina que permite a la célula beta pancreática responder rápidamente y con alta sensibilidad a modificaciones en la concentración extracelular de glucosa, implica un acoplamiento entre las fases de estímulo y de secreción, a través de una serie de etapas en las que la transmisión de la información debe requerir la actuación de un segundo mensajero, papel que podría ser desempeñado por el  $\text{Ca}^{2+}$  o el AMPc.

Mucho se ha discutido sobre la importancia del  $\text{Ca}^{2+}$  en la secreción de insulina. Está probado que la insulino-liberación depende de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Grotsky y Bennett, 1966; Milner y Hales, 1967; Somers et al. 1977; Somers et al. 1979) pero no se conoce con certeza su papel exacto en la respuesta secretora

bifásica provocada en el páncreas endocrino al aumentar la concentración de glucosa (Henquin, 1978). Esta dependencia de la secreción de insulina con respecto al  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular puede considerarse bajo dos aspectos: un papel meramente permisivo del catión o un verdadero regulador directo de la insulino liberación como el principal mediador del efecto insulino trópico de la glucosa. Esta segunda posibilidad implicaría que un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular estimularía la secreción de insulina en ausencia de glucosa o de otros iniciadores de este proceso. Si bien algunos autores como Devis et al. (1975) han comprobado este hecho, la conclusión definitiva no parece factible por el momento, aunque la posibilidad de actuación del  $\text{Ca}^{2+}$  como segundo mensajero implicado en la insulino secreción no puede descartarse.

En el presente trabajo se han realizado incubaciones de islotes en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  7'5 mM, es decir, el triple de lo utilizado en condiciones standard. La secreción de insulina inducida por glucosa 2'75 y 16'7mM fue similar tanto en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  7'5 mM (Fig. 27 ) como 2'5 mM (Fig. 17 ). Este hecho se observó tanto en controles como tras 4 y 8 días de ayuno. Concretamente, la incapacidad de la célula beta para discriminar las dos concentraciones del carbohidrato tras 8 días de ayuno fue independiente del nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio. Parece pues que la célula beta requiere una cierta con-

centración de  $\text{Ca}^{2+}$  para que tenga lugar la secreción de insulina, pero solo hasta un determinado valor umbral. No hay que olvidar tampoco que el parámetro que realmente tiene interés es el  $\text{Ca}^{2+}$  presente en los diversos compartimentos celulares.

En lo que se refiere al glucagón, el papel del calcio en su mecanismo de secreción está muy lejos de ser dilucidado. Parece que este catión puede jugar un papel doble sobre la célula alfa, tanto permisivo como inhibitorio, dado que se han comunicado resultados aparentemente contradictorios tales como que la depleción del calcio extracelular estimula la secreción de glucagón (Edwards y Howell, 1973; Wollheim et al. 1975; Leclercq-Meyer et al. 1976; Leclercq-Meyer et al. 1979) o disminuye la respuesta del glucagón a la arginina (Gerich et al. 1974). En el presente trabajo, la incubación de islotes en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  7'5 mM dió lugar a una secreción de glucagón mayor (Fig. 28 ) que la observada con  $\text{Ca}^{2+}$  2'5 mM (Fig. 19 ) tanto con glucosa 2'75 como 16'7mM. Esta situación de hipersecreción de la célula alfa en presencia de altos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  se observó tanto en islotes de ratas controles como sometidas a 4 días de ayuno. Parece pues que el  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel de modulador positivo sobre la secreción de glucagón y que los factores nutricionales no condicionan la expresión de los diferentes mecanismos implicados en el control de

la secreción de glucagón en presencia de calcio.

La influencia que el AMPc ejerce sobre la secreción de insulina es manifiesta, aunque la literatura ha discrepado sobre este hecho, ya que Davis y Lazarus (1972), Howelly Montague (1973), Kuo et al (1973), no observan ningún efecto de la glucosa sobre el contenido insular de AMPc, mientras que trabajos más recientes tales como los de Capito y Hedekov (1974), Zawalich et al (1975), Rabinovitch et al (1976), Wolters et al (1977), Cerasi y Grill (1978), Bouman et al (1979), Goberna et al (1979), demuestran un incremento del contenido intracelular de AMPc insular en respuesta a la glucosa, concomitante a la secreción de insulina.

En concordancia con estos últimos autores, nosotros hemos observado un aumento del contenido de AMPc insular al aumentar los niveles de glucosa en el medio de incubación de 2'75 a 16'7 mM (fig. 31 ). Este aumento de AMPc coincide con un incremento de la secreción de insulina (fig. 17 ) y un descenso de la de glucagón (fig. 19 ) .

Es conocido que durante el ayuno existe una menor utilización de glucosa por la célula beta y un descenso en los niveles de AMPc insular (Capito y Hedekov, 1974; Rabinovitch et al, 1976; Bouman et al, 1979). Por otra parte los inhibidores de la fosfodiesterasa de AMPc (xantinas) elevan los niveles intracelulares del nucleó-

tido, tanto en islotes de ratas alimentadas como ayunadas (Zawalich et al 1975; Tomita y Scarpelli, 1977; Arilla, 1979). Similarmente, como se muestra en la figura( 30 ), nosotros hemos observado un descenso del contenido de AMPc insular en islotes de ratas sometidas a 4 días de ayuno con respecto a ratas controles, cuando la incubación se realizó en presencia de glucosa 16'7mM. Sin embargo, al suplementar con teofilina 10 mM el medio de incubación de los islotes de ratas ayunadas se observó una recuperación de los niveles de AMPc igualándose al grupo control. Este hecho coincide con una elevación de la secreción de insulina en islotes de ratas de 4 días de ayuno cuando se suplementa con teofilina al medio de incubación (fig. 33 ). Parece pues evidente la implicación del AMPc en la secreción de insulina inducida por glucosa. Aunque las primeras publicaciones fueron negativas a este respecto, actualmente parece fuera de duda la hipótesis, según la cual, la glucosa es capaz de aumentar el nivel de AMPc insular como primer paso en el mecanismo de secreción de insulina. Sin embargo, el problema radica en averiguar el mecanismo por el cual, la glucosa estimula la producción de AMPc y cual es la función exacta del nucleótido en la transmisión del estímulo de la glucosa al mecanismo insulino-secretor de la célula beta. El hecho de que el AMPc exógeno o las xantinas aumenten el contenido de AMPc de los islotes, no es suficiente para explicar el complejo meca-

nismo de la secreción de insulina. Resulta evidente que la glucosa tiene otros efectos importantes sobre la célula beta y parece probable que el AMPc se encuentra presente en el islote en compartimentos diferentes de modo que el que es estimulado por la glucosa tiene acceso directo al mecanismo de secreción de insulina (Cerasi y Grill, 1978).

También parece cierto que los mecanismos de secreción de insulina y de producción de AMPc, están íntimamente conexiónados, tanto en islotes de ratas alimentadas como ayunadas, siendo paralela la utilización de glucosa a los niveles del nucleótido. Durante el ayuno (Hedekov y Capito, 1975; Rabinovitch et al. 1976) existe una disminución en la utilización de la glucosa por la célula beta, lo que parece indicar que las diferencias entre la secreción de insulina de islotes de ratas alimentadas y ayunadas, puedan ser debidas a diferencias en la actividad del sistema adenilatociclasa (producción de AMPc).

Un factor importante a considerar es la correlación temporal entre la producción de AMPc y el desencadenamiento de la secreción de insulina, como discuten Bouman et al. (1979). Según estos autores, en islotes incubados con glucosa la producción de AMPc aumenta progresivamente durante los primeros 15 min, manteniéndose estable hasta los 30 min y decreciendo después; la secreción de insulina, por su parte, solo se hace patente a partir de los



15 min de incubación y aumenta después progresivamente a pesar de que la producción de AMPc disminuye. Estos datos parecen indicar que existe una primera fase de secreción de insulina en la que es fundamental la intervención del AMPc y una segunda fase independiente del nucleótido. Existen evidencias (Wolters et al. 1976) que indican la posible influencia que pueda tener en esta última fase el calcio.

En resumen, ante los datos expuestos, resulta evidente que la glucosa estimula el incremento de los niveles de AMPc en los islotes, lo que puede ser uno de los factores más importantes responsables de la secreción de insulina. Del mismo modo, es probable que las modificaciones inducidas por el ayuno en el metabolismo de este nucleótido puedan ser, en parte, responsables del deterioro de la célula beta en cuanto a la secreción de insulina en esta situación de privación de alimento.

Es conocido el efecto estimulador de las xantinas sobre la secreción de insulina inducida por glucosa. Así, la teofilina (Levy et al. 1976; Tomita y Scarpelli, 1977; Malaisse et al. 1977); cafeína (Hedeskov y Capito, 1975; Tomita y Scarpelli, 1977) e isobutilmetilxantina (Rabinovitch et al. 1976; Green et al. 1978) potencian la secreción de insulina mediada por glucosa en islotes de Langerhans.

En el presente trabajo, este hecho se confirma plenamente, dado que la incubación de islotes de ratas controladas con teofilina 5 mM potenció la secreción de insulina mediada por glucosa, tanto 2'75 como 16'7 mM.

El ayuno, como hemos indicado anteriormente, origina un deterioro de la capacidad insulinosecretora de la célula beta. Si se suplementa al medio de incubación con teofilina (fig. 33 ) (4 días de ayuno), se observa un incremento en la secreción de insulina, tanto con glucosa 2' 75 como 16'7 mM, llegando a igualar los valores del grupo control. Este incremento de la secreción de insulina inducida por glucosa en presencia de teofilina es simultáneo al aumento del contenido insular de AMPc, como se muestra en la fig. 30 , debido con toda seguridad al efecto inhibidor que tiene la teofilina sobre la fosfodiesterasa del AMPc. Sin embargo, tras largos periodos de ayuno (8 días) en los islotes suplementado con teofilina en presencia de glucosa solo se observa un desbloqueo parcial de la inhibición de la secreción de insulina, igualándose los niveles de insulina a los de islotes de ratas ayunadas (4 días) incubados solamente con glucosa, pero no llegan a los valores del grupo control (fig. 32 ). Además, se continúa observando la pérdida de capacidad discriminatoria de los niveles de glucosa del islote tras largos periodos de privación de alimento, aún

en el caso de suplementar el medio de incubación con teofilina.

Así pues, podemos indicar que en periodos de ayuno de 4 días, la teofilina en presencia de glucosa, induce un desbloqueo de la inhibición de la secreción de insulina pero no así tras 8 días de ayuno, situación en la que la célula beta solo recupera parcialmente la capacidad insulinosecretora. Debe hacerse notar nuevamente que este largo periodo de ayuno es una situación casi terminal para las ratas utilizadas en estas experiencias.

La pérdida de sensibilidad de los mecanismos secretores de la insulina durante el ayuno y su recuperación en presencia de xantinas están en consonancia con la literatura (Hedekov y Capito, 1975; Levy et al. 1976; Rabinovitch et al. 1976).

El mecanismo por el cual las xantinas aumentan la secreción de insulina tanto en islotes de ratas controles como ayunadas, se pueden explicar por dos mecanismos: el primero y más aceptado, por un incremento en los niveles intracelulares de AMPc del islote al inhibir la fosfodiesterasa del AMPc y el segundo, como indican Brisson y Malaisse (1973), por una perturbación de las xantinas sobre la distribución del calcio intracelular; una tercera posibilidad podría ser que las xantinas tengan un efecto directo sobre la translocación del calcio

en la célula a la vez que inhiben la fosfodiesterasa.

Una comprobación más directa del efecto positivo del AMPc sobre la secreción de insulina mediada por glucosa, la hemos obtenido incubando islotes con el carbohidrato y un análogo del nucleótido fácilmente permeable a través de la membrana plasmática de la célula beta (db-AMPc). Así, en la fig. 37 se observa en el grupo control un aumento significativo de la secreción de insulina con respecto al grupo que contiene solo el carbohidrato a concentraciones 2'75 y 16'7 mM. En islotes de ratas ayunadas (4 días) incubados con glucosa y db-AMPc 2 mM, se llega, como en el caso de la teofilina, a desbloquear la inhibición de la secreción de insulina provocada por el ayuno.

Estos datos son concordantes con los resultados de otros autores (Levine et al. 1970; Levy et al. 1976; Tomita y Scarpelli, 1977; Goberna et al 1978a; Arilla, 1979).

En el caso de la presencia de db-AMPc en presencia de glucosa sobre la secreción de glucagón es contrario al efecto que tiene sobre la insulina. En islotes de ratas controles, al suplementar el medio con db-AMPc, se observa una disminución de la secreción de glucagón tanto con glucosa 2'75 como 16'7 mM sobre el grupo que solo contiene el carbohidrato (fig. 41).

En lo que se refiere a la relación entre el contenido in-

sular de AMPc y la secreción de glucagón en presencia de glucosa, es notoria la correlación inversa existente entre ambos procesos a concentraciones bajas y altas del carbohidrato y tanto en ratas alimentadas como sometidas a ayuno (Figs. 30, 31 y 40). Este hecho se confirmó también en experiencias en las que los islotes se incubaron con glucosa y db-AMPc, dado que la presencia del nucleótido cíclico disminuyó la secreción de glucagón tanto, en situación de alimentación como de ayuno (Fig. 40) exhibiendo este último grupo valores similares a los controles incubados con glucosa en ausencia de db-AMPc. Los resultados en la literatura a este respecto son confusos y contradictorios, dado que se ha descrito un efecto positivo del db-AMPc sobre la secreción de glucagón (Rosselin et al. 1973; Howell et al. 1974; Jarrouse y Roselin, 1975 a), una falta de efecto del GMPc (Jarrouse y Rosselin, 1975 b), y un papel estimulador de las xantinas a baja concentración de glucosa (Chesney y Schofield, 1969; Howell et al. 1974) o a bajas y altas concentraciones del carbohidrato (Jarrouse et al. 1973), pero también se ha comunicado que las xantinas disminuyen la secreción de glucagón inducida por arginina (Marco et al. 1972).

En resumen, el aumento de la respuesta secretora de la célula alfa pancreática provocado por el ayuno, en presencia de glucosa, se correlaciona con la disminución

del contenido insular de AMPc, aunque podría especularse con la hipótesis de que la capacidad de la glucosa para inhibir la secreción de glucagón no depende de los niveles preexistentes del nucleótido en el islote.

11-1

5o CONCLUSIONES.

1. El ayuno provoca un progresivo deterioro de la capacidad secretora de la célula beta y una hipersecreción en la célula alfa, con el consiguiente descenso de la liberación de insulina y aumento de la de glucagón.
2. Periodos relativamente cortos de ayuno (4 días) solo modifican cuantitativamente los mecanismos secretorios de insulina y glucagón. Periodos largos de ayuno (8 días) dan lugar a una pérdida de la capacidad discriminatoria de las células alfa y beta sobre diferentes concentraciones de glucosa.
3. La realimentación con dieta standard o glucosa al 20 % por vía oral, durante 48 h tras 4 días de privación de alimento normaliza la secreción de insulina y glucagón en presencia de glucosa.
4. No se observan diferencias entre los grupos realimentados con dieta standard o con glucosa.
5. El aumento de calcio de 2'5 a 7'5 mM en el medio de incubación, no provoca cambios manifiestos en los islotes de Langerhans en cuanto a la secreción de insulina, si bien estimula ligeramente la secreción de glucagón en presencia de glucosa, no dependiendo los resultados



del estado nutricional.

6. La teofilina, en presencia de glucosa, en ratas sometidas a 4 días de ayuno, origina un incremento en los niveles intracelulares de AMPc, llegando a igualar el valor de islotes de ratas alimentadas incubados con glucosa.
7. La teofilina y el db-AMPc estimulan la secreción de insulina inducida por glucosa tanto en islotes de ratas controles como ayunadas. Tras 4 días de ayuno, la secreción de insulina en estas condiciones se desbloquea, igualándose a los niveles observados en islotes de ratas controles incubados solamente con glucosa.
8. El db-AMPc en presencia de glucosa, provoca un descenso en la secreción de glucagón, tanto en ratas controles como en ayunadas, llegando en este último caso a contrarrestar el aumento que provoca el ayuno sobre la secreción de esta hormona.
9. El aumento de la concentración de glucosa en el medio de incubación origina un incremento en los niveles intracelulares de AMPc en los islotes de Langerhans, concomitante con la estimulación de la secreción de insulina y la inhibición de la secreción de glucagón.

10. El ayuno de 4 días, provoca un descenso en los niveles intracelulares de AMPc de los islotes de Langerhans, en presencia de glucosa.
  
11. Parece pues evidente que la glucosa estimula la secreción de insulina a través de un incremento de los niveles insulares de AMPc. Durante el ayuno, la disminución de la concentración de este nucleótido podría ser parcialmente responsable del deterioro de la respuesta insulinosecretora de la célula beta a la glucosa. El AMPc se comporta por lo tanto como un modulador positivo de la secreción de insulina inducida por glucosa mientras que ejerce el papel de modulador negativo sobre la secreción de glucagón.

62 BIBLIOGRAFIA.

ADIBI, S.A. and DRASH, A.L.

Hormone and amino acid levels in altered nutritional states.

J. Lab. Clin. Med. 76: 722, 1970.

APPLEMAN, M. and KEMPS, R.

Puromycin a potent metabolic effect independent of protein synthesis.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 24: 564, 1966.

ARILLA, E.

Cinética de la secreción de insulina durante el ayuno.

Tesis Doctoral. Sevilla, 1979.

ARILLA, E., GARCIA RECUERO, A., LUCAS, M. y GOBERNA, R.

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

XIX Congreso Nacional de Endocrinología, Cadiz, 1979.

ASCHROFT, S.J.H., BASSET, J.M. and RANDLE, P.J.

Insulin secretion mechanism and glucose metabolism in isolated islets.

Diabetes 21: (suppl.2) 538, 1972.

ASCHROFT, S.J.H.

The control of insulin release by sugars.

En: polypeptide hormones: molecular and cellular aspects.

Exp. Med. Amsterdam, 117: 1976.

ASSAN, R., ROSSELIN, G. et DOLLAIS, J.

Effects sur la glucagonémie des perfusions et ingestions d'acidez amines.

Journées Ann Diabetol. Hotel Dieu. 7: 25, 1967.

BAILEY, C.J. and MATTY, A.J.

Glucose tolerance and plasma insulin of the rat in selection to the oestrus cycle and sex hormones.

Horm. Metab. Res. 4: 266, 1972.

BALASSE, E., COUTUNIER, E. and FRANCKSON, J.

Influence of sodium, beta-hydroxybutyrate on glucose and free fatty acid metabolism in normal dogs.

Diabetologia, 3: 488, 1967.

BALASSE, E. and OOMS, H.

Changes in the concentration of glucose, free fatty acids, insulin and ketone bodies in the blood during sodium beta-hydroxybutyrate infusions in man.

Diabetologia, 4: 33, 1968.

BEHALL, K.M., KELSAY, J.L. and CLARK, W.M.

Response of serum lipids and insulin in man to sugars ingested with or without other foods.

Nutr. Rep. Int. 14: 485, 1976.

BLOOM, S.R., VAUGHN, N.J.A. and RUSSELL, R.C.G.

Vagal control of glucagon release in man.

Lancet. 2: 546, 1974.

BOTTGER, I.G.R., FALOONA, R.E., DOBBS and UNGER, R.H.

The effects of triglyceride absorption upon glucagon, insulin and gut glucagon like immunoreactivity.

J.Clin. Invest. 52: 2532, 1973.

BOUMAN, P.R., WOLTERS, G.H.J. and KONIJNENDIJK, W.  
Insulin secretion and cyclic adenosine 3',5' monophosphate levels in pancreatic islets of fed and fasted rats.

Diabetes. 28: 132, 1979.

BRAATEN, J.T., FALOONA, G.R. and UNGER, R.H.  
The effect of insulin on the alpha cell response to hyperglycemia in long-standing alloxan diabetes.

J. Clin. Invest. 53: 1017, 1974.

BRISSEON, G.R. and MALAISSE, W.J.  
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release.

XI. Effects of theophylline and epinephrine on  $^{45}\text{Ca}$  efflux from perifused islets.

Metabolism. 22: 455, 1973.

BROWN, B.L. and EKINS, R.P.

A saturation assay for cyclic adenosine monophosphate.

Clin. Sci. 38: 27, 1970.

BROWN, M. and VALE, W.

Glucoregulatory effects of neurotensin (NT) and substance P (SP).

Clin. Res. 24: 154-A, 1976.

BRUNZELL, J.D., LERNER, R.L., HAZZARD, W.R., PORTE, D. and BIERMAN, E.L.

Improved glucose tolerance with high carbohydrate feeding in mild diabetes.

N. Engl. J. Med. 284: 521, 1971.

BUCHANAN, K.D., VANCE, J.E. and WILLIAMS, R.H.  
Effect of starvation on insulin and glucagon release  
from isolated islets of Langerhans of the rat.  
Metabolism. 18: 155, 1969.

CAHILL, G.F., Jr. HERRERA, M.G., MORGAN, A.P., SOLDNER,  
J.S., STEINKE, J., LEVY, P.L., REICHARD, J.A. Jr. and  
KIPNIS, D.M.  
Hormone fuel interrelationships during fasting.  
J.Clin.Invest. 45: 1751, 1966.

CAHILL, G.F. Jr.  
Starvation in man.  
New.Engl. J.Med. 282: 688, 1970.

CAPITO, K. and HEDESKOV, J.M.  
The effect of starvation on phosphodiesterase activity  
and content of adenosine 3', 5' cyclic monophosphate  
in isolated mouse pancreatic islets.  
Biochem. J. 142: 653, 1974.

CERASI, E.  
Mechanisms of glucose stimulated insulin secretion in  
health and in diabetes some reevaluations and proposals.  
Diabetologia. 11: 1, 1975

CERASI, E. y GRILL, V.  
Papel del AMPc insular en el control de la secreción de  
insulina.  
Rev.Clin. Esp. 148: 589, 1978.

CERASI, E. and LUFT, R.

The plasma insulin response to glucose infusion in healthy subjects and in diabetes mellitus.

Acta Endocr. (Kbh). 55: 278, 1967.

CERASI, E. and LUFT, R.

Is diabetes mellitus a disorder of the cellular information transmission ?.

Acta Diabet. Lat. 7 (suppl. 1) 278, 1970

COOPER, R.H., ASCHROFT, S.J.H. and RANDLE, P.J.

Concentration of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate in mouse pancreatic islet measured by a protein binding radioassay.

Biochem. J. 134: 599, 1973

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.

COSTRINI, N.V. and KALKOFF, R.K.

Relative effects of pregnancy, estradiol and progesterone on plasma insulin and pancreatic islet insulin secretion.

J. Clin. Invest. 50: 992, 1971



CRAPO, P.A., REAVEN, G. and OLEFSKY, J.

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

Diabetes, 25: 741, 1976

CURRY, D.L. and BENNETT, L.L.

Reversal of somatostatin inhibition of insulin secretion by calcium.

Biochem.Biophys.Res.Comm. 60: 1015, 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.

CHERRINGTON, A.D., KAWAMORI, R., PEK, S. and VRANIC, M.

Arginine infusion in dogs: model for the roles of insulin and glucagon in regulating glucose turnover and free fatty acid levels.

Diabetes, 23: 805, 1974.

CHESNEY, T.M.C. and SCHOFIELD, J.G.

Studies on the secretion of pancreatic glucagon.

Diabetes, 18: 627, 1969.

DAVIS, B. and LAZARUS, N.R.

Insulin release from mouse islets. Effect of glucose and hormones on adenylate cyclase.

Biochem J. 129: 373, 1972.

DEVENYI, T. and GERGELY, J.

Aminoacids, peptides and proteins.

Ed. Elsevier, Amsterdam. 1974.

DEVIS, G., SOMMERS, E., VAN OBBERGHEN, and MALAISSE, W.J.  
Calcium antagonists and islet function.

I. Inhibition of insulin release by verapamil.

Diabetes. 24: 547, 1975.

DUBOIS, M.

Immunoreactive somatostatin is present in discrete cells  
of the endocrine pancreas.

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 72: 1340, 1975

DUPRE, J., CURTIS, J., INGER, R.H., WADDELL, R.W. and  
BECK, J.C.

Effects of secretin, pancreozymin, or gastrin on the  
response of the endocrine pancreas to administration of  
glucose or arginine in man.

J. Clin. Invest. 48: 745, 1969.

EDWARDS, J.C. and HOWELL, S.L.

Effects of vinblastine and colchicine on the secretion  
of glucagon from isolated guinea-pig islets of Langerhans.

Febs. Lett. 30: 89, 1973.

EDWARDS, J.C. and TAYLOR, K.W.

Radioimmunoassay of glucagon release from isolated  
guinea-pig islets of Langerhans incubated in vitro.

Biochim. Biophys. Acta. 215: 297, 1970.

FAJANS, S.S. and FLOYD, J.C. Jr.

Stimulation of islets cell secretion by nutrients and by  
gastrointestinal hormones released during starvation.

Handb. Physiol. Sec. 7,1, 473, 1972.

FAJANS, S.S., CHRISTENSEN, H.N., FLOYD, J.C.Jr. and PEK, S.

Stimulation of insulin and glucagon release in the dog by a non metabolizable arginine analog.

Endocrinology. 94: 230, 1974.

FEDERSPIEL, G., CASARA, D., PEDRAZZOLI, S., SICOLO, N. and SCANDELLARI, C.

In vivo studies of 5-hydroxy-tryptomine and insulin secretion in dogs acid in man.

Diabetologia. 10: 13, 1974

FELIG, P.

The glucose-alanine cicle.

Metabolism. 22: 179, 1973.

FOA, P.P.

Glucagon 1977.

En: glucagon, its role in Physiology and clinical Medicine.

Eds. Foa, P.P., Bajaj, J.S. and Foa, N.L.

Springer-Verlag, New Yorck. 19, 1977.

FROHMAN, L.A. and BERNARDIS, L.L.

Effect of hipothalamic stimulation on plasma glucose, insulin and glucagon levels.

Am.J. Physiol. 221: 1596, 1971.

FUJIMOTO, W.Y. and ENSINCK, J.W.

Somatostatin inhibition of insulin and glucagon secretion in rat islets culture. Reversal by ionophore A 23187.

Endocrinology. 98: 259, 1976

FUJITA, Y., COTTO, A. and UNGER, R.H.

Relationships of insulin and glucagon to triglyceride levels during a high and low carbohydrate intake.

Diabetes. 24: 552, 1975.

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.

FUSSGANGER, R., SUSSMANN, D., HAGER, G., HEINZE, E. SCHALEYER, M. and PFEIFFER, E.F.

En: Endocrinology.

Ed. JAMES, V.H.T.

Exp. Med. Amsterdam. 558, 1977.

GEORGE, D.T. and RAYFIELD, E.G.

L-dopa induced plasma glucagon release.

J.Clin. Endocrinol. Metab. 39: 618, 1974.

GERICH, J.E., CHARLES, M.A. and GRODSKY, G.M.

Characterization of effect of arginine and glucose on glucagon and insulin release from perfused rat pancreas.

J.Clin. Invest. 54: 833, 1974 a.

GERICH, J.E., FRANKEL, B.J., FANSKA, R., WEST, L., FORSHAM, P.H. and GRODSKY, G.M.

Calcium dependency of glucagon secretion from the in vitro perfused rat pancreas.

Endocrinology. 94: 1381, 1974 a.

GILMAN, A.G.

A protein binding assay for adenosine 3',5' cyclic monophosphate.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 67: 305, 1970

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.

Diabetologia. 7: 68, 1971a .

GOBERNA, P., VOIGT, K.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. 89: 974, 1971b .

GOBERNA, R.

Hormonas gastrointestinales y secreción de insulina.

Actas Soc. Endocrinol. Madrid. IV(2): 71, 1972.

GOBERNA, R., GARCIA-ALBERTOS, F. y TAMARIT-RODRIGUEZ, J.  
Acción de los estrógenos y gestágenos sobre la secreción de insulina y asimilación de la glucosa.

Actas Soc. Endocrinol. Madrid. VII: 275, 1972.

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 Int. Diabetes Fed. Exp. Med. Int. Congr. Ser. 280: 22, 1973.

GOBERNA, R., TAMARIT, J. Jr., OSORIO, J., FUSSGANGER, R.,  
TAMARIT, J. and PFEIFFER, E.F.

Action of beta-hydroxybutirate, acetoacetate and palmitate on the insulin release in the perfused isolated rat pancreas.

Horm. Metab. Res. 6: 256, 1974.

GOBERNA, R.

¿ Cómo se segrega la insulina ?.

Investigación y Ciencia (Scientific American, edición en español). 21: 93, 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 prolonged fasting.

Diabetologia. 15: 235, 1978a.

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. 108, 1978b.

GOBERNA, R., ORTIZ, S., ARILLA, E., BEDOYA, F. and SOBRINO, F.

Modifications of intracellular levels of cAMP in the beta-cell during fasting.

X Congress of the Int. Diabetes Fed. Exp. Med. Int. Congr. Ser. 481: 75, 1979.

GOODNER, C.J. and PORTE , D.Jr.

Determinants of basal islet secretion in man.  
Handb.Hpysiol.Sec. 7,1: 597, 1972.

GREEN, I.C., PERRIN, D. and HOWELL, S.L.

Insulin release in isolated islets of Langerhans of pregnant rats. Relationship between glucose metabolism and cyclic AMP.

Horm.Metb.Res. 10: 32, 1978.

GRILL, V. and CERASI, E.

Stimulation by D-glucose of cyclic 3'-5'-adenosine monophosphate accumulation and insulin release in isolated pancreatic islets of the rat.

J.Biol.Chem. 249: 4196, 1974.

GRILL, V. and CERASI, E.

Glucose-induced AMP accumulation in the rat islets of Langerhans preferential effects of the alpha anomer.

Febs.Letters. 54: 80, 1975.

GRODSKY, G.M., BATTS, 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 requirement for insulin secretion in the isolated perfused pancreas.

Diabetes. 15: 910, 1966.

GRODSKY, G.M.

Insulin and the pancreas.

Vitam.Horm. New York. 28: 37, 1970

HAWKINS, R.A., ALBERTI, K.G.M.M., HOUGHTON, C.R.S.,  
WILLIAMSON, D.H. and KREBS, H.A.

The effect of acetoacetate on plasma insulin concentration.

Biochem.J. 125: 541, 1971.

HEDESKOV, C.J. and CAPITO, K.

The effect of starvation on insulin secretion and glucose metabolism in mouse pancreatic islets.

Biochem.J. 140: 423, 1974.

HEDESKOV, C.J. and CAPITO, K.

The restoring effect of caffeine on the decreased sensitivity of the insulin secretory mechanism in mouse pancreatic islets during starvation.

Horm.Metab.Res. 7: 1, 1975.

HELLERSTROM, C., WESTMAN, S., WARSDEN, N. and TURNER, D.

En: the structure and metabolism of the pancreatic islets.

Eds. Falkmer, S., Hellman, B., Taljedal, I.B.

Pergamon Press. 135: 1970.

HELLMAN, B., SEHLIN, J. and TALJEDAL, I.B.

Uptake of alanine, arginine and leucine by mammalian pancreatic beta cell.

Endocrinology. 89: 1432, 1971.



HELLMAN, B., IDAHL, L.A., LERNMARK, A. and TALJEDAL, I.B.  
The pancreatic beta-cell, recognition of insulin secre-  
tagogues: does cyclic AMP mediate the effects of glucose?.  
Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 71: 3405, 1974.

HENQUIN, J.C.

Relative importance of extracellular calcium for insulin  
secretion in the isolated perfused pancreas.  
Diabetes. 15:910, 1978.

HOWELL, S.L. and MONTAGUE, W.

Adenylate cyclase activity in isolated rat islets of  
Langerhans. Effects of agents which alter rates of in-  
sulin secretion.

Biochim. Biophys. Acta. 320: 44, 1973.

HOWELL, S.L., EDWARDS, J.C. and MONTAGUE, W.

Regulation of adenylate cyclase and cyclic-AMP dependent  
protein kinase activities in A<sub>2</sub>-cell rich guinea-pig  
islets of Langerhans.

Horm.Metab.Res. 6: 49, 1974.

HUNTER, W.M. and GREENWOOD, F.C.

Preparation of iodine-131 labelled human growth activity.  
Nature. London. 194: 495, 1962.

IVERSEN, J.

Secretion of glucagon from the isolated perfused canine  
pancreas.

J. Clin. Invest. 50: 2123, 1971,

IVERSEN, J.

Adrenergic receptors in the secretion of glucagon and insulin from the isolated perfused canine pancreas.

J.Clin.Invest. 52: 2102, 1973a.

IVERSEN, J.

Effect of acetylcholine on the secretion of glucagon and insulin from the isolated perfused canine pancreas.

Diabetes. 22: 381, 1973b.

JARRET, R.J. and KEEN, H.

Oxidation of sugars other than glucose by isolated mammalian islets of Langerhans.

Metabolism. 17: 155, 1968.

JARROUSSE, C., RANCON, F., ROSSELIN, G. et FREYCHET, P.

Secretion de l'insulin et du glucagon par le pancréas du rat nouveau-né: effet du glucose et de l'adenosine 3',5' cyclique monophosphate.

C.R. Acad.Sci. Paris. 276: 797, 1973.

JARROUSSE, C. and ROSSELIN, G.

Interaction of amino acids and cyclic AMP on the release of insulin and glucagon by newborn rat pancreas.

Endocrinology. 96: 168, 1975a.

JARROUSSE, C. and ROSSELIN, G.

Regulation by glucose and cyclic nucleotides of the glucagon and insulin release induced by amino acids.

Diabetes et Metabolism . Paris. 1: 135, 1975b.

JOHNSON, D.G., FUJIMOTO, W.Y. and WILLIAMS, R.H.

Enhanced release of insulin by prostaglandins in isolated pancreatic islets.

Diabetes.22: 658, 1973.

KARAM, J., GRASSO, S., WEGRINKA, L., GRODSKY, G. and FORSHAM, P.

Effect of selected hexoses of epinephrine, and of glucagon on insulin secretion in man.

Diabetes. 15: 571, 1966.

KLAIN, G.J.

In vivo effects of glucagon on fatty acid synthesis in fasted and refed rats.

J.Nutrition. 107: 942, 1977.

KISSANE, J.M. and ROBINS, E.

The fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous system.

J.Biol.Chem. 233: 184, 1958.

KUO, W.N., HODGINS, D.S. and KUO, J.F.

Adenylate cyclase in islets of Langerhans. Isolation of islets and regulation of adenylate cyclase activity by various hormones and agents.

J.Biol.Chem. 248: 2705, 1973.

LACY, P.E. and KOSTIANOVSKY, M.

Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas.

Diabetes. 16: 35, 1967.

LAMBERT, A.E., KANAZAWA, Y., 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.

LAUBE, H., FUSSGANGER, R., GOBERNA, R. and PFEIFFER, E.F.  
Human placental lactogen and its effect upon the in-  
sulin release of the isolated perfused rat pancreas.

Acta Endocr. (suppl.155) 187, 1971.

LECLERCQ-MEYER, V. BRISSON, G.R. and MALAISSE, W.J.

Effect of adrenaline and glucose on release of glucagon  
and insulin in vitro.

Nature (New Biol.) 231: 248, 1971.

LECLERCQ-MEYER, V., MARCHAND, J. and MALAISSE, W.J.

The effect of calcium and magnesium on glucagon secre-  
tion.

Endocrinology. 93: 1360, 1973.

LECLERCQ-MEYER, V., MARCHAND, J. and MALAISSE, W.J.

The role of calcium in glucagon release. Interactions  
between glucose and calcium.

Diabetologia. 12: 531, 1976.

LECLERCQ-MEYER, V., MARCHAND, J. and MALAISSE, W.J.

Calcium dependency of glucagon release: its modulation  
by nutritional factors.

Ann.J.Physiol. 236(2), E-98, 1979.

LEVINE, R.A., OYAMA, S., KAGAN, A. and GLICK, S.M.  
Stimulation of insulin and growth hormone secretion  
by adenine nucleotides in primates.

J.Lab.Clin. Med. 75: 30, 1970.

LEVY, J., HERCHUELZ, A., SENER, A. and MALAISSE, W.J.  
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced  
insulin release. XX. Fasting: a model for altered  
glucose recognition by the beta-cell.

Metabolism. 25: 583, 1976.

LUFT, R., EFENDIC, S., HOKFELT, T., JOHANSSON, O. and  
ARIMURA, A.

Immunochemical evidence for the localization of soma-  
tostatin-like immunoreactivity in a cell population of  
the pancreatic islets.

Med.Biol. 52: 428, 1974.

LUNDQUIST, I., FANSKA, R. and GRODSKY, G.M.

Interaction of calcium and glucose on glucagon secretion.

Endocrinology. 99: 1304, 1976.

LUYCKX, A.S. and LEFEBVRE, P.J.

Arguments for a regulation of pancreatic glucagon secre-  
tion by circulating free fatty acids.

Proc. Soc. Exp. Biol.Med. 133: 524, 1970.

MADISON, L.L., MEBANE, R., UNGER, R.H. and LOCHNER, A.

The hypoglycemic action of ketones. II. Evidence for a  
stimulatory feedback of ketones on the pancreatic beta  
cell.

J.Clin.Invest. 43: 408, 1964.

MADISON, L.L.m SEYFFERT, W.A.Jr., UNGER, R.H. and  
BARKER, B.

Effect of plasma free fatty acids on plasma glucagon  
and serum insulin concentrations.

Metabolism. 17: 801, 1968.

MALAISSSE, W.J., MALAISSSE-LAGAE, F. and Mc. CAW, E.F.

Effects of thyriod function upon insulin secretion.

Diabetes. 16: 643, 1967a.

MALAISSSE, W.J., MALAISSSE-LAGAE, F. and MAYHEW., D.

A possible role for the adenyl-cyclase system in insulin  
secretion.

J.Clin.Invest. 46: 1724, 1967b.

MALAISSSE, W.J., MALAISSSE-LAGAE, F. and WRIGHT, P.H.

A new method for the measurement of "in vitro" pancreatic  
insulin secretion.

Endocrinology. 80: 99, 1967c.

MALAISSSE, W.J., MALAISSSE-LAGAE, F., WRIGHT, P.H. and

ASHMORE, J.

Effects of adrenergic and cholinergic agents upon insulin  
secretion in vitro.

Endocrinology. 80: 975, 1967d.

MALAISSSE, W.J., MALAISSSE-LAGAE, F., PICARD, C. and

FLAMENT-DURAND, J.

Effects of pregnancy and chorionic growth hormone upon  
insulin secretion.

Endocrinology. 84: 41, 1969.

MALAISSÉ, W.J., SENER, A., KOSER, M., RARAZZOLA, M.  
and MALAISSÉ-LAGAE, F.

The stimulus-secretion coupling of glucose-induced  
insulin release.

Biochem.J. 164: 447, 1977.

MALAISSÉ, W.J., SENER, A., HERCHUELZ, A. and HUTTON, J.C.

Insulin release: the fuel hypothesis.

Metabolism. 28: 373, 1979.

MANN, J.I. and TRUSWELL, A.S.

Effects of isocaloric exchange of dietary sucrose and  
starch on fasting serum lipids, postprandial insulin  
secretion and alimentary lipaemia in human subjects.

Br.J.Nutr. 27: 395, 1972.

MARCO, J., MELANI, F., GOBERNA, R., ROTH, W.H. und  
PFEIFFER, E.F.

Einfluss der prednisolobehandlung auf die insulin se-  
kretion der ratte.

Diabetologia. 4: 365, 1968.

MARCO, J., DIAZ-FIERROS, M., BAROJA, I.M., VILLANUEVA,  
M.L. and VALVERDE, I.

Oposite effects of aminophylline on arginine-induced  
glucagon and insulin secretion in humans.

Diabetes. 21: 289, 1972.

MARCO, J., CALLE, D., RAMON, M., DIAZ-FIERROS, M.,  
VILLANUEVA, M.L. and VALVERDE, I.

Hyperglucagonism induced by glucocorticoid treatment in  
man.

New Engl.J.Med. 288: 123, 1973

MARLISS, E.B., AOKI, T.T., UNGER, R.H., SOELDNER, J.T.  
and CAHILL, G.F.Jr.

Glucagon levels and metabolic effects in fasting man.  
J.Clin.Invest. 49: 2256, 1970.

MARLISS, E.B., GIRARDIER, L., SEYDOUX, J., WOLLHEIM, C.B.  
KANAZAWA, Y., ORCI, L., RENOLD, A.E. and PORTE, D.Jr.

Glucagon release induced by pancreatic nerve stimulation  
in the dog.

J.Clin.Invest. 52: 1246, 1973.

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.

MATTHEWS, E.K.

Insulin secretion.

First European Symposium on Hormones and cell Regulation.

Eds. Dumont and Nuñez, Elsevier, Amsterdam. 57, 1977.

MILNER, R.D.G. and HALES, C.H.

The role of calcium and magnesium in insulin secretion  
from rabbits pancreas studied in vitro.

Diabetologia. 3: 47, 1967.

MONTAGUE, W. and HOWELL, S.L.

En: "Advances in cyclic nucleotide research". 6:201, 1975.

MULLER, W.A., FALOONA, G.R. and UNGER, R.H.

The effect of alanine on glucagon secretion.

J.Clin.Invest. 50: 2215, 1971a.



MULLER, W.A., FALOONA, G.R. and UNGER, R.H.

The influence of antecedent diet upon glucagon and insulin secretion.

New Engl. J.Med. 285: 1450, 1971b.

OHNEDA, A., PARADA, E., EISENTRAUT, A.M. and UNGER, R.H.

Characterization of circulating glucagon to intraduodenal and intravenous administration of amino acids.

J.Clin.Invest. 47: 2305, 1968.

ORCI, L.

The islet of Langerhans: a multihormonal micro-organ.

En: Insulin and Metabolism. Ed. Bajaj, J.S.

Exp.Med. Amsterdam. 1, 1977.

OSORIO, J., CAMPILLO, J.E., GARCIA DE LOS ARCOS, J.,

PAJES, I., RODRIGUEZ, E., MARASCO, M. and MELANI, F.

Inhibition of the glucose induced insulin release by somatostatin in the isolated perfused rat pancreas.

Action of cyclic AMP, glucagon and glibenclamide.

Rev.Esp.Fisiol. 32: 211, 1976.

PAGLIARA, A.S., STILLINGS, S.N., HOOVER, B., MARTIN, D.M.

and MATSCHINSKY, F.M.

Glucose modulation of amino acid induced glucagon and insulin release in isolated perfused rat pancreas.

J.Clin.Invest. 54: 819, 1974.

PAGLIARA, A.S., STILLINGS, S., HAYMOND, M.W., HOOVER, B.A.

and MATSCHINSKY, F.M.

Insulin and glucose as modulators of the amino acid induced glucagon release in the isolated pancreas of alloxan and streptozotocin diabetic rats.

J.Clin.Invest. 55: 244, 1975.

PALMER, J.P., BENSON, J., WERNER, P. and ENSINCK, J.  
Glucagon secretion in a totally pancreatectomized  
patient.

Clin.Res. 24: 119A, 1976.

PORTE, D.Jr., GRABER, A.L., KUZUYA, T. and WILLIAMS, R.H.  
The effect of epinephrine on immunoreactive insulin  
levels in man.

J.Clin.Invest. 42: 228, 1966.

PORTE, D.Jr. and PUPO, A.A.

Insulin response to glucose: evidence for a two pool  
system in man.

J.Clin.Invest. 48: 2309, 1969.

PRIETO, J.C., CIFUENTES, I. and SERRANO-RIOS, M.  
HCS regulation during pregnancy.

Obstet.Gynec. 48: 297, 1976.

QUICKEL, K.E., FELDMAN, J.M. and LEOVITZ, H.  
Inhibition of insulin secretion by serotonin and  
dopamine: species variation.

Endocrinology. 89: 1295, 1971.

RABINOVITCH, A. and DUPRE, J.

Effects of gastric inhibitory polypeptide present in  
impure pancreozymin cholecystokinin on plasma insulin  
and glucagon in the rat.

Endocrinology. 94: 1139, 1974.

RABINOVITCH, A., GRILL, V., RENOLD, A.E. and CERASI, E.  
Insulin release and cyclic AMP accumulation in response  
to glucose in pancreatic islets of fed and starved rats.  
J.Clin.Invest. 58: 1204, 1976.

RABINOVITCH, A., CERASI, E. and SHARP, G.W.  
Adenosine 3'-5' monophosphate-dependent and independent  
inhibitory effects of epinephrine on insulin release  
in rat pancreatic islets.  
Endocrinology. 102: 1733, 1978.

REAVEN, G.M. and OLEFSKY, J.M.  
Increased plasma glucose and insulin response to high-  
carbohydrate feeding in normal subjects.  
J.Clin.Endocrinol.Metab. 38: 151, 1974.

REHFELD, J.F. and STADIL, F.  
The effect of gastrin on basal and glucose-stimulated  
insulin secretion in man.  
J.Clin.Invest. 52: 1415, 1973.

ROCHA, D.M., FALOONA, G.R. and UNGER, R.H.  
Glucagon stimulation activity of twenty amino acids in  
dogs.  
J.Clin.Invest. 51: 2346, 1972.

ROSSELIN, G., ASSAN, R., YALOW, R.S. and BERSON, S.A.  
Separation of antibody-bound and unbound peptide hormo-  
nes labelled with iode-131 by talcum powder and preci-  
pitated silica.  
Nature. 212: 355, 1966.

ROSSELIN, G., JARROUSE, C., RANCON, F. et PORTHA, B.  
L'AMP cyclique mediateur de la secretion du glucagon due  
aux acides amines.

C.R.Acad.Sci.Paris. 276: 1017, 1973.

SAKURAI, H., DOBBS, R.E. and UNGER, R.  
Somatostatin induced changes in insulin and glucagon  
secretion in normal and diabetic dogs.

J.Clin.Invest. 54: 1395, 1974.

SAMOLS, E., TYLER, J.M. and UNGER, R.H.  
Glucagon insulin interrelationships.

En: Glucagon Molecular Physiology. Clinical and thera-  
peutic implications.

Eds. Lefebvre, P.J. and Unger, R.H.

Pergamon. Oxford. 151, 1972.

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.

SEINO, V., IKEDA, M., KUZUYA, H., SAKURAI, H. and IMURA, H.  
Effect of 5-hydroxytryptophan, l-dopa, and bethanidine  
on plasma insulin response to intravenous glucose loading  
in normal subjects.

Horm.Metab.Res. 7: 92, 1975.

SELAWRY, H., GURMAN, R., FINK, G. and RECENT, L.  
The effect of starvation on tissue adenosine 3'-5'  
monophosphate levels.

Biochem.Biophys.Res.Comm. 51: 198, 1973.

SHAH, J. and CERCHIO, G.M.

Hypoinsulinemie of hypothyroidism.

Arch.Intern.Med. 132: 657, 1973.

SHAPP, R., CULBERT, S., COOK, J., JENNINGS, A. and  
BURR, I.M.

Cholinergic modification of glucose-induced biphasic  
insulin release in vitro.

J.Clin.Invest. 53: 710, 1974.

SOMERS, G., DEVIS, G. and MALAISSE, W.J.

Is extracellular calcium required for stimulation of  
insulin release by glucose?.

Diabetologia. 13: 433, 1977.

SOMERS, G., DEVIS, G. and MALAISSE, W.J.

Calcium antagonists acid islet function. IX. Is extra-  
cellular calcium required for insulin release?.

Acta Diabet.Lat. 16: 9, 1979.

SUSSMAN, K.E. and VAUGHAN, G.D. and TIMMER, R.F.

An "in vitro" method for studying insulin secretion in  
the perfused isolated rat pancreas.

Metabolism. 15: 466, 1966.

TAMARIT, J., TAMARIT-RODRIGUEZ, J., GOBERNA, R. and  
LUCAS, M.

Inhibition of insulin secretion "in vitro" by somatosta-  
tin.

Rev.Esp.Fisiol. 30: 299, 1974.

TAMARIT-RODRIGUEZ, J., LUCAS, M., CEBEIRA and VIEJO, F.  
Action of glucose 1-P, glucose 6-P, and glucose 6-P  
on glucose induced insulin secretion in the perfused  
rat pancreas.

Diabetologia. 10: 388, 1974.

TOMITA, T. and SCARPELLI, D.G.

Interaction of cyclic AMP and alloxan on insulin secre-  
tion in isolated rat islets perfused in vitro.

Endocrinology. 100: 1327, 1977.

TURTLE, J.R. and KIPNIS, D.M.

An adrenergic receptor mechanism for the control of  
cyclic 3-5-adenosine monophosphate synthesis in tissues.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 28: 797, 1967.

UNGER, R.H., EISENTRAUT, A.M., Mc CALL, M.S. and MADISON,  
L.L.

Measurements of endogenous glucagon in plasma and the  
influence of blood glucose concentration upon its  
secretion.

J.Clin.Invest. 41: 682, 1962.

UNGER, R.H., KETTERER, H., DUPRE, J. and EISENTRAUT, A.M.

The effects of secretion, pancreozymin and gastrin upon  
insulin and glucagon secretion in anesthetized dogs.

J.Clin.Invest. 46: 630, 1967.

UNGER, R.H. and EISENTRAUT, A.M.

Enteroinsular axis.

Arch.Intern.Med. 123: 261, 1969.

UNGER, R.H., OHNEDA, A., AGUILAR-PARADA, E. and  
EISENTRAUT, A.M.

The role of aminogenic glucagon secretion in blood  
glucose homeostasis.

J.Clin.Invest. 48: 810, 1969

UNGER, R.H., AGUILAR-PARADA, E., MULLER, W.A. and  
EISENTRAUT, A.M.

Studies of pancreatic alpha cell function in normal and  
diabetes subjects.

J.Clin.Invest. 49: 837, 1970.

UNGER, R.H.

Glucagon Physiology and Pathophysiology abnormal alpha  
cell function as a characteristic of human diabetes  
mellitus.

New Engl. J.Med. 285: 443, 1971.

UNGER, R.H.

Diabetes and the alpha cell.

Diabetes. 25: 136, 1976.

UNGER, R.H. and ORCI, L.

Physiology and Pathophysiology of glucagon.

Physiol. Rev. 56: 778, 1976.

WISE, J.K., HENDLER, R. and FELIG, P.

Influence of glucocorticoids on glucagon secretion and  
plasma aminoacid concentrations in man.

J.Clin.Invest. 52: 2774, 1973.

WOLTERS, G.H.J., DASMA, A. and BOUMAN, P.R.

Effects of fasting on insulin secretion and the cyclic AMP and calcium content of rat pancreatic islets during glucose stimulation.

Diabetologia. 12: 427, 1976.

WOLTERS, G.H., KONIJNENDIJK, W. and BOUMAN, P.R.

Effects of fasting on insulin secretion, islet glucose metabolism and the cyclic adenosine 3'-5' monophosphate content of rat pancreatic islets in vitro.

Diabetes. 26: 530, 1977.

WOLLHEIM, C.B., BLONDEL, B., RABINOVITCH, A. and RENOLD, A.E.

Insulin and glucagon release pancreatic monolayer cultures affets of cyclic nucleotides.

8th Congress of the in Diabetes fed, Brussels.

Exp.Med. Found.Int.Congr.Ser. 280: 48, 1973.

WOLLHEIM, C.B., BLONDEL, B., MULLER, W.A. and SHARP, G.W.G.

Relation of  $Ca^{++}$  to cyclic AMP induced alterations of glucagon release in pancreatic monolayer cultures.

Eur.J.Clin.Invest. 5: 58, 1975.

ZAWALICH, W.S., KARL, R.C., FERRENDELLI, J.A. and MATSCHINSKY, F.M.

Factors governing induced elevation of cyclic 3'-5' AMP levels in pancreatic islets.

Diabetologia. 11: 231, 1975.



# FACULTAD DE FARMACIA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. Santiago ORTIZ BLAZQUEZ titulada "REGULACION DE LA SECRECION DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS DURANTE EL AYUNO"

acordó otorgarle la calificación de \_\_\_\_\_

Sevilla, 27 de Junio de 1.980

El Vocal,



El Vocal,



El Vocal,



El Presidente,



El Secretario,

Los diez mil

El Doctorado,

