

R. 6487

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

"MODIFICACIONES DE LOS RECEPTORES HEPATICOS
DE INSULINA DURANTE EL AYUNO".

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
BIBLIOTECA

Tesis para aspirar al grado
de Doctor en Farmacia.
Sevilla Abril de 1980.

MODIFICACIONES DE LOS RECEPTORES HEPATICOS DE INSULINA
DURANTE EL AYUNO.

por

MARIA TERESA HERRERA DEL REY

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

P. Romero Raya

Prof. Agregado de Microbio-
logía de la Facultad de
Farmacia de la Universidad
de Sevilla.

El co-director
J.C. Prieto Villapún

J.C. Prieto

Prof. Adjunto de Bioquímica



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

Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia



AVDA. SANCHEZ PIZJUAN, 4
TELEFOS. 87 70 50 - 87 78 70

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
FACULTAD DE MEDICINA
SEVILLA-9
PROF. RAIMUNDO GOBERNA



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

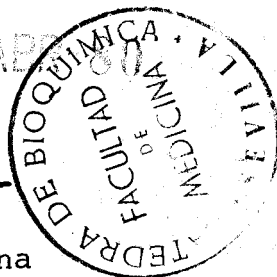
CERTIFICA: Que el trabajo titulado: "Modificaciones de los receptores hepáticos de insulina durante el ayuno", realizado por la licenciada M^a Teresa Herrera del Rey para optar al grado de Doctor, ha sido llevado a cabo bajo mi dirección y la co-dirección del Dr. Juan Carlos Prieto Villapún.

Sevilla,

14-ABR-60

R. Goberna

Prof. Dr. R. Goberna



A mis padres

A Manolo

A mis hijos

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. R.Goberna y al Prof.J.C.Prieto que por su inestimable ayuda y colaboración han hecho posible la realización del presente trabajo.

A J.M. Guerrero por su eficaz ayuda a lo largo de toda la parte experimental.

Al resto de mis compañeros

E. Arilla

M. Lucas

S. Ortiz

C. Osuna

E. Pintado

G. Ruiz

F. Sobrino

por su ayuda en todo momento.

A los alumnos internos de la Cátedra J. Jimenez y B, Roga por su colaboración.

A M^a del Carmen que mecanografió todo el trabajo.

INDICE.

INTRODUCCION.

1. Interacción hormona-receptor	2
1.1. Análisis de las interacciones hormona-receptor..	7
1.2. Propiedades fisico-químicas de los receptores hormonales	10
2. Receptor de insulina	16
2.1. Localización	16
2.2. Naturaleza química	23
2.3. Componentes del sistema insulina-receptor.....	25
2.3.1. Insulina marcada: monoiodoinsulina.....	27
2.3.2. Preparación de receptores	28
2.4. Propiedades de la unión insulina-receptor.....	34
3. Mecanismo de acción de la insulina.....	38
3.1. Correlación de la unión insulina-receptor con los efectos biológicos de la hormona	42
3.2. Degradación de la insulina.....	43
4. Alteraciones de los receptores de insulina.....	47
4.1. Obesidad	48
4.2. Diabetes	51
4.3. Acidosis	52
4.4. Edad	52
4.5. Composición de la dieta	53
4.6. Ayuno.....	54
OBJETIVOS	59
MATERIAL Y METODOS	61
1. Animales y diseño experimental	61
1.1. Animales	61
1.2. Diseño experimental	61

2. Aislamiento de membranas hepáticas.....	64
3. Criterio de purificación	69
4. Marcaje de insulina ¹²⁵ I: monoiodoinsulina.....	73
5. Radioinmunoanálisis de insulina para sueros.....	81
6. Unión de la insulina a sus receptores específicos de membranas hepáticas	83
6.1. Generalidades	83
6.2. Tiempo de equilibrio: asociación	85
6.3. Degradación de la insulina	88
6.4. Degradación de los receptores.....	90
6.5. Dosis-efecto	91
7. Aislamiento de hepatocitos	93
8. Determinación de DNA en hepatocitos aislados	95
9. Dosis-efecto: hepatocitos aislados	99
10. Tratamiento de los resultados	100'
 RESULTADOS	 102
1. Características de los animales: peso, glucemia e insulinemia	102
2. Características de las membranas: 5' mononucleo- tidasa	106
3. Estandarización del método de unión insulina- receptor	108
3.1. Cinética de asociación: efecto de la tempera- tura	108
3.2. Degradación de la insulina	111
3.3. Efecto del pH y de la composición del medio de incubación	116
3.4. Efecto de la concentración de membranas	122
3.5. Cinética de disociación: cooperatividad negativa	124

3.6. Estequiometría de la unión insulina-receptor: efecto de la concentración de insulina fría....	126
3.7. Equivalencia entre insulina fría e insulina marcada	128
3.8. Estudio de especificidad	130
4. Unión insulina a membranas hepáticas tras periodos variables de ayuno (0,1,2,4 y 6 días).....	131
4.1. Cinética de asociación	131
4.2. Degradación de la insulina- ¹²⁵ I.....	135
4.3. Degradación de los receptores	136
4.4. Cinética de disociación.....	137
4.5. Estequiometría de la unión insulina-receptor... 141	
4.5.1. Representación de Scatchard.....	152
4.5.2. Representación de Hill: grado de coope- ratividad negativa. Representación de De Meyts.....	158
5. Unión de insulina-membranas hepáticas tras rea- limentación	165
6. Unión insulina-hepatocitos intactos tras periodos variables de ayuno (0,2,4 y 6 días).....	181
DISCUSION	193
CONCLUSIONES	214
BIBLIOGRAFIA	218

ABREVIATURAS

- ACTH: hormona adrenocorticotropa.
- A.e.: actividad específica.
- AMPc: 3' 5' adenosin monofosfato.
- 5' AMP: 5' adenosin monofosfato.
- B%: porcentaje de unión específica.
- BSA: albúmina sérica bovina.
- c.p.m.: cuentas por minuto .
- DABA: ácido 3-5 diaminobenzoico.
- DEAE-celulosa: dietilaminoetil celulosa.
- EDTA: etilendiaminotetraacetato sódico.
- ESM: error standard de la media.
- GMP: guanosin monofosfato.
- H: hormona.
- HCG: gonadotropina coriónica humana.
- HCS: somatomotropina coriónica humana.
- HSA: albúmina sérica humana.
- Ins: insulina.
- KRP: Krebs Ringer fosfato.
- LH: hormona luteinizante.
- R: receptor.
- R₀: ratas controles.
- R₁: ratas sometidas a 1 día de ayuno.
- R₂: ratas sometidas a 2 días de ayuno.
- R₄: ratas sometidas a 4 días de ayuno.

R_6 : ratas sometidas a 6 días de ayuno.

$R_4 + 2$: ratas realimentadas 2 días con dieta standard tras 4 días de ayuno.

$R_6 + 2$: ratas realimentadas 2 días con dieta standard tras 6 días de ayuno.

$R_{6+2} G$: ratas realimentadas 2 días con glucosa tras 4 días de ayuno.

TCA: ácido tricloroacético.

Tris: trihidroximetil-aminometano.

TSH: hormona tirotrópica.

Tyr: tirosina.

1º INTRODUCCION

5° La unión de la hormona con su receptor se relaciona directa o indirectamente con sus efectos biológicos.

Según Freychet (1976), el término receptor se debe usar para designar solamente aquellos componentes de la membrana que reconocen relativamente a una hormona y se unen con ella de forma específica. Todo lo que ocurre después de la unión y que conduce a la respuesta biológica no se considera parte del receptor, sino más bien como sistema efector o segundo mensajero. Anteriormente el término receptor englobaba también al efector (fig. 1).

Esta definición funcional del receptor, en particular en los referente al reconocimiento hormonal, está en consonancia con los siguientes hechos:

1. La propiedad más importante del receptor es su especificidad por una hormona determinada (Roth, 1973).
2. Es difícil establecer una relación directa entre la unión y los efectos biológicos de la hormona.

Esta dificultad se basa en varios hechos:

- a) Los modelos que se utilizan a veces no son los apropiados.
 - b) Es posible que las condiciones que sean óptimas para la unión no lo sean para sus efectos biológicos (Roth y col, 1975).
3. Los receptores hormonales pueden estar presentes, a

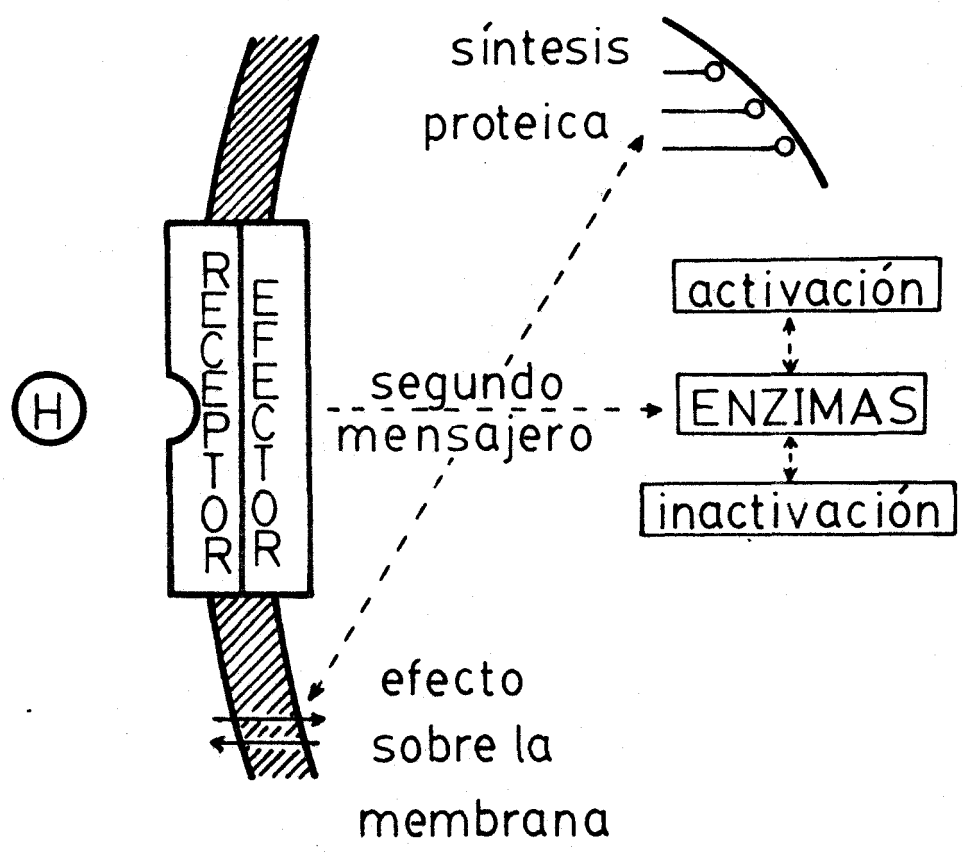


Fig.1 Mecanismo general de acción de las hormonas peptídicas.

veces, en estados conformacionales que no responden a la hormona respectiva.

Según Larner (1977) el receptor tiene una doble función al aceptar en primer lugar el mensaje de la hormona y transmitirlo inmediatamente a la maquinaria celular, capaz de promover las acciones biológicas correspondientes. Ambas funciones, aceptor y transmisor, se podrían englobar en una: transmitir. Este es verdaderamente el término más apropiado para describir dicha unión. A este término se le denomina habitualmente segundo mensajero (Catt, 1977 y Freychet, 1976) y en muchas hormonas peptídicas ha sido comprobado que la transmisión consistiría en la activación del sistema enzimático adenilato ciclasa con la consiguiente elevación de los niveles de AMPc. En cambio, en otras hormonas peptídicas tales como insulina y hormona de crecimiento, el segundo mensajero no se conoce, es decir, el mecanismo de activación de la célula diana no está bien clarificado, a pesar de poseer estas hormonas receptores específicos perfectamente caracterizados en la membrana plasmática. Esta cuestión es complicada por la dualidad de muchos péptidos (efectores del crecimiento y diferenciación celular) y también como reguladores de respuestas tales como esteroidogénesis y secreción hormonal

Según Catt (1977) la relación entre estos dos aspectos

de la acción de las hormonas peptídicas no está bien comprendida y la mayor parte de los conocimientos en la interacción hormona-receptor están basados en estudios de acción de hormonas peptídicas sobre sus células diana. Los primeros trabajos realizados para estudiar las propiedades de los receptores de las hormonas peptídicas se hicieron con ACTH por Lefkowitz y col (1970) y con angiotensina II por Lin y Goodfriend (1970) en receptores de tejido adrenal. Desde entonces se han realizado numerosos estudios con hormonas peptídicas, habiéndose comprobado que la unión a sus receptores de membrana en la célula diana se da con una especificidad y afinidad remarcables. Estos estudios se han hecho en homogenados de tejido, células enteras, preparaciones de membranas plasmáticas y fracciones solubilizadas de células (Roth, 1973 y Kahn, 1975) con hormonas tales como insulina, glucagón, HGH, ganodotropinas, hormonas gastrointestinales, etc. (Cuatrecasas, 1969, 1971a y 1972 a; Catt y col, 1972; Freychet, 1972 a, 1973, 1976; Dufau y col, 1973, 1974; Catt y Dufau, 1976; Jacobs y Cuatrecasas, 1976, etc.

1.1. Análisis de las interacciones hormona-receptor.

El uso de hormonas radiomarcadas en el estudio de la unión hormona-receptor "in vitro" fué en principio complicado por la dudosa conservación de la actividad

biológica y de la conformación estructural de la hormona radiactiva. Sin embargo, los estudios "in vivo" con hormonas radioiodadas han demostrado claramente la selectividad y especificidad del trazador para el reconocimiento de la célula diana. Tal especificidad ha sido observada, por ejemplo, por Dekretser y col (1969) con hormona luteinizante-¹²⁵I estudiando su unión a células de Leydig.

El comenzar a usar hormonas peptídicas marcadas con alta actividad específica y con retención de la actividad biológica ha permitido "in vitro" una demostración de los sitios de unión hormona-receptor (Roth y col.(1973).

Se han realizado experiencias de unión de hormonas marcadas a los sitios específicos de la membrana plasmática en gran número de tejidos diana, así como con numerosas hormonas peptídicas y otros ligandos a receptores específicos radioiodados o tritiados. La mayoría de tales estudios fueron realizados en homogenados celulares y en fracciones parcialmente purificadas de membranas. Sin embargo, el uso creciente de cultivos de células y de enzimas dispersantes de tejidos diana ha conducido a la utilización de células intactas para el estudio de las interacciones hormona-receptor con múltiples ventajas.

Preparando apropiadamente células diana intactas los receptores muestran la misma alta especificidad y afini-

dad por hormonas peptídicas (Kono y Barham, 1971; Gavin y col. 1973; Lesniak y col. 1974) y catecolaminas que en preparaciones subcelulares. El uso de células enteras, tiene la ventaja de poder correlacionar la unión de la hormona al receptor y la respuesta biológica concomitante de la cual dependen las actividades metabólicas de las células y además pueden ser estudiadas bajo condiciones de medio y temperatura más parecidas a las fisiológicas.

Por último, el uso de células intactas viables, facilita el estudio de las acciones reguladoras de las concentraciones de hormona circulante sobre el número y/o afinidad de sus receptores específicos de membrana. Este fenómeno ha sido recientemente observado por Khan (1975) y ocurre tanto "in vitro" como "in vivo".

El uso de células en cultivo, tiene ventajas sobre las dispersiones de células ya que éstas últimas son heterogéneas y requieren purificaciones adicionales mediante gradientes de densidad que no favorecen en nada la conservación de la integridad estructural y funcional de las células.

Los cultivos celulares facilitan las preparaciones de suspensiones de células diana y ofrecen mayor homogeneidad. Sin embargo, el propio artefacto del cultivo puede alterar a veces los receptores de membrana.

La mayoría de los receptores de hormonas peptídicas, estudiados en células o fracciones subcelulares, muestran unas propiedades relativas de saturación, teniendo uno o más tipos de sitios de unión con alta afinidad por el ligando hormonal.

Varias hormonas peptídicas: hormona lutenizante (Catt y col, 1972), hormona de crecimiento (Lesniak y col, 1973), prolactina (Shiy y col, 1974) interaccionan con un solo sitio de unión cada una de ellas. Sin embargo, otras hormonas tales como ACTH (Lefkowitz y col, 1970) insulina (De Meyts y col, 1973), angiotensina II (Glosman y col, 1974) o catecolaminas (Limbird y col, 1975) parecen poseer dos o más clases de sitios de unión o interacción de sitio-sitio que conducen a una cooperatividad (generalmente negativa) dependiente de las concentraciones de hormona en el medio. Este mecanismo ha sido muy estudiado por De Meyts y col (1973) con la insulina, como se comentará ampliamente más adelante.

1.2. Propiedades físico-químicas de los receptores hormonales.

La naturaleza proteica de los receptores de membrana plasmática para hormonas peptídicas, ha sido claramente demostrada mediante el uso de diversos enzimas proteolíticas.

Además, los receptores se alteran por exposición a fos-

folipasas, sugiriendo con ello que contienen un componente fosfolipídico significativo o que la unión hormona-receptor está influenciada por las estructuras fosfolipídicas de la membrana (Cuatrecasas, 1972 a; Dufau y col, 1974).

Se ha comprobado que los receptores de insulina, LH y TSH, contienen carbohidratos. El grupo de Dufau y Catt (1974) ha demostrado que la actividad de los receptores de LH depende de los grupos disulfuro que mantienen la conformación biológicamente activa.

El papel de los gangliósidos en algunas interacciones ligando-receptor ha sido estudiado por Holmgren y col (1972) en la toxina colérica. Se ha comprobado que en muchas células eucarióticas la toxina colérica se une a un monosialogangliósido (GM1) específico de la membrana plasmática y activa a continuación la adenilato ciclasa.

Este y otros datos han llevado a la conclusión de que el gangliósido GM1 es el receptor superficial de membrana para el colerágeno. La similitud entre la interacción colerágeno-gangliósido y muchas interacciones hormona-receptor es obvia (Catt y Dufau, 1977) y sugiere que el análisis del mecanismo de la interacción de la toxina con el receptor ayudaría a comprender los procesos que desencadena la formación del complejo hormona-receptor y las causas de activación de la ade-

nilato ciclasa en las membranas plasmáticas de la célula diana.

El receptor celular del tiroides para la tirotropina es también un gangliósido (Mullin y col, 1976). La tirotropina es una hormona que tiene una parte de su secuencia homóloga con la toxina colérica.

La caracterización físico-química de los receptores peptídicos hormonales ha sido complicada por su naturaleza relativamente insoluble, una característica que comparte con muchas proteínas de membrana. Esto ha conducido a usar varios detergentes para la extracción de los receptores de las fracciones de membrana previo análisis de las preparaciones solubilizadas por filtración en gel y centrifugación en gradiente de densidad.

En algunos tejidos se ha conseguido solubilizar los receptores por digestión enzimática limitada. (Tate y col, 1975; Guffin y col, 1976. lo realizan incubando las células bajo condiciones que favorecen la protección de receptores superficiales. Sin embargo, la forma más usual de solubilizar los receptores consiste en la extracción de fracciones de membrana con detergentes no iónicos tales como Triton y Lubrol (Cuatrecasas, 1972). La disolución de membranas plasmáticas por detergentes provoca un menor acoplamiento funcional entre los sitios de unión de la hormona y el receptor y actividades en-

zimáticas asociadas a membranas tales como adenilato ciclasa. Sin embargo, en estudios hechos con receptores de vasopresina (Neer, 1973) tratados con detergente, se ha encontrado una parcial restauración de la capacidad de la estimulación de la hormona sobre la adenilciclasa.

Se han extraído receptores específicos de membrana celulares de acetil colina (De Robertis, 1971; ElDefrewi y col, 1975), insulina (Cuatrecasas, 1972 a, 1973, etc.; Jacobs y col, 1976), glucagón (Giorgio y col, 1974; Levey y col, 1975), LH-hCG (Dufau y col, 1973), FSH (Catt y Dufau , 1977 b), prolactina (Shiu y col, 1974) y hormona de crecimiento (Mc Intosh y col, 1976).

Las propiedades de los receptores solubles son bastantes arbitrarias (Catt y Dufau , 1977):

- No deben sedimentar a 360.000 g durante 3 h.
- Deben ser retenidos durante la filtración en gel con 6% de agarosa.
- La mayor parte de los receptores solubilizados por detergentes retienen una gran afinidad y especificidad de unión con la hormona tanto en presencia de detergentes como después de retirar el detergente por diálisis.
- En algunos receptores la eliminación de los detergentes causa desnaturalización con pérdida irreversible

de las propiedades de unión.

- Dufau (1973) ha estudiado los receptores de LH en ovario y ha comprobado que tienen idénticas características físicas los complejos de receptores solubilizados que los complejos hormona-receptor anteriores a la solubilización.
- Algunos receptores libres y complejos hormona-receptor han sido analizados por filtración con gel y centrifugación, asignándoseles pesos moleculares del orden de $1'5$ a $4'0 \times 10^5$ daltons.

Una excepción a estos hechos, ha sido el receptor de TSH, de peso molecular alrededor de 25.000, que fué recientemente estudiado por Tate y col (1975) en membranas tiroideas por tratamiento con tripsina. El receptor para TSH parece presentar cooperatividad negativa.

- La mayor parte de los receptores solubilizados con detergentes tienen un comportamiento de proteínas asimétricas, con un radio relativamente grande (60 a 70 \AA) con respecto a su constante de sedimentación de $6'5$ a $9'05 \text{ S}$ (Lin y Goodfriend, 1970; Dufau y col, 1973; Cuatrecasas, 1974). Este comportamiento sería en su mayor parte, según Koreman y col (1969), una consecuencia de la naturaleza glicoproteica y de la marcada asime-

tría de la molécula del receptor, pero puede ser atribuible también a la interferencia del detergente. Las interacciones del detergente, han sido ampliamente estudiadas en el caso del receptor de acetil-colina (Meunier y col, 1972).

La purificación de receptores solubilizados con detergentes se ha realizado por procedimientos de fraccionamiento convencionales mediante cromatografía de afinidad, como ha sido el caso de los receptores de LH-hCG por Dufau y col (1974), prolactina por Shiu y Friesen (1974) e insulina, estudiada ampliamente por Cuatrecasas, como se verá posteriormente.

2. RECEPTOR DE INSULINA

2.1. Localización.

Desde 1922 en que Banting y Best aislaron la insulina se han realizado muchas investigaciones sobre su mecanismo de acción aunque todavía no se ha logrado una solución satisfactoria al problema.

Jacobs y Cuatrecasas (1976) definen los receptores de insulina como moléculas que reconocen la presencia de insulina y transmiten la información.

Para estudiar la acción de la insulina hay que tener en cuenta 3 etapas (Czech, 1977):

- 1) Los lugares de reconocimiento o receptores celulares.
- 2) La señal o señales que se generan por la interacción insulina-receptor que mediatizan los efectos de la hormona.
- 3) La naturaleza de la modificación química del enzima o sistema de transporte que se efectúa en último término.

Kahn (1979) desglosa la acción de la insulina en una etapa más:

- 1) Unión de la hormona a su receptor de membrana plasmática.

- 2) Transformación de esta interacción hormona-receptor en alguna forma de señal.
- 3) Generación de un mensajero intracelular o mensajeros.
- 4) Modificaciones químicas de varios enzimas y sistemas de transporte que concluyen en los efectos biológicos de la insulina.

El primer paso de la acción de la insulina, es decir, la interacción de la hormona con su receptor específico (Freychet, 1975) situado en la membrana plasmática de la célula diana es el que más ampliamente se va a tratar a continuación.

Ya en el año 1949 Levine y col., propusieron que los receptores de insulina están localizados en la membrana plasmática, ya que la hormona facilita el transporte a través de la membrana de azúcares en variedad de tejidos (Levin y col, 1949 y 1965).

Simultáneamente a los estudios realizados por Levine, Stadie y col (1949) encontraron que los hemidiafragmas de rata incubados brevemente con insulina y lavados a continuación, mostraban un efecto persistente sobre la síntesis de glucógeno. Observaciones similares fueron realizadas con glándula mamaria y tejido graso epididimal por Haugaard (1952). Este efecto de la hormona se podría deber a dos causas, bien a la persistencia de la

insulina en la membrana o dentro de la célula, o bien a la iniciación de reacciones secundarias que una vez en marcha, siguieran su curso independientemente de la presencia de la hormona.

Pastan y col (1966) demostraron que el efecto persistente de la insulina se debía a la permanencia de la hormona en la superficie celular ya que el efecto se revertía al añadir al medio antisuero específico contra la insulina.

A una conclusión similar llegó Kono (1969) al observar que los adipocitos intactos tratados con tripsina tienen una capacidad disminuida para responder a la insulina, sin que se afecte la integridad de la célula, el sistema de transporte de glucosa, o la respuesta a otras hormonas. Esto sugiere que la tripsina destruye un componente peptídico de la membrana, presumiblemente el receptor, el cual es necesario para la acción de la insulina.

Quizás la evidencia más directa de la localización superficial del receptor (Cuatrecasas, 1974) es la demostración de que la insulina se une covalentemente a polímeros insolubles tales como agarosa y que la insulina unida a agarosa retiene su actividad biológica y puede interaccionar físicamente con los adipocitos intactos y formar grandes complejos. Por lo tanto, si los efectos

biológicos que siguen a la unión insulina-receptor se seguían produciendo cuando la insulina se unía a grandes polímeros, la insulina no necesitaba penetrar en la célula para ser activa.

Algunos grupos de investigadores (Katzen, 1973 y Butcher, 1973) han demostrado que debido al tiempo de incubación la insulina se podría liberar de la macromolécula (sepharosa, agarosa) por lo que la validez de los resultados e interpretaciones realizadas por Cuatrecasas se podrían poner en entredicho (Kahn, 1975).

En cambio, otros trabajos han confirmado la teoría de Cuatrecasas sobre la localización y caracterización del receptor de insulina en la membrana plasmática. Así, Jarett y Smith (1974, 1975 y 1977) han comprobado la actividad biológica de la insulina unida covalentemente a ferritina; por microscopia electrónica se observa que el complejo ferritina-insulina se une específicamente a la membrana plasmática de adipocito. Nelson y col (1978) han observado lo mismo en membranas de placenta humana.

Investigaciones más recientes por electro-autoradiografía con insulina-¹²⁵I usando hepatocitos y linfocitos, han demostrado que el sitio de unión de la insulina a la célula se encuentra en la membrana plasmática (Gorden y col, 1978 a y b; Bergeron y col, 1977 y Carpentier 1978).

En 1978 Vigneri y col; Horvat; Bergeron y col. y Goldfine y col., sugieren que la insulina tiene receptores específicos en el interior de la célula asociados a la membrana nuclear, al aparato de Golgi y al retículo endoplasmático. La función de estos receptores es desconocida y sus propiedades de unión difieren significativamente de las del receptor de la membrana plasmática (Goldfine y col, 1977 y Posner y col, 1978). Podría ocurrir que la insulina o una parte de ella penetrara en la célula para unirse a estos receptores y posiblemente fuera responsable de los efectos de la insulina a largo plazo.

La entrada de la insulina en la célula puede complicar el mecanismo de acción de la hormona (Steiner, 1977). Datos bioquímicos y morfológicos sugieren o demuestran la entrada de la insulina después de la interacción inicial con la membrana plasmática del receptor. Estudios realizados por Gorden y col (1978 b), Ward y col. (1978), han demostrado que la unión de la insulina con los hepatocitos está relacionada con procesos en el lisosoma. Jarett (1979) ha estudiado en adipocitos que este lugar del lisosoma estaría relacionado con la degradación de la insulina pero no parece estar relacionado con que los efectos de la insulina sean duraderos en este tipo de células.

Podría pensarse por lo tanto que el receptor de membrana plasmática sea responsable de los efectos de la insulina a corto plazo (Jarett, 1979), lo que concordaría con los hechos siguientes:

Un gran número de agentes incluyendo enzimas, concanavalina A, anticuerpos antireceptor y anticuerpos intrínsecos de proteínas de membrana tienen acciones parecidas a las de la insulina (Cuatrecasas, 1974). Recientemente Seals y col (1978) han demostrado que la insulina interviene directamente en la fosforilación de las membranas. Algunos análisis demuestran que la insulina inhibe la fosforilación de dos proteínas específicas, una de origen plasmático y otra de origen mitocondrial. Estudios realizados con insulina-¹²⁵I a una alta actividad específica, que conserva la misma actividad biológica y la misma capacidad de unión a los receptores que la hormona nativa (Lefkowitz, 1970 y Lin, 1970) confirman la existencia de los receptores en la superficie celular.

Los receptores de insulina se encuentran en casi todos los tipos celulares estudiados, tanto en los clásicamente considerados como "diana" como en otros en los que se desconoce cual es la acción de la insulina sobre ellos (tabla 1).

TABLA N° 1

Localización de receptores de insulina.

- Tejido muscular Stadie y col, 1953; Garrat y col, 1966; Wohltmann y Narahara, 1966; Newerly y Berson, 1957; Lambert y col, 1972.
- Tejido adiposo Freychet y col, 1971 ; Cuatrecasas, 1971 a y b; Bennet y Cuatrecasas, 1972; Kono y col, 1971; Gemmettoft y Gliemann, 1973; Kahn y col, 1973.
- Tejido hepático Kahn y col, 1974; Freychet, 1974 a; Olefsky y col, 1975 .
- Glándula mamaria ... Oka y Topper, 1971; O'Keefe y Cuatrecasas, 1974.
- Cartílago Hintz y col, 1972.
- Linfocitos T Gavin y col, 1974; Olefsky y Reaven, 1974.
- Monocitos Schwartz y col, 1975.
- Tejido placentario.. Haour y Bertrand, 1974; Posner, 1974; Marsall y col, 1974.
- Enterocitos Forgue y col, 1979.

2.2. Naturaleza química.

Mediante tratamientos enzimáticos (Jacobs y Cuatrecasas, 1976) se ha determinado la naturaleza química del receptor de insulina. Con digestión con tripsina los adipocitos pierden la sensibilidad biológica acompañando por cambios paralelos en la afinidad del receptor por la insulina. Si la digestión con tripsina es drástica resulta una pérdida completa de la unión del receptor con la insulina y de la actividad biológica de ésta. El tratamiento con neuraminidasa no modifica seriamente la unión con la insulina ni la actividad biológica.

Tras estos estudios con enzimas, Jacobs y Cuatrecasas (1976) sugieren que en la estructura del receptor estarían presentes residuos de ácido siálico que no serían necesarios para su unión con la insulina pero sí para la transmisión de la señal, es decir, para el acoplamiento con su actividad biológica. La teoría de que el ácido siálico (Cuatrecasas, 1972 a) es un componente del receptor de insulina se confirma con el tratamiento con β -galactosidasa.

La naturaleza glicoprotéica del receptor de insulina se confirma también por sus interacciones con lectinas, aglutinación con germen de trigo o concanavalina A (Cuatrecasas, 1973).

El tratamiento de los adipocitos con fosfolipasas (Cuatrecasas, 1971 b) da lugar a una pérdida de respuesta a la insulina. Sin embargo, el tratamiento de adipocitos, membranas de adipocitos o membranas de hepatocitos con fosfolipasas A o C (pero no la D) provoca un incremento de la unión a la insulina de tres a seis veces. Esto es debido a una exposición de nuevos sitios de unión indistinguibles de los normalmente presentes en la membrana.

Los tratamientos con tripsina y a continuación con fosfolipasas, sugieren a Jacobs y Cuatrecasas (1976) que el receptor es una glucoproteína y que el receptor no contiene fosfolípidos pero que estos están íntimamente asociados con el receptor.

Los estudios posteriores de Jacobs y col (1977) en cromatografía de afinidad, filtración en gel, concavalina A, agarosa, electroforesis en gel de poliacrilamida, etc. confirman que el receptor de insulina es una glucoproteína, calculándose un peso molecular por filtración en gel de 300.000 y un volumen específico de $0.734 \text{ cm}^3/\text{g}$.

Por electroforesis en gel de poliacrilamida, previa reducción y desnaturalización del receptor, se encuentra un Pm de 135.000. Esto sugiere que el receptor esté formado por dos o más subunidades con un radio de Stokes cada una de 40 \AA . Caron y col (1978) han confirmado la

presencia de glucoconjugados en la interacción del receptor con la insulina.

Con los datos anteriores aportados por Cuatrecasas y Jacobs y otros de Kahn (1975) y Olefsky (1976 b), se llega a la conclusión de que el receptor de insulina es una glucoproteína con un peso molecular de 50.000 a 300.000. Lo que no queda claro es si el alto peso molecular sería el resultado de la unión de formas oligómeras del receptor. Así, Ginsberg y col (1976) han solubilizado el receptor de eritrocitos de pavo como un tetrámero, mientras que estudios morfológicos en adipocitos han demostrado que el receptor de insulina se encuentra en grupos de 4 a 6 subunidades (Jarret, 1977). Otro problema aún sin solución es si hay uno o varios receptores de insulina en la membrana celular.

Las características de unión (como ya se tratará más adelante) sugieren varios sitios o uno solo con cooperatividad negativa. Así, Krupp y Livingston (1978) han demostrado en adipocitos solubilizados dos clases de sitios de unión de la insulina con distinta afinidad.

2.3. Componentes del sistema insulina-receptor.

La formación del complejo insulina-receptor puede ser seguida marcando la hormona por un isótopo radiactivo.

Para ello se necesita:

1. Insulina radio-marcada. Se necesita un marcador apropiado para estudiar las propiedades del receptor. Este marcador debe respetar dos condiciones (Freychet, 1975 b):
 - a) Conservar una afinidad idéntica a la de la hormona nativa hacia los sitios de unión.
 - b) Poseer una radiactividad específica suficientemente elevada para poder ser utilizada a concentraciones tan bajas como 0'05-1 nM, que son las observadas fisiológicamente "in vivo".
2. Preparación de receptores, bien usando pequeñas piezas de tejido u órganos pequeños intactos o, mejor aún, células aisladas, estructuras subcelulares aisladas (membranas plasmáticas) o solubilizados de membranas plasmáticas. En cada caso debe comprobarse que el método que se utiliza en la preparación de la estructura biológica a estudiar no provoque alteraciones morfológicas o funcionales y comprobar que el grado de contaminación de estas estructuras tisulares, celulares o subcelulares sea lo suficientemente bajo.

2.3.1. Insulina marcada: monoiodoinsulina.

En los estudios preliminares que se realizaron sobre la unión de la insulina a diversos tejidos diana se utilizó hormona marcada con iodo radiactivo (^{125}I o ^{131}I), pero no estaba claro si realmente había alteraciones en la actividad biológica y especificidad de la insulina marcada que pudieran invalidar los resultados obtenidos y las interpretaciones obtenidas.

Los estudios realizados por De Zoeten y Havinga (1961), Garratt (1964) e Izzo y col (1964) encuentran que incrementando el grado de incorporación del iodo radiactivo a la molécula de insulina se originaría un pérdida de actividad biológica de la misma. Con el glucagón, según Bromer y col (1973), ocurre lo contrario.

Freychet (1971) preparó, aisló y caracterizó monoiodoinsulina y demostró que no se diferenciaba de la insulina nativa en su capacidad de estimular la oxidación de la glucosa por adipocitos aislados. Estudios realizados por Lambert y col (1972) que indicaban que la monoiodoinsulina pierde la actividad biológica, aunque conserva la capacidad de unión al receptor, no se han podido reproducir. Otros autores (Bihler y Morris, 1972; Hamlin y Arquilla, 1974; Sodoyez y col, 1975) han confirmado que la monoiodoinsulina conserva la actividad biológica de la molécula nativa.

Estudios realizados por Hamlin y Arquilla (1974), han confirmado la actividad biológica de la monoiodoinsulina. Los residuos de tirosina a los cuales se puede incorporar el iodo son preferentemente los de la cadena A (De Zoeten y Hanvingam 1961), Tyr A₁₄ y Tyr A₁₉ (figs. 2 y 3). Hamlin y Arquilla (1974) comprobaron que, excepto a pH extremo, la incorporación de iodo a la tirosina ocurre en la Tyr A₁₄. Este dato es muy importante ya que la Tyr A₁₄ no interviene decisivamente en el mantenimiento de la estructura de la molécula de insulina; en cambio la Tyr A₁₉ (Blundell y col, 1972) es fundamental para mantener la estructura tridimensional.

2.3.2. Preparación de receptores.

Se han utilizado diversos tipos de preparaciones para estudiar los receptores de insulina : fragmentos de tejido y pequeños órganos tales como músculo aislado intacto (Stadie y col, 1953; Newerly y Berson, 1957; Garratt y col, 1966; Wohltmann y Narahara, 1966 y Lambert y col, 1972). Así se tiene la ventaja teórica de reducir al máximo el daño celular y mantener unas condiciones más fisiológicas pero se presenta el inconveniente de una gran proporción de unión inespecífica. Además, el órgano o pieza de tejido tiene diversos tipos de células y

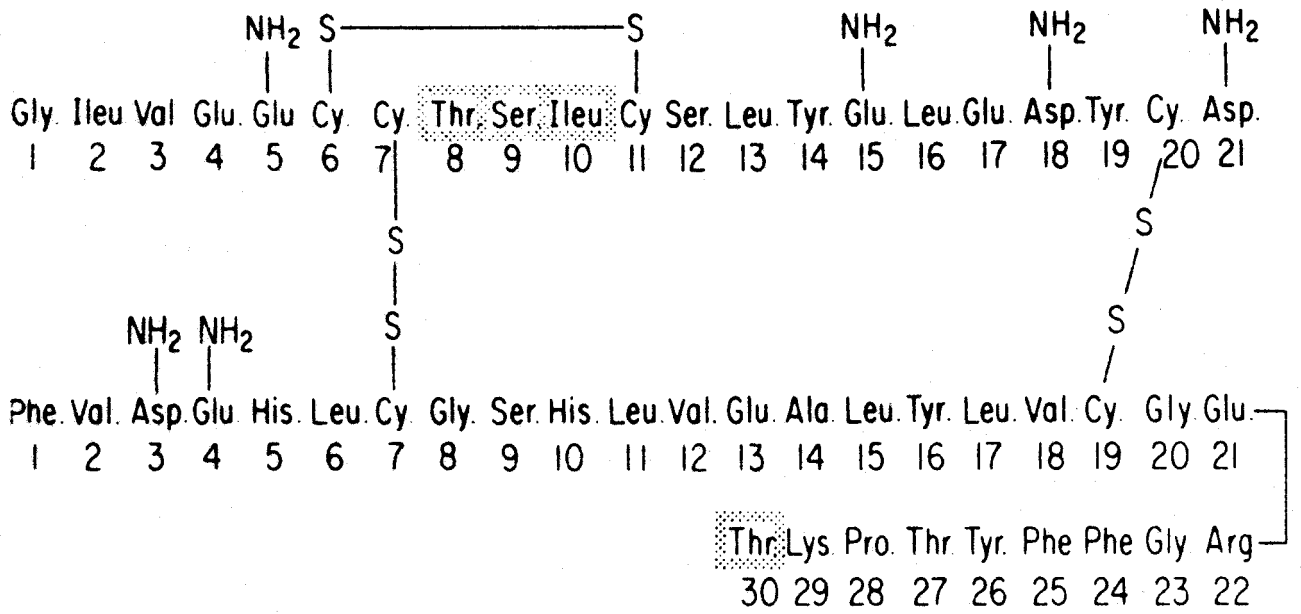


Fig. 2 Estructura primaria de la insulina humana.

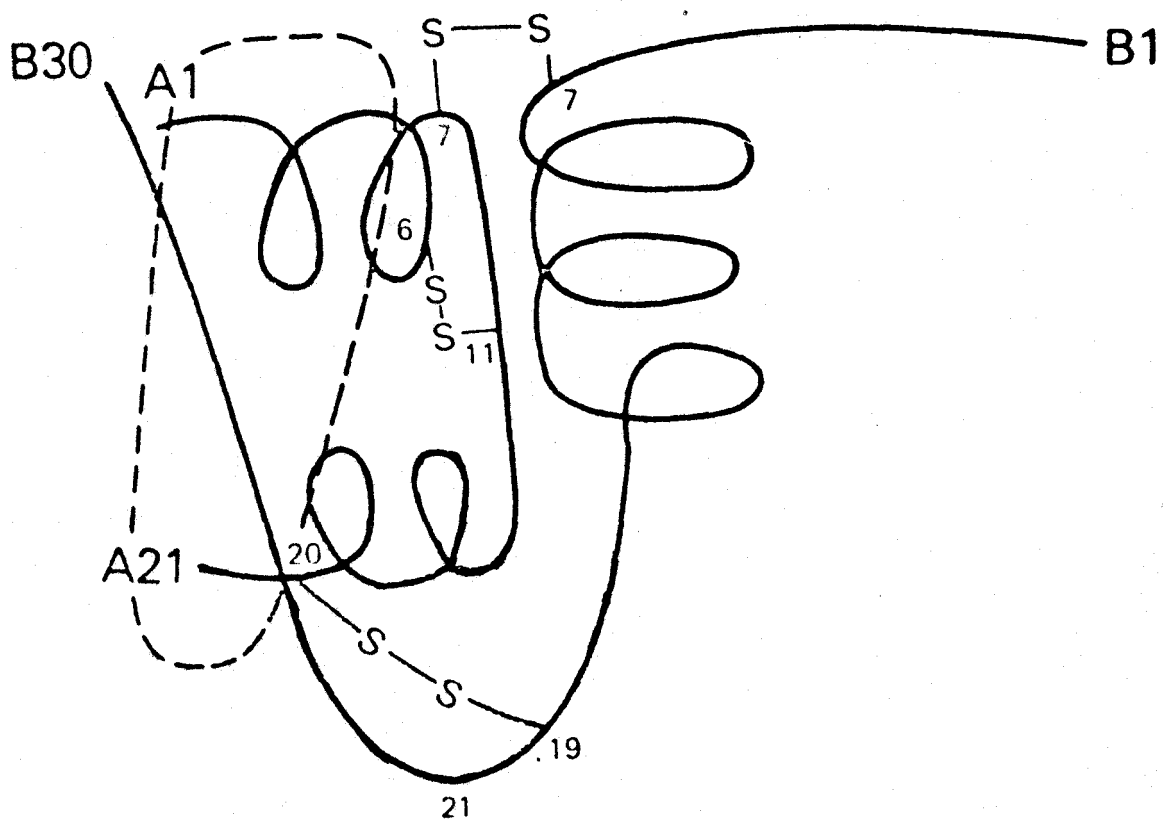


Fig.3 Representación esquemática de la estructura terciaria de la insulina (KAHN,1979).

barreras de difusión, así como un alto grado de degradación para la insulina.

Células aisladas.

Se han estudiado sobre todo adipocitos, hepatocitos, linfocitos y monocitos, es decir, células obtenidas de tejidos "diana" de la insulina (adipocitos, hepatocitos) y células que se pueden obtener fácilmente sin necesidad de aislarlas aunque no se distingan como células "diana" para la acción de la insulina (linfocitos y monocitos).

Los hepatocitos y adipocitos se obtienen habitualmente por técnicas de digestión enzimática del tejido o del órgano. Para el aislamiento de adipocitos se suele utilizar la técnica de Rodbell (1964) empleando colagenasa y para hepatocitos la de Berry y Friend (1969) con hialuronidasa y colagenasa.

Por técnicas de digestión enzimática también se han aislado células de glándula mamaria (Oka y Topper, 1971). Otros tipos de células pueden aislarse por simple agitación mecánica, como es el caso de los enterocitos del epitelio intestinal (Prieto y col. 1979), evitándose así el daño de la membrana plasmática que aparece por el tratamiento enzimático. Los monocitos y linfocitos son mucho más fáciles de aislar ya que se encuentran separados en el organismo; solo habría que determinar

que tipo de célula de la serie blanca es la que se utiliza, ya que son los monocitos los responsables de la unión a la insulina (Schwartz y col, 1975).

Las ventajas de utilizar células intactas aisladas son: la posibilidad de estudiar al mismo tiempo la unión de la insulina y el efecto biológico en la misma preparación, así como expresar la unión de insulina a su receptor por número de células. Un inconveniente es que cuando se utilizan técnicas de digestión enzimática se pueden alterar los receptores, como ya se ha citado anteriormente.

Preparaciones subcelulares.

Son utilizadas con diversos grados de purificación desde el homogenado total a las membranas plasmáticas purificadas, obtenidas de una gran variedad de órganos y tejidos como hígado (Cuatrecasas, 1972 a; Illiano y Cuatrecasas, 1972), tejido adiposo (Cuatrecasas, 1971 a), etc.

Las ventajas de utilizar membranas celulares son, entre otras:

- La unión inespecífica es muy reducida cuando en los estudios de unión insulina-receptor se utilizan membranas celulares.
- La degradación hormonal puede ser controlada y reducida al mínimo.

- Las proteínas de membrana plasmática representan en el hígado el 0'5% de las proteínas celulares totales (Neville y Kahn, 1974) y los receptores de insulina están principalmente situados a nivel de la membrana plasmática, por lo que la actividad específica de la unión de la hormona es mucho más elevada con las membranas plasmáticas que con las fracciones subcelulares menos diferenciadas (Freychet, 1971 b y Kahn, 1973).

- Pueden almacenarse durante largos periodos de tiempo a baja temperatura (-70 o -80°C) sin perder la capacidad de unirse a la hormona.

- Si se preparan grandes cantidades de membranas plasmáticas, pueden utilizarse las mismas membranas de un estudio a otro sin tener que variar de preparación, con lo que se incrementa la homogeneidad de los resultados.

- Las membranas plasmáticas se pueden usar a bajas concentraciones.

Solubilización de receptores.

Las preparaciones conteniendo el receptor aislado solubilizado (Cuatrecasas, 1972 a,b; Gavin, 1972) representan teóricamente el material de elección para la caracterización fisico-química del receptor.

Para la solubilización del receptor se ha partido de membranas aisladas y de células intactas, principalmente

hepatocitos y adipocitos (Cuatrecasas, 1972 a y b) así como linfocitos cultivados (Gavin, 1972 b). Se suelen utilizar detergentes no iónicos sobre todo Triton X-100. El Lubrol PX (Cuatrecasas, 1975) y otros detergentes no iónicos no son tan efectivos como el Triton X-100 ya que su presencia interfiere en la formación del complejo insulina-receptor.

2.4. Propiedades de la unión insulina-receptor.

La unión insulina-receptor se ha estudiado muy ampliamente entre otros por: Cuatrecasas (1971 a) en células intactas, en membranas de adipocitos (Cuatrecasas, 1971 b) en membranas hepáticas (Freychet, 1971, 1974 a, 1975, etc; Cuatrecasas, 1975 a, etc.). En estos estudios de unión insulina-receptor se ha determinado la afinidad del receptor hacia la insulina, número de sitios de unión, constantes de asociación y de disociación en condiciones de equilibrio, etc. Cuatrecasas (1974) encuentra una sola constante de afinidad en adipocitos y membranas hepáticas de $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$. Sin embargo, otros autores han encontrado dos o más órdenes de sitios de unión en membranas hepáticas, adipocitos y hepatocitos intactos, etc. (Kahn, 1975). La constante de afinidad para el sitio de alta afinidad es del orden de 10^{10} a 10^9 M^{-1} y la del sitio de baja afinidad de 10^8 a 10^6 M^{-1} . El

número de receptores varía con el tamaño de la célula pero parece ser constante al expresarlo por unidad de superficie asumiendo que la célula fuese una esfera.

De Meyts (1976) explica por qué al representar la unión insulina-receptor según el método de Scatchard (1949) se obtiene una curva en lugar de una recta. Sugiere que ésto ocurre debido a cooperatividad negativa entre los receptores.

Ginsberg y col.(1976) y Kahn y col. (1977) explican los mecanismos de cooperatividad negativa mediante el modelo de la fig.(4) ; la interacción de la insulina con alguno de los 4 sitios del tetrámero (conformación de alta afinidad representada en la figura por cuadrados), puede causar un cambio de conformación en todas las subunidades (circulos en la figura) resultando en una disminución de la afinidad de todas las subunidades para la insulina, es decir, cooperatividad negativa.

Este modelo de un tetrámero de alta afinidad, el cual, en presencia de insulina o a menor pH, cambia a un tetrámero de menor afinidad, puede explicar los datos encontrados al estudiar la unión de la insulina a su receptor.

Estudios posteriores realizados por De Meyts y col. (1978) han caracterizado la porción estructural de la

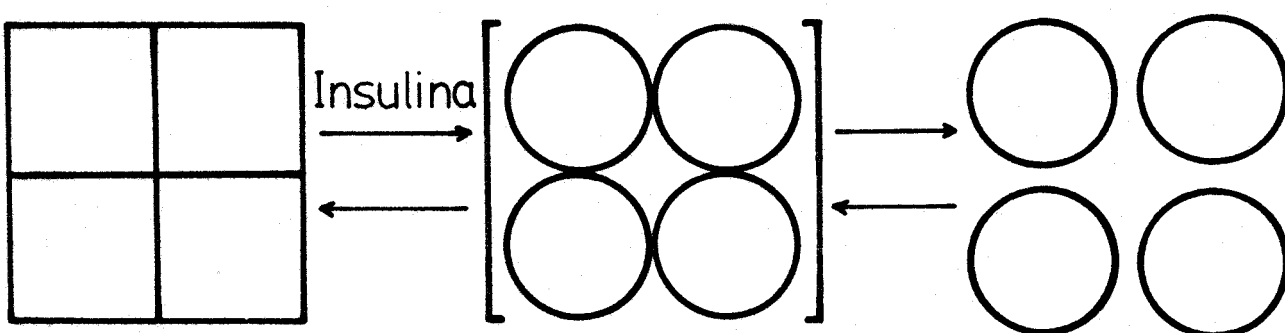


Fig.4 Mecanismo de cooperatividad negativa según el modelo de Ginsberg y col.(1976)

molécula de insulina que interviene en la cooperatividad negativa de la unión del receptor con la insulina. En ello intervendrían alguno de los 8 aminoácidos carboxilo terminal de la cadena B de la insulina y la asparragina A₂₆. De Meyts (1976) demuestra que la actividad biológica de los análogos de la insulina, no depende de la cooperatividad negativa. Sin embargo, la unión de estos análogos al receptor de insulina se correlacionaría perfectamente con su actividad biológica.

3. MECANISMO DE ACCION DE LA INSULINA.

Uno de los más interesantes e importantes aspectos del receptor de insulina es el mecanismo por el cual el complejo receptor-insulina, una vez formado, modifica funciones biológicas específicas (Jacobs y Cuatrecasas, 1976).

El proceso bioquímico principal por el cual se manifiestan las acciones de la insulina se sabe desde hace tiempo. Incluye el transporte de glucosa, aminoácidos y algunos iones a través de la membrana, incremento del almacenamiento de glucógeno, formación de triglicéridos y síntesis de proteínas, ARN y ADN (Steiner, 1966 y 1977).

Los estudios clásicos de Stadie, 1954; Levine y Goldstein, 1955; Park, 1956 y Crofford, 1975, enfocan su atención hacia el concepto de que la insulina actúa directamente sobre la membrana plasmática de las células diana, alterando su permeabilidad y los mecanismos de transporte. Muchos estudios han confirmado ampliamente estas acciones de la insulina y trabajos recientes sobre receptores de insulina en membranas plasmáticas aisladas y células intactas están en consonancia con este concepto, aunque todavía no está claro como el complejo insulina-receptor activa los procesos de transporte de membrana (Kahn, 1976 a).

Sin embargo, últimamente hay autores que sugieren que los efectos intracelulares de la insulina tales como estimulación de la síntesis de lípidos, glucógeno y proteínas, transcripción nuclear de ARN y replicación de ADN no pueden deberse simplemente a efectos de la insulina sobre el transporte de sustancias al interior de la célula (Pilkis, 1974). Así, la insulina generaría una señal que se propagaría en la célula a estos sistemas enzimáticos. Con la introducción del concepto de segundo mensajero por Sutherland y col. (1969), se ha tendido a racionalizar estos efectos internos en términos de un hipotético mensajero para la insulina, distinto del AMPc.

La mayor parte de las actividades moduladas por la insulina, tales como lipólisis, síntesis de glucógeno, metabolismo proteico, etc. son contrarios a las del AMPc. Así, la estimulación por la insulina del transporte de glucosa es inhibida por AMPc (Chang y Cuatrecasas, 1974; Chang y col. 1974).

Ray y col. (1970), Hepp (1971) e Illiano y Cuatrecasas (1972), han observado que a concentraciones fisiológicas de insulina la primera acción del complejo insulina-receptor puede ser disminuir la actividad de la adenilato ciclasa, con la consiguiente disminución intracelular de los niveles de AMPc (Jacobs y Cuatrecasas, 1976).

Estas observaciones tienen dificultades para conjugarse aunque puedan plantearse hipótesis unitarias:

- La insulina induce la síntesis de algunas proteínas que son también inducidas por AMPc y por las hormonas que elevan la producción de AMPc (Wicks, 1969).

La insulina (a concentraciones suprafisiológicas) tiene efectos en células que carecen de adenilato ciclasa (Gelether y Tomkins, 1970).

- Los efectos del AMPc exógeno son inhibidos por la insulina (Glinsman y Martimore, 1968).

- La insulina eleva los niveles intracelulares de GMP cíclico (Illiano y col. 1973) y estimula específicamente la unión de la membrana con fosfodiesterasa (Thompson y col. 1973). Ninguno de estos efectos se debe a los bajos niveles de AMPc.

Es posible que el receptor de insulina module en primer lugar la formación de algún factor desconocido que luego disminuya el AMPc pudiendo alterar simultáneamente la actividad de otras enzimas. Una hipótesis alternativa (Cuatrecasas, 1974; Bennett y col. 1975) es que el receptor de insulina cuando no forme complejo con la hormona no esté íntimamente asociado con otras macromoléculas de membrana, mientras que cuando se une a insulina desarrolle afinidad por otras estructuras de la

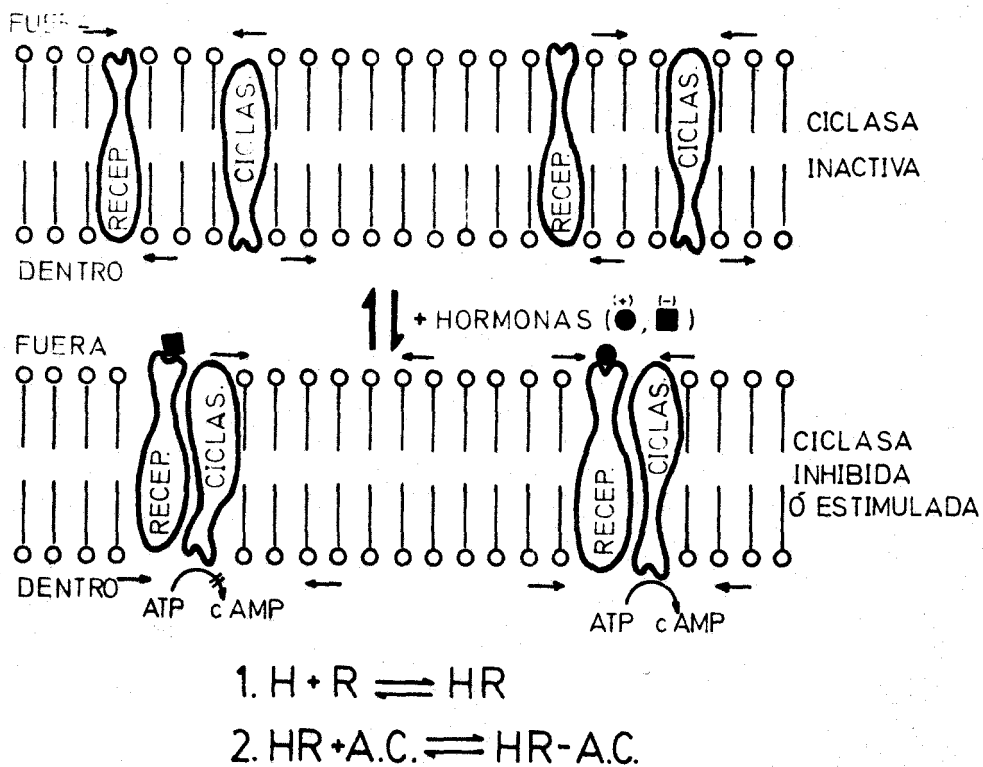


Fig.5 Modelo del mosaico fluido de la membrana.

membrana tales como adenilato ciclasa, sistema de transporte de glucosa, fosfodiesterasa o guanilato ciclasa. Esta hipótesis requiere que el receptor de insulina esté libre en la membrana, en consonancia con el modelo del mosaico fluido de la membrana (fig. 5).

3.1. Correlación de la unión insulina-receptor con los efectos biológicos de la hormona.

Se ha comprobado que solo una fracción de los receptores de insulina están ocupados cuando ya la actividad biológica es máxima (Jarett, 1979). Estudios realizados por Kono y Barham, 1971; Gammeltoft y Gliemann, 1973; Olefsky, 1975, 1976 a, muestran que la máxima estimulación del transporte de glucosa ocurre en adipocitos cuando solo alrededor del 10% de los receptores están ocupados. Por lo tanto, habría más respuesta biológica aunque todos ellos son potencialmente funcionales, surgiendo así el concepto de receptores de reserva.

Gliemann y col. (1975) comprueban que la insulina a concentración 0'28 nM estimulada la lipogénesis al máximo, mientras que a 1'4 nM no hay una mayor proporción de lipogénesis pero si una mayor ocupación de los receptores. Sin embargo, cuando se incubaron las células con estas dos concentraciones de insulina el máximo efecto de la

insulina permanece más tiempo en las células tratadas con altas concentraciones de insulina y no disminuye hasta que no se ha disociado suficiente cantidad de insulina de las células quedando una ocupación del receptor menor que la necesaria para tener una respuesta biológica máxima a la insulina. El concepto de receptores de reserva (Jarett, 1979) es compatible con el fenómeno de cooperatividad negativa y con el hecho de que células con un número de receptores disminuido pueden ser estimuladas al máximo por una gran concentración de insulina.

3.2. Degradación de la insulina.

El mecanismo enzimático exacto por el cual la insulina es degradada en las células no está claro, pero se han descrito varias enzimas que pueden intervenir en este proceso. Una de ellas, la GSH-insulina transhidrogenasa, es una reductasa que rompe los enlaces disulfuro de la insulina, inactivándola y liberando cadenas A y B intactas (Tomizawa, 1962; Chandler y Varandani, 1975). Las cadenas separadas, a su vez, son rápidamente degradadas por proteólisis. Por otra parte, se han encontrado proteasas en el citosol de hígado y músculo que pueden inactivar rápidamente la insulina por ruptura de enlaces peptídicos (Brush, 1971; Duckworth y col. 1972). Ambas rupturas, proteolítica y reductora, se han descrito en

preparaciones de membranas plasmáticas aisladas de hígado (Freychet y col. 1972 a; Varandani, 1973). Estos sistemas parecen estar localizados principalmente, si no enteramente, dentro de la célula y su acción, en cualquiera de los casos, requeriría la entrada o el transporte de insulina al interior de la célula.

Los estudios realizados por Terris y Steiner (1975 y 1976) sugieren que los receptores de insulina pueden ser de alguna manera un factor que ponga en contacto a la insulina con estos sistemas de degradación, aunque éste puede no estar en consonancia con el concepto del receptor como un transductor de señales a través de la membrana celular.

Una posible vía para integrar la captación y degradación de la insulina con su acción biológica se representa en la fig.(6) (Steiner, 1977). La parte superior de la figura muestra el modelo más aceptado del receptor-transductor para la acción de la insulina. La degradación se representa, como se cree usualmente, llevada a cabo por sistemas de degradación exterior y separados de forma que la insulina se une, se disocia y a continuación se degrada localmente sin penetrar en la célula; como consecuencia de la unión de la insulina al receptor se produce un segundo mensajero, designado por X, para producir los efectos biológicos de la hormona. Este modelo hipotético muestra la acción biológica de la insulina

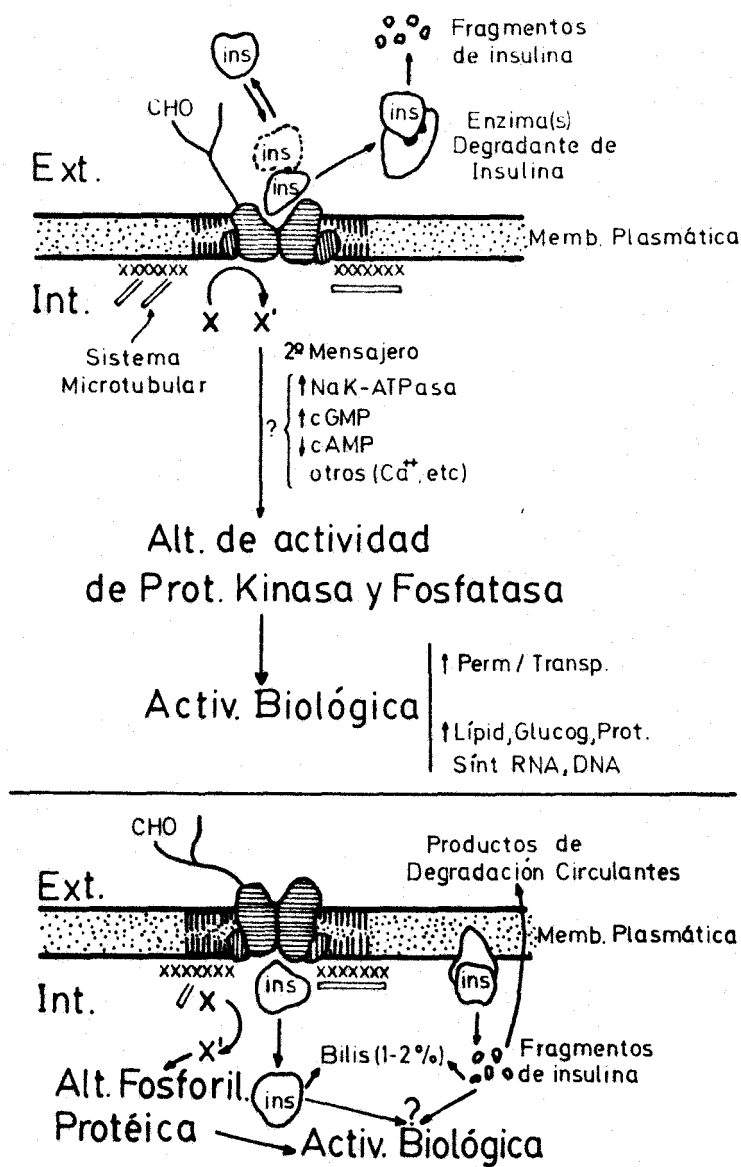


Fig.6 Posibles mecanismos de acción de la insulina según Steiner (1976).

por vía de la modulación de una proteína quinasa y actividades fosfatasa dentro de la célula y quizás en la cara interna de la membrana plasmática. Este diseño de Steiner es apoyado por trabajos de Larner y col. (1968) y Cohen y col. (1976) sobre activación de la glucógeno sintetasa o por estudios de fosforilación reversible de piruvato deshidrogenasa (Randle, 1976) metabolismo del AMPc hepático (Pilkis y Park, 1974) o cambios mediados por insulina en la fosforilación de ciertas proteínas de membrana de células grasas (Avruch y col. 1976).

La parte inferior de la fig. (6) (Steiner, 1977) muestra una hipótesis alternativa que constituye una ampliación del modelo anterior en el cual el complejo insulina-receptor permite a la insulina unida entrar en el interior de la célula donde se disocia del receptor y se expone directamente a los sistemas de degradación internos. Es probable que, una vez en el citosol, la insulina sea reducida rápidamente y degradada por los sistemas proteolíticos como ya se ha descrito anteriormente. Sin embargo, una parte de la insulina o quizás más probablemente fragmentos específicos de la hormona pueden actuar directamente sobre componentes celulares, bien actuando como segundo mensajero o bien reforzando la acción de un segundo mensajero X' generado por el receptor.

4. ALTERACIONES DE LOS RECEPTORES DE INSULINA.

Como ya se ha discutido anteriormente la interacción de la insulina con el receptor conduce a una respuesta biológica. La magnitud de la respuesta depende de la concentración de hormona, de la concentración del receptor y de la afinidad del receptor hacia la hormona. La interacción de la hormona (H) con el receptor (R) forma un complejo hormona-receptor (HR) mediante una reacción reversible bimolecular $H + R \rightleftharpoons HR$.

La constante de equilibrio K_a de esta reacción da una medida de la afinidad del receptor por la hormona. Así, el efecto biológico es proporcional a la concentración del complejo receptor-hormona en el equilibrio.

Modificando alguno de los factores K_a , H o R se puede alterar el efecto biológico. Esto es importante para estudiar las modificaciones de los receptores que pueden ser debidas a alteraciones de la afinidad o concentración del receptor o de la concentración de la insulina.

La resistencia a la insulina se caracteriza como un estado en el cual una concentración determinada de insulina no produce una respuesta biológica normal. Pueden considerarse dos grados de insulinoresistencia : 1) una respuesta normal puede ser obtenida con niveles elevados de insulina; y 2) por muy elevados que sean los niveles

de insulina no se alcanza una respuesta normal.

Puede haber diversos mecanismos que dan lugar a resistencia a la insulina. El más frecuente es debido a alteraciones en la afinidad y/o concentraciones de los receptores.

4.1. Obesidad.

La forma más común de resistencia a la insulina en el hombre y los animales es la obesidad (Jacobs y Cuatrecasas, 1976; Jarrett, 1979). Está caracterizada por hiperinsulinemia, tanto basal como tras estimulación con glucosa, un grado variable de intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina tanto exógena como endógena (Rabinowitz y Zierler, 1962). Los pacientes obesos son hiperinsulinémicos y su mayor defecto parece ser que está a nivel de la célula diana (Karom y col, 1963).

Un modelo experimental muy utilizado (Kahn y col. 1973, 1972; Soll y col. 1975) ha sido el de ratones obesos ob/ob caracterizados por hiperfagia, excesivos depósitos de grasa, hiperglucemia, hiperinsulinemia e hiperplasia de islotes pancreáticos, marcada resistencia a la insulina tanto endógena como exógena, tanto in vivo como in vitro. Cuando se incubaron membranas de hígado de ratones ob/ob y de ratones delgados (controles) en idénticas condiciones,

la unión de la insulina a las membranas de los ratones obesos fué del orden de un 25%-35% menor que la observada en animales controles. Esta disminución de la unión de insulina a sus receptores en animales obesos no ocurre solamente en hígado sino también en membranas de adipocitos (Freychet y col. 1972 b), membranas de músculo de miocardio (Freychet, 1974) y en linfocitos tímicos (Soll y col. 1974), adipocitos (Olefsky y Reaven, 1976; Olefsky y Kobayashi, 1978). etc. Las diferencias observados en los estudios de unión insulina-receptor en la obesidad parecen ser debidas solo a una disminución en el número de receptores.

En otros estudios realizados por Soll y col. (1975) en ratones obesos se estudiaron las propiedades cinéticas de asociación y disociación, la cooperatividad negativa, dependencia de la unión con la temperatura y especificidad biológica, comprobándose que esta alteración del número de receptores de insulina era específica para esta hormona, no alterándose los receptores de otras hormonas tales como glucagón y hormona de crecimiento. Similares resultados se han encontrado para otras formas genéticas de obesidad, tales como ratas db/db y ratones NZO y en casos de obesidad adquirida siguiendo la administración de tioglucosa de oro (Kahn, 1975 a; Kahn, 1976).

Ayunando ratones ob/ob se producen una marcada disminución en los niveles de insulina en plasma a la vez que aumenta el número de receptores (Kahn, 1975 a, 1976), mientras que inyectándoles previamente insulina durante el ayuno se previene el incremento del número de receptores. Estos datos sugieren que la insulina ejerce una contrarregulación sobre la concentración de receptores.

Datos similares han sido encontrados por Olefsky (1976) y Beck Nielsen y col. (1976) y Kolterman y col. (1979) en adipocitos de humanos obesos con hiperinsulinemia. Estos pacientes tienen menos receptores que los controles delgados tanto en monocitos como en adipocitos (Bar y col, 1976; Soman y col, 1978). En condiciones de ayuno tienden a corregirse tanto la hiperinsulinemia como la disminución del número de receptores, que aumenta hacia los valores controles.

4.2. Diabetes

En estudios de receptores de insulina en diabetes humana se han obtenido resultados contradictorios.

Archer y col. (1973) no encuentran alteraciones significativas en la unión de insulina a leucocitos circulantes mononucleares de diabéticos no obesos. En cambio, Olefsky y Reaven (1974) han encontrado una disminución del 50% de los receptores de insulina en igual preparación celular en adultos delgados diabéticos no cetósicos.

Kahn y col. (1976 b) han estudiado pacientes con acanthosis nigricans, un síndrome que cursa con diabetes y que se acompaña de una extraordinaria resistencia a la insulina, puesto que necesita dosis de 10.000-40.000 U insulina/día para mantener la glucemia en niveles fisiológicos. En estos enfermos, la unión de la insulina a los leucocitos circulantes mononucleares fue solo del 5-40% de lo normal, explicable por la presencia de anticuerpos anti-receptor en sangre circulante.

Bennet y Cuatrecasas (1972) han estudiado la unión de insulina a adipocitos de ratas hechas diabéticas con streptozotocina y no encuentran alteraciones, mientras que Hepp y col. (1975), por el contrario, observaron un incremento en los receptores de insulina en hamsters chinos diabéticos, concordando con el hecho de que las

concentraciones de insulina circulante regulan inversamente la concentración del receptor de insulina en la membrana plasmática.

4.3. Acidosis.

La acidosis es otro de los estados de resistencia a la insulina en el cual el receptor puede jugar algún papel (Kahn y Roth, 1976). La unión de la insulina a su receptor "in vitro" es muy sensible al pH, que es óptimo entre 7'5-8'0 en células intactas (Gavin y col. 1972 y 1973). A pH inferior, tal como se encuentra en diabetes cetoacidótica, se produce una disminución de más del 50% de la unión de la insulina al receptor que parece ser debida a una disminución de la afinidad.

4.4. Edad.

La comparación de la unión de insulina a receptores en animales de distinta edad ofrece en la literatura datos conflictivos. Freeman y col. (1973) encontraron que la unión de la insulina a membranas plasmáticas hepáticas, disminuye aproximadamente un 60% comparando ratas de 2 y 24 meses, debido a un descenso en el número de receptores, sin modificación de la afinidad. Olefsky y Reaven (1975) utilizando adipocitos de ratas de 40 a 170 días, encon-

traron una disminución de la unión de la insulina al adipocito solo en los primeros dos meses, mientras que en los otros 4 meses no hubo cambios adicionales.

Goldfine y col.(1975) han estudiado la unión de insulina y la estimulación del transporte de aminoácidos en linfocitos tímicos de ratas jóvenes. En el rango de 3 a 10 semanas fué progresivamente menor la estimulación del transporte de aminoácidos por la insulina, pero no hubo cambios en la unión insulina-receptor.

Livingston y col.(1972) han encontrado en adipocitos de rata que la oxidación de la glucosa disminuía a medida que aumentaba el peso de 160 a 400 g (correspondiendo a una edad de 6 a 12 semanas) no modificándose la unión a la insulina.

4.5. Composición de la dieta.

Sun y col.(1977) han observado que las modificaciones de la dieta producen cambios en la unión de la insulina a membranas hepáticas de rata. Para ello, estudiaron dos grupos: ratas alimentadas con dieta que no contenía carbohidratos y con una alta proporción de lípidos (L), y ratas alimentadas con dieta carente de lípidos y con una gran proporción de glucosa (G). Se encontró un aumento de la unión de la insulina a las membranas hepáticas del

grupo G con respecto al grupo L. Análogos resultados se han encontrado en hepatocitos (Tepperman y col, 1976) y en adipocitos (Tepperman y col, 1978). Igualmente, Kolterman y col. (1979) demuestran que una dieta rica en carbohidratos conduce a una disminución en la unión de la insulina con el receptor.

4.6. Ayuno.

El ayuno es una situación fisiológica que evoluciona de la siguiente forma: en las primeras horas, gracias a la glucogenolisis hepática, se mantiene constante el nivel de glucosa en sangre. La cantidad de glucógeno almacenada en el músculo es mayor que en el hígado, pero al carecer de glucosa 6 fosfatasa la energía así almacenada debe ser consumida totalmente en el interior del músculo, o bien ser liberada al espacio extracelular en forma de lactato que puede ser convertido posteriormente en glucosa en el hígado (Young y Scrimshaw, 1971).

En los primeros días de ayuno el 80% de la glucosa utilizable se consume en el cerebro por oxidación total a CO_2 y agua, mientras que el resto se metaboliza en los demás tejidos glucodependientes dando lugar a lactato y piruvato. Mediante el ciclo de Cori, estos metabolitos liberados al torrente circulatorio llegan al hígado y al riñón, y sir-

ven de sustratos para formar nueva glucosa (20% aproximadamente de la glucosa catabolizada diariamente).

El hígado juega un papel muy importante en los mecanismos adaptativos del ayuno a corto plazo. La neoglucogénesis a partir de lactato o piruvato, glicerol resultante de la lipólisis y aminoácidos glucogénicos es un proceso de eficiencia próxima al 100 %.

Las modificaciones metabólicas más significativas en el ayuno prolongado son, por una parte, la adaptación del cerebro para metabolizar los cuerpos cetónicos (Smith y col. 1969) y, por otra parte, el papel principal del riñón en esta fase del ayuno como órgano glucogenético.

Como consecuencia de las modificaciones metabólicas antes descritas, aparecen cambios en los niveles plasmáticos de multitud de parámetros (Feligy col, 1969; Cahilly col, 1966; Cahill, 1970; Ohanaka, 1976; Cizeck y col, 1977). En humanos, la glucemia disminuye bruscamente en los primeros días del ayuno, pero luego se mantiene constante durante semanas (Young y Scrimshaw, 1971). Análogos resultados se obtienen en diversos animales de experimentación (Cizeck y col, 1972).

El páncreas como órgano endocrino, juega un papel destacado en la fisiología del ayuno. La secreción de insulina disminuye significativamente durante el ayuno,

tanto "in vivo" (Lilavivathana y col.1978) como "in vitro" (Hedeskov y Capito, 1974; Goberna, 1978).

Estudios realizados por Goberna y col. (1978 a y b) y Arilla (1979) en páncreas aislado y perfundido de rata, y por Prieto y col.(1979) en islotes aislados de rata muestran que el ayuno provoca un bloqueo de la reactividad de la célula beta pancreática tanto a glucosa como a otros estímulos de la secreción de insulina y que este bloqueo desaparece por realimentación posterior al ayuno.

Por otra parte, los niveles de insulina circulante disminuyen alrededor del 50% después de 4-48 h de ayuno tanto en el hombre como en diferentes animales de experimentación.

La influencia del ayuno en la unión insulina-receptor está ampliamente estudiada en animales obesos y en humanos obesos (Freychet y col, 1974; Hep y col, 1975; Olefsky, 1975; Bar y col, 1976; Olefsky, 1977; Bar y Roth, 1977). En ratas normales, no diabéticas no obesas, estudios realizados en adipocitos por Olefsky (1976) y Olefsky y Kobayashi (1978) concluyen que un ayuno de 2 días induce un aumento de la unión de la insulina a sus receptores debido a un incremento en la afinidad por una disminución en la velocidad de disociación.

Kasuga y col.(1977), trabajando también en adipocitos de

ratas tras 2 días de ayuno, encuentran los mismos resultados que Olefsky con respecto a la unión de la insulina, pero explicable por un aumento del número de receptores y no de la afinidad.

Le Marchand-Brustel y Freychet (1979), en estudios de unión de insulina a músculo soleo de rata no encuentran modificaciones en la unión de insulina tras 1 día de ayuno, mientras tras 2 días de ayuno aumenta la unión de la insulina, aunque no indican si sería por aumento del número de receptores o de la afinidad..

Soll y col.(1975) en membranas hepáticas de ratones delgados correspondientes a hermanos heterocigóticos de ratones obesos ob/ob encuentran un incremento de un 20% en la unión de la insulina tras 1 día de ayuno, no puntualizando si se debía al número de receptores o a la afinidad.

2º OBJETIVOS.

El ayuno da lugar a una disminución de los niveles plasmáticos de glucosa e insulina. Por otra parte, los niveles circulantes de insulina parecen modular el número de receptores de esta hormona en sus células "diana", como se ha comprobado en situaciones tales como obesidad o diabetes.

Revisados los distintos trabajos de la literatura sobre unión de insulina a membranas hepáticas o hepatocitos intactos, no existen estudios realizados en animales normales sometidos a ayuno.

Los objetivos perseguidos en este trabajo son los siguientes:

1. Estudiar las modificaciones que pueden ejercer periodos cortos (1 y 2 días) o prolongados (4 y 6 días) de ayuno sobre la unión de insulina a membranas hepáticas.
2. Comprobar si dichas modificaciones se deben a un cambio en la afinidad o en el número de los receptores de insulina.
3. Observar si las modificaciones producidas por el ayuno se revierten con realimentación, tanto con dieta "standard" como con dieta selectiva (glucosa al 40% por vía oral).
4. Confirmar si las modificaciones obtenidas en la unión de insulina a membranas hepáticas durante el ayuno se reproducen en hepatocitos aislados intactos.

3o MATERIAL Y METODOS.

1. ANIMALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL

1.1. Animales

Se han utilizado ratas Wistar hembras de peso comprendido entre 150-220g y de edad aproximada 2 meses, de nuestro propio animalario. Los grupos estudiados son los siguientes:

- Ratas controles alimentadas hasta el momento de su sacrificio con una dieta standard cuya composición se detalla en la tabla (2).
- Ratas sometidas a ayuno, con 1,2,4 y 6 días respectivamente de privación de alimentos.
- Ratas realimentadas: tras 4 o 6 días de ayuno se les somete a realimentación 2 días con dieta standard o con glucosa oral al 40%. Todas ellas con agua "ad libitum".

1.2. Diseño experimental

Las experiencias realizadas las podemos considerar divididas en tres grupos:

1° Estudio de unión de la insulina ^{125}I a membranas hepáticas de ratas sometidas a 0,1,2,4 y 6 días de ayuno.

Para el estudio de la unión de insulina a las membranas se han realizado las siguientes experiencias:

- Asociación
- Disociación
- Degradación de insulina ^{125}I
- Degradación de receptores
- Dosis efecto.

Antes de la extracción del hígado se les toma sangre para la determinación de glucosa e insulina.

2° Estudio de unión de insulina ^{125}I a membranas hepáticas de ratas realimentadas 2 días con dieta standard o con glucosa oral al 40%, tras 4 o 6 días de ayuno.

Con este grupo se realizan el mismo tipo de experiencias que con el anterior.

3° Unión de insulina ^{125}I a hepatocitos de ratas sometidas a 0, 2, 4 y 6 días de ayuno.

Con los hepatocitos se realizan experiencias dosis-efecto.

TABLA N° 2

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

Composición

Cereales	60%
Subproductos industriales..	10%
Tortas vegetales	24%
Harinas animales	3%
Corrector vitamínico-mineral	3%

Características

Proteína bruta	19%
Grasa bruta	3'5%
Unidades alimenticias	102%
Proteínas digestible por U.A.	160 g.
Fibra bruta	5%
Sustancias minerales	5%

Vitaminas

Vitamina A	20.000 U.I/Kg
Vitamina D	3.000 U.I/Kg
Vitamina E	65 mg/Kg
Vitamina K	8 mg/Kg
Vitamina B ₁	6 mg/Kg
Vitamina B ₂	10 mg/Kg
Vitamina B ₆	6 mg/Kg
Vitamina B ₁₂	12 mcg/Kg
Acido pantoténico .	20 mg/Kg
Niacina	50 mg/Kg
Acido fólico	4 mg/Kg
Colina	1'500 mg/Kg

Minerales

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

2. AISLAMIENTO DE MEMBRANAS HEPATICAS

Se ha seguido el método de Neville (1968), con ligeras modificaciones.

Reactivos

Medio: CO_3HNa 1 mM.

Sacarosa 69% (w/w)

Disolver 69 g de sacarosa en 31 ml de agua bidestilada y desionizada. Calentar hasta disolución. Tras enfriar comprobar la concentración con refractómetro y ajustar a 69%.

Sacarosa 42% (w/w)

Disolver 42 g de sacarosa en 58 ml de agua bidestilada y desionizada, calentando ligeramente. Tras enfriar, ajustar con refractómetro a 42%.

Todas las etapas se realizan a 4°C, y las soluciones deberán estar conservadas a esta temperatura.

Método

1. Decapitar y sangar 7-8 ratas (hasta obtener aproximadamente 40 g de hígado. Obtener sangre suficiente (aprox. 1 ml) para poder determinar concentraciones de insulina y glucosa, como se verá más adelante.

Triturar el tejido hepático con tijeras. Pesar 40 g.

2. Homogeneizar en Potter de vidrio en una proporción aproximada de 2 g de tejido por cada 5 ml de medio, mediante 8 golpes vigorosos de émbolo.

Todo el homogeneizado se pasa a un vaso de precipitados que contiene 250 ml de medio y se agita la suspensión durante 5 min.

3. Filtrar primero a través de gasa doble y después a través de gasa cuádruple.

El filtrado se agita y se recogen 2 alícuotas de 0'3 ml para poder determinar 5' mononucleotidasa, como describiremos a continuación.

4. El filtrado se centrifuga a 1500 x g (equivalente en la centrífuga Beckman J-21 y rotor JA-20 a 6500 r.p.m.) durante 30 min a 4°C. Desechar el sobrenadante por decantación con cuidado de que no se desprenda el sedimento. Remover el sedimento con una espátula.

5. Trasvasar el sedimento con ayuda de una pipeta Pasteur a un homogeneizador Potter de idénticas características al utilizado anteriormente. Homogeneizar dando 3 golpes de émbolo.

6. El homogeneizado se lleva a un erlenmeyer que contenga sacarosa al 69%. Añadir unos 34 ml de agua. Agitar vigorosamente. Ajustar con el refractómetro hasta una concen-

tración de 44% de sacarosa (w/w) por adición de agua bidestilada y desionizada.

7. Repartir la solución anterior en 3 tubos de ultracentrífuga (para rotor SW.27, ultracentrífuga Beckman modelo L5-65). Añadir cuidadosamente con pipeta Pasteur sacarosa al 42% para formar el gradiente 44%/42%. (Equilibrar el peso de los 3 tubos ya puestos en sus soportes correspondientes).

Centrifugar a 90.000 g (equivalente en la ultracentrífuga utilizada por nosotros a 25.000 r.p.m.) durante 120 min a 4°C.

8. Recoger las membranas que flotan con una espátula de cuchara.

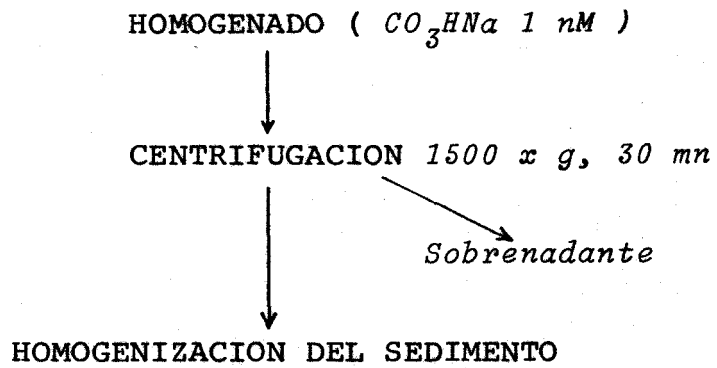
Trasvasar las membranas a un tubo de plástico que contenga 10 ml de medio previamente enfriado. Agitar fuertemente varias veces. Llenar el tubo con medio, con objeto de diluir la sacarosa de la suspensión de membranas plasmáticas.

9. Centrifugar a 3000 x g (equivalente en el centrífuga J-21 a 15.000 r.p.m.) durante 10 min a 4°C. Decantar el sobrenadante.

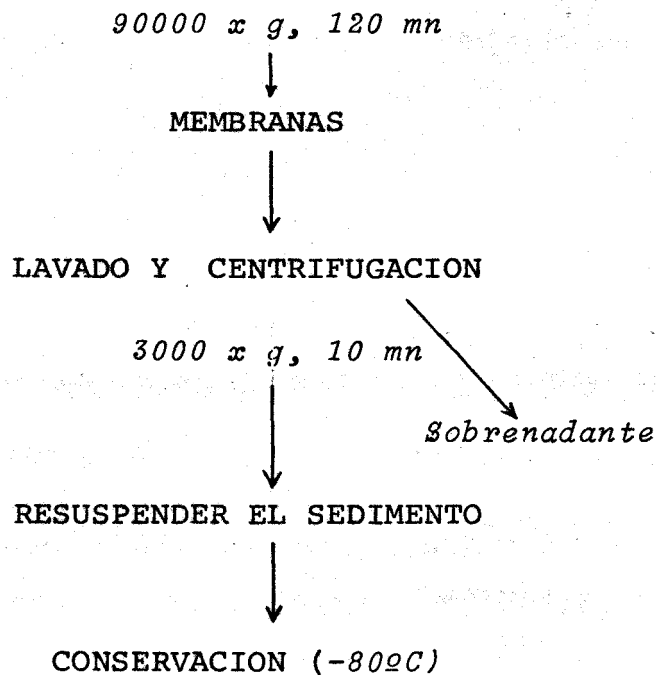
10. Resuspender el sedimento en un volumen final de 20 ml y agitar para formar una suspensión homogénea.

Distribuir en alícuotas de 0'5 ml y congelar inmediata-

mente a -80°C hasta su uso. La concentración de proteínas se determina por el método de Lowry y col. (1951) utilizando albúmina bovina (Behring werke) como standard. En el esquema adjunto aparecen las distintas fases del proceso de aislamiento.

PURIFICACION DE MEMBRANAS HEPATICAS- Neville, 1968.

CENTRIFUGACION EN GRADIENTE DE SACAROSA



3. CRITERIO DE PURIFICACION

5' mononucleotidasa. Técnica de Michell y Hewthorne (1965).

Hemos utilizado como criterio de pureza de la preparaciones de membranas plasmáticas el enriquecimiento en actividad de la 5' mononucleotidasa, enzima específico de la membrana plasmática.

La 5' mononucleotidasa cataliza el peso:



La técnica consiste en incubar 5'AMP con las membranas y, tras detener la reacción con ácido tricloroacético al 25%, determinar en el sobrenadante el P_i liberado.

Material

Reactivos:

Tampón: Tris 100 mM/HgCl₂ 7'3 mM pH 7'5.

Sustrato: 5'AMP (Merck) 1'73 mg/ml en el tampón.

Membranas: Purificadas como se describió anteriormente y diluidas en Tris 10 mM, pH 7'5, de modo que contengan 1-5 mg de proteínas/ml.

TCA: Acido tricloroacético 25%.

Reactivo I: 5'7 g de CO₃HNa y 0'2 g de Na₂SO₃ se disuelven en aproximadamente 50 ml de agua bidestilada y desionizada; se añade 0'1 g de α-naftilamina, calentando

para poder disolverlo, y cuando esté disuelto se lleva a 100 ml. Conservar en la oscuridad.

Reactivo II: 1'25 g de molibdato amónico y 7 ml de H_2SO_4 concentrado en 500 ml de agua bidestilada y desionizada.

Curva standard: disolver 57'4 mg de $Na_4HPO_4 \cdot 2H_2O$ en 100 ml de TCA al 1%.

Se obtiene así una solución patrón de 100 $\mu g/ml$ de fosforo.

Análisis: en tubos de 15 ml, poner 2 ml de sustrato (5' AMP) y 200 μl de suspensión de membranas.

Poner los tubos en hielo y añadir 800 μl de TCA al 25%. Agitar. Centrifugar 10 min en centrifuga refrigerada. Recoger 500 μl de sobrenadante.

Curva standard

TUBO	STANDARD	AGUA BIDEDESTILADA Y DESIONIZADA	μg P/TUBO
B	-	1000 μl	-
1	100 μl	900 μl	10 μg
2	200 μl	800 μl	20 μg
3	300 μl	700 μl	30 μg
4	400 μl	600 μl	40 μg
PROBLEMAS	500 μl sobrenadante	500 μl	

A todos los tubos se les añaden 5 ml de reactivo II y 1 ml de reactivo I. Incubar 10 min a 37°C en baño con agitación.

Se leen las absorbancias en espectrofotómetro a 660 nm y se representa la curva standard de P_i como se ve en la fig. (7).

Los resultados de concentración se tratan de la siguiente manera: se multiplican por su dilución (x 2 ya que se han puesto 500 μ l de sobrenadante y 500 μ l de agua y x 3 ya que el volumen final es 3 ml: 0'2 membranas + + 2 ml de 5'AMP + 0'8 TCA). A continuación se divide por 31 (para obtener μ mol P_i /tubo) y por los mg de proteína/tubo para obtener μ mol P_i /mg proteína. Multiplicando por 4 se expresa el resultado de μ mol P_i proteína/h.

El mismo tratamiento se realiza con el homogenado.

El grado de purificación relativa de las membranas plasmáticas se obtiene dividiendo la actividad de la 5'-mononucleotidasa en la preparación de membranas entre la obtenida en el homogenado inicial.

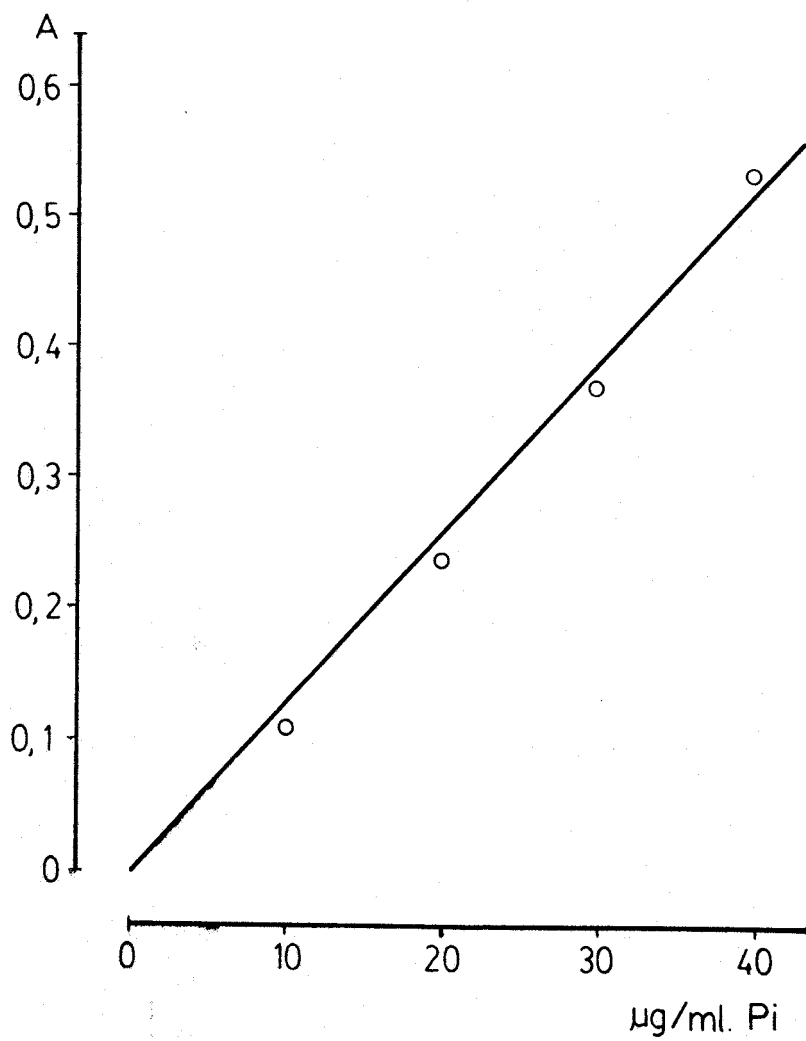


Fig.7 Curva standard de la determinación de Pi.

4. MARCAJE DE INSULINA ^{125}I : MONOIODOINSULINA

Método de Freychet y col. (1971 a) modificado por Freychet (1974 a).

Material

a) Insulina

Pesar 1 mg de insulina porcina Novo y disolverla en 1 ml de HCl 0'01 N; agitando varias veces durante al menos 30 min.

Se fracciona en alícuotas de 50 μl (1 mg/ml en tubos de plástico y se congela a -20°C para sucesivos marcajes.

b) Tampón fosfato 0'3 M pH 7'5

Se prepara disolviendo 2'04 g de $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ en 50 ml de agua bidestilada y desionizada y ajustando el pH con NaOH 1 N.

c) Cloramina T

Se disuelven 25 mg en 10 ml de tampón fosfato (hay que prepararla pocos minutos antes de su uso y mantenerla en la oscuridad). Se utiliza en el marcaje como oxidante.

d) Metabisulfito sódico

25 mg disueltos en 5 ml de tampón fosfato. El metabisulfito sódico se utiliza como reductor para detener la reacción de oxidación desencadenada por la cloramina T.

e) Albúmina sérica bovina (BSA) 2'5%

25 mg disueltos en 1 ml de tampón fosfato.

f) ^{125}I

Amersham IMS 30 a concentración 100 mCi ^{125}I /ml. Preparado en NaOH pH 7-11, libre de reductores, aproximadamente a 16'2 mCi ^{125}I / μg de I y 99'6% de pureza radioquímica.

g) Preparación de la columna de intercambio iónicoReactivos

Tris 1 N pH 9'5.

Tris 0'05 M pH 9'5.

(Utilizar agua bidestilada y desionizada).

1. Suspender 20 g de DEAE celulosa (Whatman DE-52) en 200 ml de agua bidestilada y desionizada. Agitar y ajustar el pH a 4 con HCl 4 N.
2. Dejar reposar unos minutos. Decantar. Añadir 200 ml de Tris 1 N y volver a agitar unos minutos.
3. Dejar reposar. Decantar. Añadir 200 ml de Tris 0'05 M agitar unos minutos y ajustar el pH a 9'5 (sin NaOH).
4. Dejar reposar. Decantar. Añadir 200 ml de Tris 0'05 M y comprobar si el pH está en 9'5. Dejar reposar $H + \frac{H}{2}$ minutos siendo H la altura del volumen de suspensión de la

celulosa contenida en el vaso de precipitados expresada en centímetros.

5. Decantar. Añadir la celulosa a una columna de 1 x 30cm que ha sido lavada previamente con agua bidestilada y desionizada, y después con Tris 0'05 M y que esté llena a la mitad con Tris 0'05 M.

6. Seguir añadiendo DEAE-celulosa hasta que se consiga un lecho uniforme de 20 cm. Lavar con Tris 0'05 M añadiendo después más celulosa si hubiera bajado su volumen (removiendo la superficie del lecho para que no se formen dos capas).

7. Conseguido un lecho uniforme de 20 cm lavar con Tris 0'05 M (aprox. 50 ml) y trasladar a cámara fría (4°C).

Marcaje

Realizar el marcaje a temperatura ambiente.

Con una microjeringa Hamilton de 100 μ l provista de catéter se toman por este orden:

20 μ l de tampón fosfato
5 μ l de cloramina T (12'5 μ g)
5 μ l de insulina (5 μ g)
20 μ l de ^{125}I (2 mCi).

Pasar los reactivos a un tubo de plástico con una sola embolada. Agitar 30 seg exactamente.

Con una micropipeta añadir 5 μ l de matabisulfito sódico.

Agitar. A continuación añadir 100 μ l de BSA (25 mg).

Agitar.

Tomar una alícuota de 5 μ l y pasarlo a un tubo de plástico que contiene 5 ml de buffer veronal 0'025 M pH 8'6 BSA 0'25 %.

Se usará para calcular el grado de incorporación con talco y TCA como veremos a continuación.

Aspirar el sobrenadante de la columna (que anteriormente hemos descrito como se preparaba y está equilibrada y en la cámara fría a 4°C). Añadir la solución del marcaje y dejar que penetre. Llenar con Tris 0'05 M y recoger en el colector 20 fracciones de 4 ml.

Conectar en este momento un gradiente de NaCl con dos vasos de precipitados unidos por la base (realizados expresamente) de modo que el primero contenga 315 ml de Tris 0'05 M y esté sometido a agitación y el segundo 315 ml de NaCl 0'11 M preparado en Tris (3'214 g en 500 ml de Tris 0'05 M).

Recoger 150 tubos de 4 ml en el colector.

Cuando haya pasado el volumen, contar la radiactividad de una alícuota de 25 μ l de todos los tubos durante 0'1 min y representar los resultados gráficamente (fig. 8).

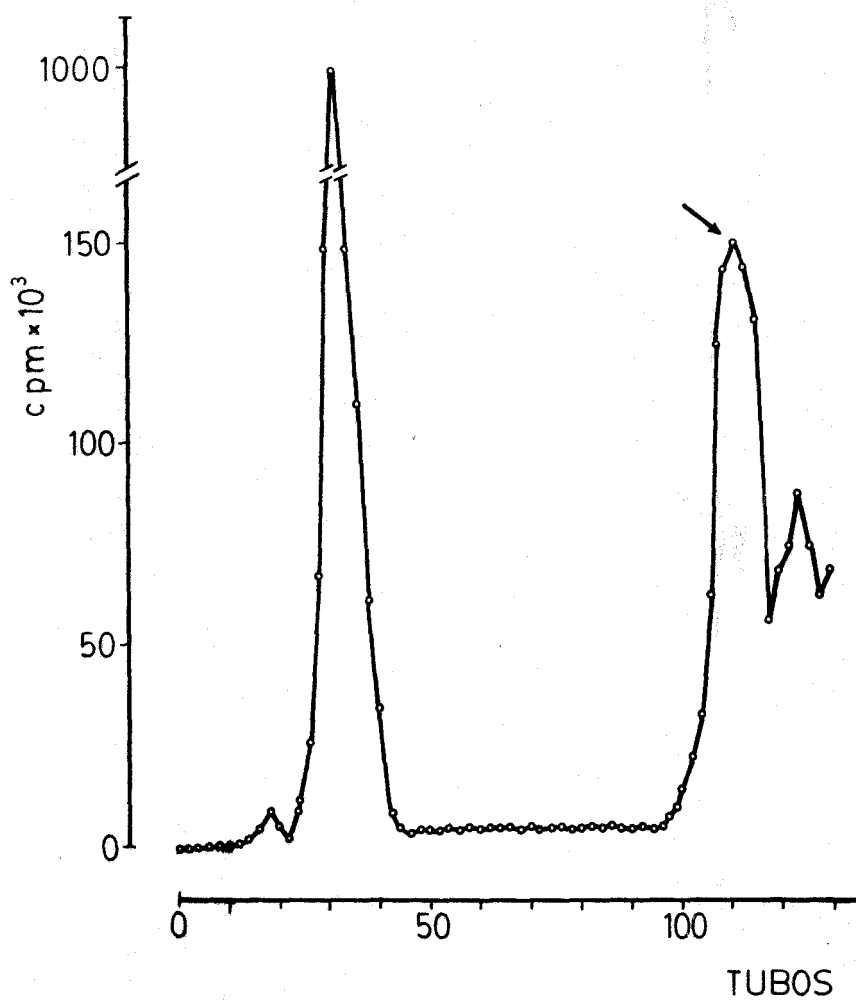


Fig.8 Representación gráfica de los contajes obtenidos en la purificación de la insulina marcada. (la flecha indica el pico de monoiodoinsulina).

En esta columna quedará retenido en principio todas las moléculas con carga negativa excepto los fragmentos peptídicos marcados o sin marcar, que al no ser retenidos serán los primeros que saldrán en el primer pico alto pero muy estrecho .

Cuando se va aumentando la fuerza iónica eluirán primero los péptidos sin carga (insulina sin marcar, es decir, que no tiene iodo en sus tirosinas), a continuación insulina monoyodada, diyodada, etc. -A continuación lo que nos interesa es el primer pico después de una gran depresión, es decir, la insulina monoyodada.

Precipitación con ácido tricloroacético (TCA)

Preparar 3 tubos que contengan 0'1 ml de la solución de marcaje diluida.

Contar su radiactividad (contador gamma). Añadir 1 ml de tampón veronal 0'025 M pH 8'6 BSA 0'25%. Añadir 1 ml de TCA 20%. Agitar. Dejar 5 min.

Centrifugar 5 min a 3000 r.p.m. Aspirar el sobrenadante que contiene el iodo libre y péptidos pequeños. Contar el precipitado que contiene la hormona iodada pura.

Adsorción con talco

Se realiza igual que en el método anterior, pero sustituyendo el TCA por una pastilla de talco (50 mg).

Cálculo del porcentaje de incorporación (%I)

Establecer la media de los contajes de los triplicados antes y después de la precipitación con TCA o con talco.

Ejemplo:

	<u>TCA</u>	<u>TALCO</u>
Antes	65795	66081
Después	59793	59300
% I	<u>90'87</u>	<u>89'74</u>

Considerar como porcentaje de incorporación la media de ambos, es decir: %I = 90'3 %

Cálculo de la actividad específica (A.e.)

La actividad específica de la mezcla previa a su purificación en la columna de DEAE-celulosa sería:

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

en el ejemplo citado, como se han utilizado 2 mCi de ^{125}I :

$$A.e. = \frac{2000 \times 90'3}{5 \times 100} = 361'2 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$$

hay que notar que siempre trabajaremos con monoiodoinsulina, ya que en la cromatografía de intercambio iónico se separa ésta de la insulina no iodada, diiodada, triiodada, etc.

La actividad específica teórica de la monoiodoinsulina es 360 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, prácticamente idéntica a la que nosotros obtenemos antes de la purificación, indicando que nuestra

preparación, antes de la cromatografía, está formada fundamentalmente por insulina y quizás pequeñas proporciones similares entre si de insulina fría y diyodada.

Si la A.e. = $361'2 \mu\text{Ci} / \mu\text{g}$. Como el ^{125}I utilizado tiene $16'2 \text{ mCi} / \mu\text{g}$. Es decir $0'0258 \mu\text{g}$ de ^{125}I incorporado por μg .

Como el peso atómico del iodo es 125 serán $2'064 \times 10^{-4}$ μ átomos de I.

El peso molecular de la insulina es 6000, luego:

$1'24$ átomos de ^{125}I / mol de insulina.

10000 c.p.m. corresponderan a:

$1 \mu\text{Ci} = 2'22 \times 10^6 \text{ d.p.m.} = 1'33 \times 10^6 \text{ c.p.m.}$ (eficacia de nuestro contador gamma es del 60%).

En nuestro caso $1 \mu\text{g} = 361'2 \mu\text{Ci} = 480'39 \times 10^6 \text{ c.p.m.}$

$1 \text{ pg} = 480'39 \text{ c.p.m.}$

Luego en 10000 c.p.m. habrá $20'81 \text{ pg}$ y $3'468 \times 10^{-3} \text{ pmol}$.

$1 \text{ mg} = 25 \text{ U}$, luego $1 \text{ pg} = 0'025 \mu\text{U}$.

Por lo tanto $10000 \text{ c.p.m.} = 0'52 \mu\text{U}$.

5. RADIOINMUNOANALISIS DE INSULINA PARA SUEROS

Método de Heding (1966).

Reactivos

- Tampón fosfato 0'04 M, pH 7'4, albúmina humana (HSA) 0'1% (FAM).
- Tampón fosfato 0'04 M, NaCl 0'6%, albúmina humana 5'9% (NAFAM) pH 7'4.
- Insulina-¹²⁵I preparada en FAM a 5000 c.p.m. aproximadamente.
- Anticuerpo Ab₃ preparado en nuestro propio laboratorio inmunizando cobayas con insulina porcina cristalina. El Ab₃ lo diluimos en FAM a una dilución inicial 1/4000.
- Standard. Insulina porcina 5,10,25,50,100 y 250 μ U/ml en NAFAM.
- Etanol 96 %.
- Solución de lavado: 96 ml de etanol 96 %, 1'8 ml de FAM y 16'2 de agua destilada y desionizada.

Método

- 0'1 ml de standard o suero.
- 0'1 ml de anticuerpo (en controles 0'1 ml de FAM).
- Incubar 24 h a 4°C.

Al cabo de la 24 h añadirle a todos los tubos 0'1 ml de insulina-¹²⁵I.

- Incubar 4 h a 4°C.
- Añadir 1'6 ml de etanol 96%. Agitar y dejar a temperatura ambiente 30 min.
- Centrifugar 10 min al máximo (3000 r.p.m.).
- Aspirar el sobrenadante.
- Añadir 2 ml de solución de lavado.
- Centrifugar 10 min a 3000 r.p.m.
- Aspirar el sobrenadante.
- Añadir 0'5 ml de NaOH 0'05 N y contar 4 min en el contador gamma.
- Calcular el porcentaje de insulina ligada el anticuerpo (B%), construir una gráfica de B% frente a concentraciones de insulina standard en $\mu\text{U}/\text{ml}$, calculando así la insulinemia de los sueros problemas.

En los mismos sueros se determinó paralelamente la concentración de glucosa por un método de glucosa-oxidasa (Boehringer).

6. UNION DE LA INSULINA A SUS RECEPTORES ESPECIFICOS DE MEMBRANAS HEPATICAS.

6.1. Generalidades

Insulina ^{125}I : monoiodoinsulina

La concentración fisiológica de insulina es del orden de $10 \mu\text{U/ml}$ o aproximadamente 10^{-10} M ; $1 \text{ mg} = 25 \text{ U}$.

Es decir: $1 \text{ U} = 0'04 \text{ mg}$; $40 \mu\text{g} = 1000 \text{ mU}$

$10 \mu\text{U/ml} = 10 \text{ mU/l} = 0'4 \mu\text{g/l} = 4 \times 10^{-7} \text{ g/l}$.

Ya que el peso molecular de la insulina es 6000

$\frac{4 \times 10^{-7}}{6000} = 0'66 \times 10^{-10} \text{ mol/l} = 0'066 \text{ nmoles/l} = 0'066 \text{ nM}$.

Las experiencias de unión se van a realizar con una concentración de insulina- ^{125}I $0'05 \text{ nM}$.

Si queremos la insulina ^{125}I a una concentración $0'05 \text{ nM}$ es lo mismo que $0'05 \text{ nmoles/l}$.

Como veremos más adelante el volumen de incubación final en todas las experiencias va a ser de $0'5 \text{ ml}$; luego deberemos tener $0'025 \times 10^{-3} \text{ nmoles/tubo}$.

Si, por ejemplo, en la insulina marcada por nosotros 10000 c.p.m. equivalen a $7'35 \times 10^{-15} \text{ moles}$. Para tener en cada tubo la concentración fisiológica, es decir, $0'025 \times 10^{-3} \text{ nmoles}$ tendríamos que poner 24.000 c.p.m. el día del marcaje.

Insulina fría

Se prepara la insulina, pesando 5 mg de insulina porcina Novo, disolviéndola en 1 ml de HCl 0'01 N y en 32'3ml de Krebs Ringer fosfato pH 7'5, 1'5% de BSA. Quedará a concentración inicial 25 μM (en el tubo de incubación la concentración final será 5 μM) conserva en alícuotas a -20°C . Esta insulina se utiliza para uniones inespecíficas, sin diluir. Para experiencias de dosis-efecto se diluye a concentraciones desde 0'2 a 50 nM final.

También para experiencias de disociación utilizaremos insulina fría, como se describirá más adelante.

Separación de la insulina libre del complejo insulina-receptor.

Terminada la incubación (ver más adelante) se añaden a todos los tubos 0'5 ml de KRP, pH 7'5, BSA 1'5% en frío, para detener la reacción y se centrifuga 10 min a 3000 r.p.m. a 4°C . Después de decantar el sobrenadante, se lava el sedimento con 1 ml de buffer KRP pH 7'5 BSA 1'5%, se centrifuga de nuevo a 3000 r.p.m. 10 min y se decanta el sobrenadante. En el sedimento quedará la insulina unida a las membranas, mientras que la hormona libre se elimina en el sobrenadante.

Unión inespecífica

Parte de la insulina puede adsorberse inespecíficamente

a las membranas, pared del tubo, etc; para evitar que estas uniones no específicas alteren los resultados, en todas las experiencias se incuban unos tubos conteniendo un exceso de insulina fría a concentración $5 \mu\text{M}$ (teóricamente la insulina marcada no debería unirse a las membranas en esta situación).

La unión obtenida se denomina enlace inespecífico y se resta al enlace total para obtener el enlace específico.

Actividad total

En todas las experiencias se ponen 5 tubos que solo llevan 0'1 ml de insulina ^{125}I con objeto de obtener un valor medio de la actividad de insulina ^{125}I total empleada. Con esta media se calcula el porcentaje de insulina ^{125}I ligada (%B) en todos los tubos de la incubación.

6.2. Tiempo de equilibrio: asociación

Es el tiempo en el cual la unión de la insulina con los receptores de membrana alcanza un nivel estable.

El protocolo es el siguiente (tabla 3)

Se utiliza para la unión total:

Tampón KRP pH 7'5 1'5% BSA.

Insulina ^{125}I (concentración final 0'05 nM).

Membranas plasmáticas hepáticas (concentración final 300 μg proteínas/ml).

Para la unión inespecífica se añade además insulina fría (concentración final 1 μM).

Cada punto se realiza por triplicado.

Los tubos se procesan a los 5,10,15,30,45,60 y 90 min.

Los 5 últimos tubos solo llevan 0'1 ml de insulina marcada y no se incuban (actividad total).

Se calculan los porcentajes de unión total (%B) e inespecífica de cada tiempo y restando el porcentaje de la unión total de la unión inespecífica, se obtiene la unión específica.

TABLA N° 3

Tubos	KRP	KRP	Ins.fria	Ins.I ¹²⁵	Membranas	Tiempo
1-3	0'2ml	0'1	—	0'1ml	0'1ml Ro	5'
4	0'2ml	—	0'1ml	0'1ml	0'1ml Ro	5'
5-7	0'2ml	0'1	—	0'1ml	0'1ml Ro	10'
8	0'2ml	—	0'1ml	0'1ml	0'1ml Ro	10'
9-11	0'2ml	0'1	—	0'1ml	0'1ml Ro	15'
12	0'2ml	—	0'1	0'1ml	0'1ml Ro	15'
13-15	0'2ml	0'1	—	0'1ml	0'1ml Ro	30'
16	0'2ml	—	0'1	0'1ml	0'1ml Ro	30'
17-19	0'2ml	0'1	—	0'1ml	0'1ml Ro	45'
20	0'2ml	—	0'1	0'1ml	0'1ml Ro	45'
21-23	0'2ml	0'1	—	0'1ml	0'1ml Ro	60'
24	0'2ml	—	0'1	0'1ml	0'1ml Ro	60'
25-27	0'2ml	0'1	—	0'1ml	0'1ml Ro	90'
28	0'2ml	—	0'1	0'1ml	0'1ml Ro	90'
29-33	—	—	—	0'1ml	—————	—————

6.3. Degradación de la insulina

La degradación de la insulina la estudiaremos mediante tres métodos en la estandarización del sistema:

- 1) Precipitación de ácido tricloroacético (TCA).
- 2) Adsorción a talco.
- 3) Reasociación de la insulina a membranas hepáticas nuevas.

Para los tres métodos se utilizan:

- Sobrenadante de la primera centrifugación que se realizó al separar el complejo hormona-receptor de la insulina libre.
- Sobrenadante de incubaciones realizadas sin membranas (controles).

Precipitación con ácido tricloroacético:

- Tampón: KRP pH 7'5, 1'5% BSA.
- TCA 40%.

Método

0'2 ml de sobrenadante más 1'4 ml de tampón más 0'4 ml de TCA 40%. Ajustar. Dejar reposar 5 min.

Centrifugar 5 min a 3000 r.p.m.

Se elimina el sobrenadante y se cuenta la radiactividad del precipitado (donde se encontrará la insulina que no esté dañada y que ha precipitado con TCA). El resultado

se expresa como % de insulina no dañada en relación con insulina intacta en tubos controles.

Adsorción a talco

Tampón veronal 25 mM, pH 8'6, 0'25% BSA.

Talco 50 mg.

Método

0'2 ml de sobrenadante más 1'8 ml de tampón veronal más una pastilla de talco (50 mg).

Agitar. Dejar reposar 5 min. Centrifugar 5 min a 3000 r.p.m. Descartar el sobrenadante y contar la radiactividad del precipitado. El cálculo de insulina degradada se realiza de forma análoga a la del método anterior.

Unión de la insulina a membranas hepáticas nuevas

Tampón KRP, pH 7'5, 1'5% BSA.

Suspensión de membranas a una concentración 1'5 mg/ml.

Método

Incubar 0'2 ml de los sobrenadantes con membranas nuevas en KRP durante 60 min a 30°C. Detener la reacción y procesar según la técnica habitual.

El porcentaje de insulina no dañada se expresa en relación a controles no incubados previamente en cuanto a la capacidad de ambas preparaciones para unirse a membranas hepáticas.

6.4. Degradación de los receptores

El protocolo se expone en la tabla (4).

Para estudiar la degradación de los receptores durante el tiempo de incubación, se preincubaban la membranas durante 30 y 60 min con el tampón (KRP). A continuación se añade la insulina- ^{125}I y se incuba 60 min a 30°C. Se detiene la reacción y se procesa según la técnica habitual. Los resultados se comparan con los obtenidos con membranas que no han sido preincubadas.

TABLA N° 4

Tubos	KRP	membrana	tiempo preincub.	ins.- ^{125}I	KRP	ins. fría
1-3	0'2	0'1 ml	0 min	0'1	0'1	-
4	0'2	0'1 ml	0 min	0'1	-	0'1
5-7	0'2	0'1 ml	30 min	0'1	0'1	-
8	0'2	0'1 ml	30 min	0'1	-	0'1
9-11	0'2	0'1 ml	60 min	0'1	0'1	-
12	0'2	0'1 ml	60 min	0'1	-	0'1

Se incuban todos los tubos 60 min. Al terminar la incubación, todos los tubos se procesan de la forma habitual.

6.5. Dosis-efecto

En estas experiencias se incubaba insulina- ^{125}I (0'05 nM) con concentraciones crecientes de insulina nativa (0'2-50 nM) para estudiar el desplazamiento progresivo de la hormona marcada por la hormona fría hasta la saturación de los receptores.

Las concentraciones de insulina fría utilizadas son 0'2, 0'5, 1, 2, 5, 10, 20 y 50 nM final.

Estas diluciones se preparan con la insulina fría que hemos descrito anteriormente (IR, 25 μM inicial), según se expone en la tabla (5).

TABLA N° 5

				(inicial)	(final)
				nM	nM
0'1 ml	IR (25000)	+0'9 ml	tampón KRP	2500	500
0'2 ml	IR (2500)	+1'8 ml	" "	250	50
0'1 ml	IR (2500)	+2'4 ml	" "	100	20
0'1 ml	IR (2500)	+4'9 ml	" "	50	10
0'8 ml	IR (50)	+0'8 ml	" "	25	5
0'4 ml	IR (50)	+1'6 ml	" "	10	2
0'5 ml	IR (50)	+4'5 ml	" "	5	1
0'8 ml	IR (5)	+0'8 ml	" "	2'5	0'5
0'4 ml	IR (5)	+1'6 ml	" "	1	0'2

Se preparan estas soluciones agitando y para pasar de una a otra se esperan unos minutos hasta su utilización.

La experiencia de dosis-efecto se realiza por triplicado siguiendo el protocolo de la tabla (6). Los tubos se incuban 60 min a 30°C, se detiene la reacción según la forma habitual. Se cuenta la radioactividad de los sedimentos y se resta la unión inespecífica.

TABLA N° 6

Tubos	KRP	IR	ins.fría	ins. ¹²⁵ I	membranas
1-3	0'2	-	0'1ml (KRP)	0'1 ml	0'1 ml
4-6	0'2	-	0'1ml (0'2nM)	0'1 ml	0'1 ml
7-9	0'2	-	0'1ml (0'5nM)	0'1 ml	0'1 ml
10-12	0'2	-	0'1ml (1 nM)	0'1 ml	0'1 ml
13-15	0'2	-	0'1ml (2 nM)	0'1 ml	0'1 ml
16-18	0'2	-	0'1ml (5 nM)	0'1 ml	0'1 ml
19-21	0'2	-	0'1ml (10nM)	0'1 ml	0'1 ml
22-24	0'2	-	0'1ml (20nM)	0'1 ml	0'1 ml
25-27	0'2	-	0'1ml (50nM)	0'1 ml	0'1 ml
28-30	0'2	0'1ml	-	0'1 ml	0'1 ml
31-35	-	-	-	0'1 ml	-

7. AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS

Se utilizan ratas Wistar hembra de 150-220 g de peso y de una edad aproximada de 2 meses. Los controles son alimentados hasta el momento de su sacrificio con una dieta standard (tabla 2). Las ratas sometidas a 2,4 y 6 días de ayuno respectivamente; todas ellas con agua "ad libitum".

Reactivos

KRP (Krebs Ringer fosfato) pH 6'5, el mismo tampón utilizado en las membranas.

KRP, EDTA 2'5 mM, pH 7'5.

Método

Anestesiarse la rata con pentotal sódico (4 mg/100 g).

Realizarse una laparotomía amplia.

Perfundir en la vena porta 80 ml de KRP EDTA 2'5 mM, pH 7'5. Cuando el hígado comienza a descolorarse se secciona la vena cava para que vaya fluyendo la sangre.

Cuando está pálido el hígado, se extrae y se lava varias veces en el tampón que hemos utilizado para perfundir.

Trocarse el hígado y llevarlo a 100 ml de tampón en un bote de plástico con tapa. Agitar durante 15 min en hielo. Filtrar por gasa doble.

Centrifugar 5 min a 500 r.p.m. Resuspender el precipitado a 100 ml de KRP, pH 7'5. Agitar.

Centrifugar 5 min a 500 r.p.m. Resuspender el precipitado en 5 ml de tampón y llevarlo a un tubo que previamente se ha pesado.

Centrifugar y desechar el sobrenadante. Realizar esta operación 3 veces más. A continuación llevar el sedimento a 5 ml de KRP. Centrifugar al mínimo durante 5 min a 600 x g.

Se pesa el precipitado y se diluye hasta 100 mg/ml.

Para comprobar la viabilidad celular se utiliza azul de tripan al 0'5% en agua destilada y desionizada (4 partes de suspensión celular en 1 parte de solución de azul de tripan).

Se extiende una alícuota sobre un porta y se observa al microscopio (X40). Las células viables no se tiñen con el colorante (se obtuvo una proporción del orden de 80-90 %).

8. DETERMINACION DE DNA EN HEPATOCITOS AISLADOS

Basado en el método fluorimétrico de Kissane y Robins (1958) con ligeras modificaciones.

Fundamento

Los aldehidos tales como desoxiribosa dan productos fluorescentes al reaccionar con DABA 2 HCl (ácido 3-5 diaminobenzoico, en forma de clorhidrato).

Reactivos

Standard DNA de timo bovino SIGMA. Se prepara a una concentración de 1 mg/ml en NH_4OH 1 N y se conserva a 4°C.

Acido 3-5 diaminobenzoico (DABA) SIGMA (debe conservarse en la oscuridad a 4°C).

El día del ensayo se decolora el DABA de la siguiente forma:

Se disuelven 3 g de DABA en 10 ml de ClH 4 N y se añaden 20 mg de carbón activo. Agitar y centrifugar durante 10 min a 3000 r.p.m.

Pasar el sobrenadante a otro tubo y añadir otra vez la misma cantidad de carbón activo. Agitar y centrifugar 10 min a 3000 r.p.m.

Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo y conservarlo tapado en la oscuridad a 4°C hasta su uso (antes de 90 min).

Tampón KRP pH 7'5.

Acido perclórico 0'6 N.

Método

Curva standard. Preparar el día antes de la prueba, diluciones del stock de DNA con NH_4OH 1 N.

31'2, 62'5, 125, 250, 500 y 1000 μg DNA/ml. Evaporar alícuotas de 0'1 ml por duplicado a sequedad bajo corriente de aire a temperatura ambiente.

Muestras

Se diluye 0'1 ml de suspensión de hepatocitos con 0'9 ml de KRP y se sonica durante 10 s.

Se añaden 2'5 ml de TCA al 10%, se agita y se centrifuga 5 min a 3000 r.p.m. Se descarta el sobrenadante.

Se resuspende el sedimento en 3 ml de etanol absoluto y se centrifuga 5 min a 3000 r.p.m., descartándose el sobrenadante.

Se resuspende el sedimento en 3 ml de etanol absoluto y se centrifuga 5 min a 3000 r.p.m. descartándose el sobrenadante.

El sedimento se evapora a sequedad a temperatura ambiente bajo corriente de aire. La determinación puede hacerse

a continuación o el día siguiente.

Ensayo

Poner 100 μ l de DABA en todos los tubos (blancos, curva standard y muestras problema).

Incubar a 60°C durante 30 min bajo agitación.

Terminada esta incubación añadir 1 ml de ácido perclórico 0'6 N y agitar.

Tomar 400 μ l de cada tubo y mezclarlo con 2 ml de ácido perclórico 0'6 N.

Leer en fluorímetro la intensidad de la luz emitida
absorción = 410 nm, emisión = 520 nm.

La solución fluorescente es estable al menos 2 horas.

Se representa la emisión frente a μ g de DNA/ml (fig. 9).

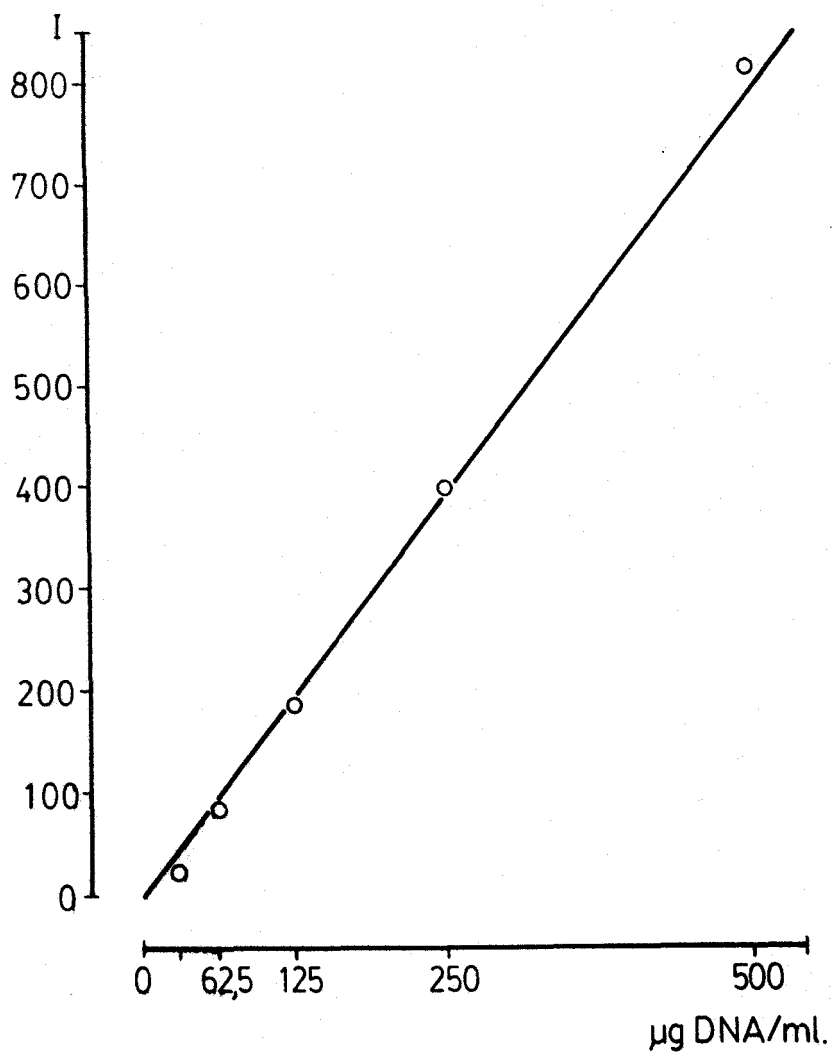


Fig.9 Curva standard de la determinación de DNA.

9. DOSIS-EFECTO: HEPATOCITOS AISLADOS

Reactivos

Tampón KRP, pH 7'5, BSA 1'5%.

Hepatocitos: a una concentración de 100 μg DNA/ml final en el tampón anterior.

Insulina- ^{125}I 0'05 nM final.

Insulina fría 15 μM final .

Insulina fría a concentración final en los tubos de incubación de 0'2, 0'5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 y 100 nM.

Método

Se preincuba 15 min a 30°C la insulina- ^{125}I añadiendo a continuación la suspensión de hepatocitos.

Agitar e incubar 30 min a 30°C. A continuación llevar 0'2 ml de los tubos de incubación a un tubo de microfuga que tiene 0'2 ml de tampón frío. Centrifugar en la microfuga a 10.000 g. Aspirar el sobrenadante, añadir 0'2 ml de KRP con sacarosa 10% y volver a aspirar. Cortar los tubos con un bisturí exactamente por encima del precipitado y contar durante 10 min. Para la actividad total, contar 0'2 ml de la mezcla de incubación. El protocolo se recoge en la tabla (7).

TABLA N° 7

Ejemplo de protocolo dosis-efecto (hepatocitos)

Tubos	KRP	Ins.fría	Ins.-I ¹²⁵	hepatocitos
1-3	0'2 ml	0'1ml tampón	0'1 ml	0'1 ml
4-6	0'2 ml	0'1ml 0'2 nM	0'1 ml	0'1 ml
7-9	0'2 ml	0'1ml 0'5 nM	0'1 ml	0'1 ml
10-12	0'2 ml	0'1ml 1 nM	0'1 ml	0'1 ml
13-15	0'2 ml	0'1ml 2 nM	0'1 ml	0'1 ml
16-18	0'2 ml	0'1ml 5 nM	0'1 ml	0'1 ml
19-21	0'2 ml	0'1ml 10 nM	0'1 ml	0'1 ml
22-24	0'2 ml	0'1ml 20 nM	0'1 ml	0'1 ml
25-27	0'2 ml	0'1ml 50 nM	0'1 ml	0'1 ml
28-30	0'2 ml	0'1ml 100 nM	0'1 ml	0'1 ml
31-35	0'2 ml	0'1ml IR	0'1 ml	0'1 ml
AT	-	-	0'1 ml	-

10. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos en las experiencias dosis-efecto se pueden expresar de varias formas:

- A partir de la c.p.m. se puede calcular el porcentaje total de unión; restando la unión inespecífica se obtiene el porcentaje de unión específica (B%). Representando B% frente a la concentración de insulina fría se obtienen las curvas de desplazamiento, donde se puede obtener la constante de disociación global (concentración de insulina fría que desplaza el 50% de insulina marcada unida).
- Para calcular la cantidad absoluta de hormona ligada, se multiplica el porcentaje de insulina ^{125}I unida por la correspondiente concentración total de hormona; el valor así obtenido representa la concentración de insulina unida. Dividiendo este último valor por la concentración de proteínas de membranas o por la cantidad de DNA, se obtiene la insulina unida por DNA o por proteína de membrana.

En las gráficas de saturación se representa la cantidad de insulina ligada por DNA o por mg de proteína en función de la concentración de hormona fría. En ellas se puede obtener la $S_{0,5}$ o concentración de insulina a la cual se ocupan la mitad de los receptores.

- El tratamiento de los resultados por el método de Scatchard (1949) ha sido muy utilizado en el estudio de receptores; en las gráficas de Scatchard se representa la cantidad de hormona ligada total frente al cociente de los porcentajes hormona ligada /hormona libre (B/F). Si al representarlo se obtiene una recta, ello indica que hay un solo receptor y que no existen interacciones cooperativas. La pendiente de esta recta es la constante K de afinidad y la intersección con el eje de abcisas corresponde al número de receptores (R). Si se obtiene una curva de tipo hiperbólico, ello indica la existencia de más de una clase de sitios de unión con diferente afinidad o interacciones cooperativas sitio-sitio. La intersección de esta curva con el eje de abcisas representa el número total de receptores. El número de receptores de alta y baja afinidad puede calcularse a partir de la intersección de la prolongación de las asíntotas de ambos tramos de la curva con el eje de abcisas. Las constantes de afinidad son las pendientes de los tramos anteriores.
- Para poder determinar el índice de cooperatividad se utiliza la representación de Hill (1912) basada en la siguiente ecuación (aplicada a la insulina):

$$\log \frac{B}{B_{\max} - B} = n \log (I) - \log Kd$$

lo que corresponde a una recta en la cual:

B : es la insulina ligada

B_{\max} : insulina ligada en condiciones de saturación de los receptores.

n : es el índice de cooperatividad (pendiente de la recta).

(I) : concentración de insulina libre.

K_d : constante de disociación.

Si en esta recta:

$n=1$ no hay cooperatividad

$n<1$ cooperatividad negativa

$n>1$ cooperatividad positiva.

- A partir de la gráfica de De Meyts (1976) se pueden obtener las constantes K_e y K_f (constantes de afinidad para los receptores ocupados y para los receptores vacíos, respectivamente) en ella se representa $B/F / R-B$ en función del $\log Y$.

Lo que corresponde a:

B/F : es el mismo cociente utilizado en la representación de Scatchard.

R : número de receptores obtenido en la representación de Scatchard.

B : insulina unida total.

Y : fracción de sitios ocupados.

4º RESULTADOS.

1. CARACTERISTICAS DE LOS ANIMALES: peso, glucosa, insulina.

Como puede observarse en la tabla (8) , el peso de los animales estudiados disminuyó significativamente tras periodos tan cortos como 1 día de ayuno, haciéndose más ostensible la diferencia tras intervalos más prolongados (2,4 y 6 días) de privación de alimentos. De hecho, tras 6 días de ayuno, los animales mostraron un peso inferior en casi un 30% al de los controles alimentados.

En las tablas 9 y 10 se recogen los niveles de glucosa e insulina en plasma respectivamente. Ambos parámetros disminuyeron bruscamente ya en el primer día de ayuno, estabilizándose a valores bajos a partir del segundo día hasta periodos largos de 6 días de ayuno. La realimentación, tanto total como selectiva con glucosa oral, dió lugar a una recuperación de la glucemia y de la insulinemia hasta valores similares a los de los animales controles.

TABLA N° 8

Peso de ratas controles o sometidas a 1,2,4 y 6 días de ayuno, y porcentaje de modificación de peso con respecto a los controles.

	R_0	R_1	R_2	R_4	R_6
Peso	$205 \pm 2'2$	$192 \pm 4'8$	$185 \pm 5'8$	$161 \pm 3'5$	$146 \pm 2'1$
	n = 23	n = 10	n = 12	n = 20	n = 26
% modificación de peso		- 6'3%	- 9'7%	- 21'5%	- 28'7%

TABLA N° 9

Glucemia de ratas controles o sometidas a 1, 2, 4 y 6 días de ayuno; 4 o 6 días de ayuno más 2 de realimentación con dieta standard o con glucosa oral al 40%, expresada en mg%. Se indica también el porcentaje de modificación con respecto a los controles. $X \pm ESM$

	R_0	R_1	R_2	R_4	R_6
Glucemia	$111 \pm 4'5$	$72 \pm 7'2$	$69 \pm 6'5$	$67 \pm 3'3$	$76'9 \pm 5'2$
	n = 20	n = 9	n = 7	n = 25	n = 29
% modificación glucemia		-31'1 %	-37'8 %	-39'6 %	-30'7 %
		R_{4+2}	R_{6+2}	$R_{6+2} G$	
Glucemia		$130'7 \pm 15'2$	$116 \pm 5'7$	$125 \pm 12'4$	
		n = 10	n = 11	n = 5	
% modificación glucemia		+19'5 %	+4'5 %	+12'6 %	

TABLA N° 10

Insulinemia de ratas controles o sometidas a 1,2,4 y 6 días de ayuno; 4 o 6 días de ayuno más 2 de realimentación con dieta standard o con glucosa oral al 40%. Se indica también el porcentaje de modificación con respecto a los controles. $\bar{X} \pm ESM$. Insulina: $\mu U/ml$.

	R_0	R_1	R_2	R_4	R_6
Insulinemia	$80 \pm 6'9$	$48 \pm 2'7$	$43 \pm 1'1$	$37 \pm 1'9$	$37 \pm 1'4$
	n = 16	n = 6	n = 5	n = 7	n = 10
% modificación insulinemia		-40 %	-46'25 %	-53'75 %	-53'75 %
	R_{4+2}	R_{6+2}	$R_{6+2} G$		
Insulinemia	$84 \pm 12'6$	$93 \pm 5'1$	98'5		
	n = 5	n = 3	n = 2		
% modificación insulinemia	+5 %	+16'62 %	+23'12		

2. CARACTERISTICAS DE LAS MEMBRANAS: 5'-mononucleotidasa.

En la tabla (11) se representa la actividad de la 5'-mononucleotidasa de membranas hepáticas de ratas controles o sometidas a 1,2,4 y 6 días de ayuno; 4 y 6 días de ayuno más 2 de realimentación con dieta standard y con glucosa tanto en el homogeneizado inicial (H) como en el último paso del aislamiento (M), así como la actividad específica relativa (AER) de la 5'-mononucleotidasa con respecto al homogeneizado inicial (H) considerado como punto de partida de la purificación. En esta tabla se recoge el valor medio para cada tipo de preparación. En las experiencias particulares, se ha trabajado con preparaciones de membranas aisladas que poseyeran un grado de purificación similar en cuanto al marcador de 5'-mononucleotidasa (menos de 10% de diferencia). De todos modos, estas mínimas discrepancias en el grado de purificación se han corregido al expresar los resultados finales de cada experimento.

TABLA N° 11

Actividad de la 5'-mononucleotidasa en el homogenizado inicial del proceso de aislamiento (H), en las membranas (M) y AER (actividad específica relativa) expresada en $\mu\text{moles P/h/mg prot. } X \pm \text{ESM}$

	H	M	AER	
R ₀	1'5 \pm 0'1	14'7 \pm 1'6	10'1	n = 6
R ₁	1'8 \pm 0'1	18'1 \pm 1'7	10'0	n = 3
R ₂	1'9 \pm 0'1	19'6 \pm 0'8	10'4	n = 3
R ₄	1'7 \pm 0'1	16'0 \pm 2'1	9'2	n = 5
R ₆	1'6 \pm 0'3	14'7 \pm 0'3	8'9	n = 4
R ₄₊₂	1'4 \pm 0'1	14'6 \pm 0'3	9'3	n = 2
R ₆₊₂	1'6 \pm 0'8	15'0 \pm 0'3	9'1	n = 2
R ₆₊₂ G	1'5 \pm 1'1	13'2 \pm 0'5	8'6	n = 2

3. ESTANDARIZACION DEL METODO DE UNION INSULINA-RECEPTOR.

Antes de proceder a la evaluación de las posibles diferencias que provoca el ayuno sobre la unión de la insulina a sus receptores específicos de membranas hepáticas, es evidente la necesidad de optimizar las condiciones del experimento. Por ello, se han evaluado distintas condiciones experimentales (temperatura, pH, fuerza iónica, tiempo de incubación, etc.) sobre la cinética y estequiometría del proceso de formación del complejo hormona-receptor, así como otros aspectos tales como degradación de ambos componentes del sistema, especificidad, etc.

3.1. Cinética de asociación: efecto de la temperatura.

El primer paso en el estudio de la unión de la insulina al receptor se refiere a su dependencia con respecto al tiempo y a la temperatura.

En la figura 10 se observa como el porcentaje de insulina marcada unida a las membranas aumenta conforme transcurre el tiempo de incubación, para todas las temperaturas a que se ha realizado la experiencia tabla (12).

La velocidad inicial de la unión hormona-receptor depende de la temperatura, siendo la mayor a 37°C y la menor

a 4°C. Llega un momento en el cual la unión alcanza el equilibrio, distinto para cada temperatura. A 37°C el equilibrio se alcanza a los 10 min siendo el porcentaje de insulina unida a las membranas relativamente bajo con respecto a otras temperaturas, debido, en parte, a una mayor degradación de la insulina como se verá a continuación. A 20°C el equilibrio se alcanza a los 45 min aproximadamente, mientras que a 20°C es a partir de las 2 horas y a 4°C son necesarios tiempos superiores.

TABLA N° 12

Unión específica de insulina-¹²⁵I (0'05 nM) a membranas hepáticas a diferentes tiempos y temperaturas de incubación. Expresado como porcentaje de unión (B%) (\bar{X} triplicados).

Tiempo (min)	5	10	15	30	45	60	90	120
37°C	1'8	2'0	2'1	2'0	1'9	1'9	-	1'7
30°C	2'4	3'0	-	3'7	4'3	4'2	4'5	4'6
20°C	-	1'4	-	2'5	-	3'2	-	3'9
4°C	0'9	1'1	-	1'9	-	-	-	3'6

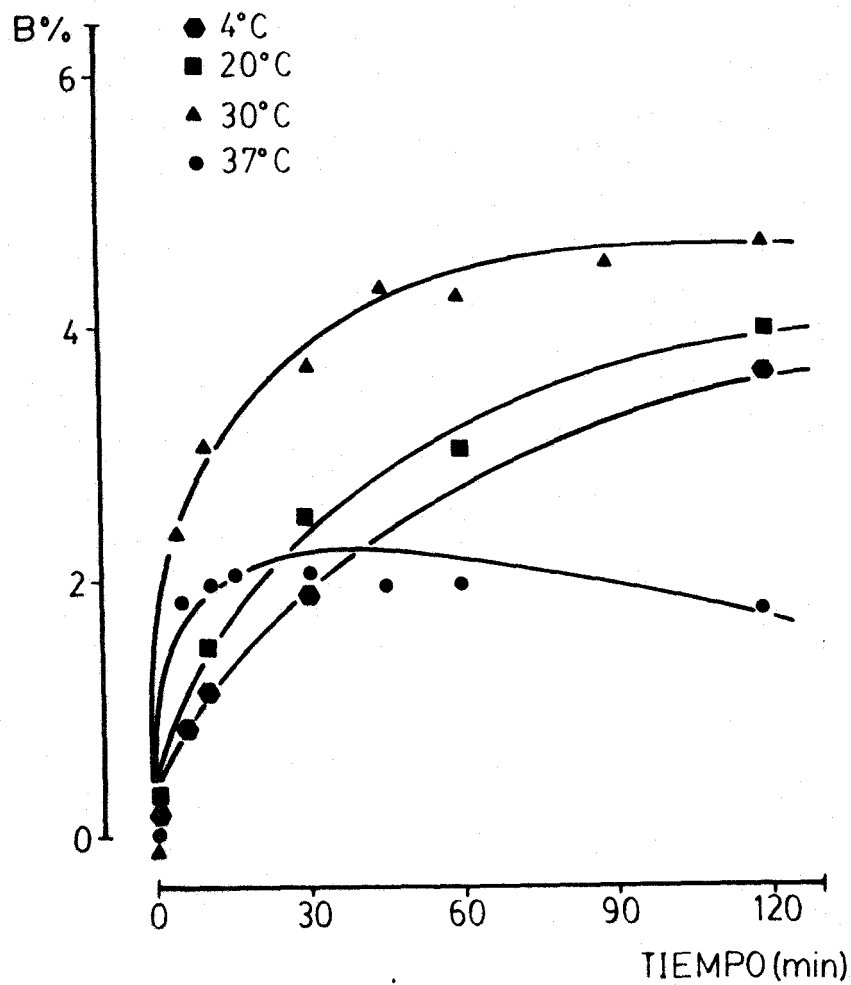


Fig.10 Porcentaje de insulina- ^{125}I unida específicamente a membranas hepáticas en función del tiempo a distintas temperaturas.

3.2. Degradación de la insulina.

En el presente trabajo se han utilizado tres métodos diferentes para evaluar la degradación o inactivación de la insulina; para ello, se han recogido los sobrenadantes que provienen de la centrifugación de las mezclas de incubación, es decir, las fracciones que contienen la insulina libre, y se ha estudiado su capacidad para ser precipitada por ácido tricloroacético, para ser adsorbida a talco o para unirse nuevamente a una preparación fresca de membranas hepáticas. Como puede observarse en las figs.11, 12, 13 y en las tablas 13,14,15, la degradación de la insulina es un proceso dependiente directamente del tiempo y de la temperatura de incubación. Los resultados obtenidos son similares cualitativamente en los tres métodos estudiados, si bien son mayores en el caso del estudio de unión a membranas hepáticas frescas, intermedias cuando se utiliza la adsorción a talco y menores con la precipitación con ácido tricloroacético, debido a la inespecificidad de estos dos últimos métodos. En cualquiera de los casos, la mayor actividad de degradación se observó a 37°C.

TABLA N° 13

Porcentaje de insulina-¹²⁵I degradada, determinada mediante precipitación con ácido tricloroacético (TCA).

Tiempo (min)	5	10	30	45	60	90	120	4(h)	24(h)
4°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20°C	-	1'0	1'7	-	1'2	-	1'3	5'6	-
30°C	0	0	2'9	3'0	3'8	7'4	9'3	-	-
37°C	0'5	4'5	8'0	-	8'0	8'4	9'8	-	-

TABLA N° 14

Porcentaje de insulina-¹²⁵I degradada, determinada mediante adsorción a talco.

Tiempo (min)	5	10	30	45	60	90
20°C	-	3'6	6'3	-	8'9	8'9
30°C	0	3'3	4'6	6'4	9'1	15'7
37°C	6'0	8'2	10'9	13'1	15'7	19

TABLA N° 15

Porcentaje de insulina-¹²⁵I degradada, determinada mediante reasociación a membranas frescas.

	30 min	60 min
30°C	8'43	14'21

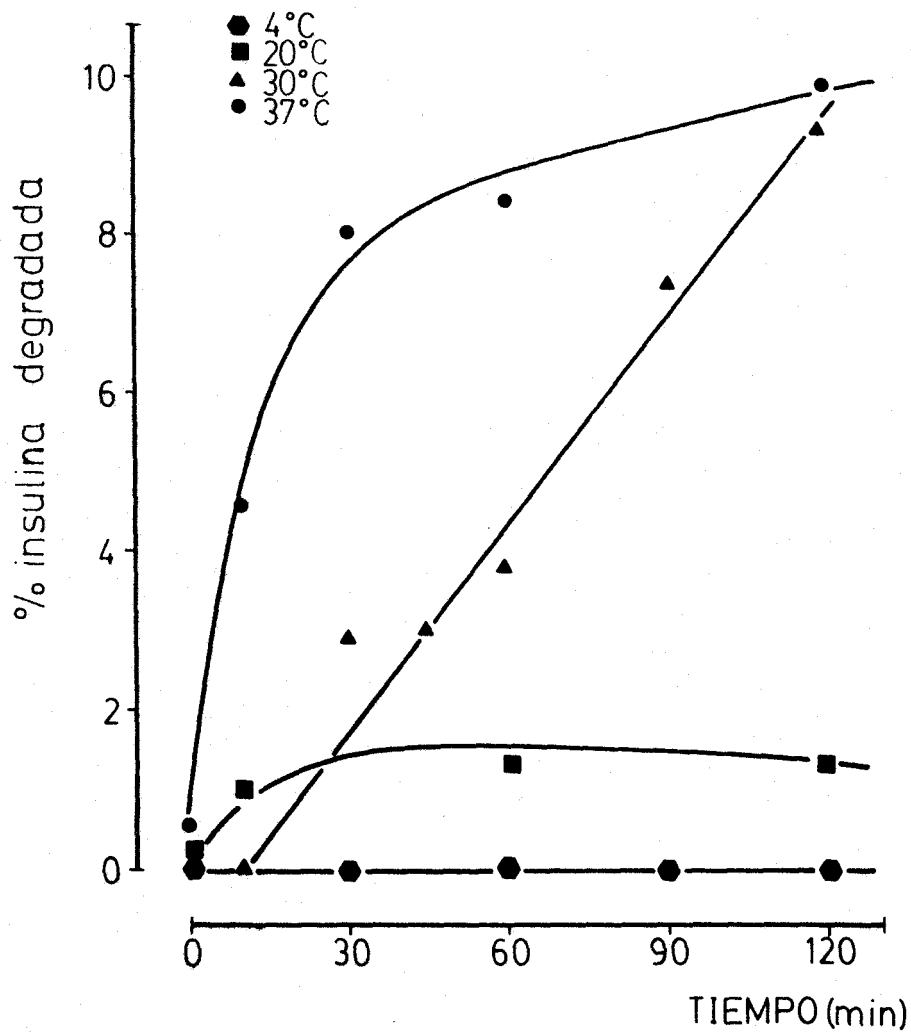


Fig.11 Porcentaje de insulina ^{125}I degradada, mediante precipitación con TCA dependiente del tiempo y la temperatura de incubación.

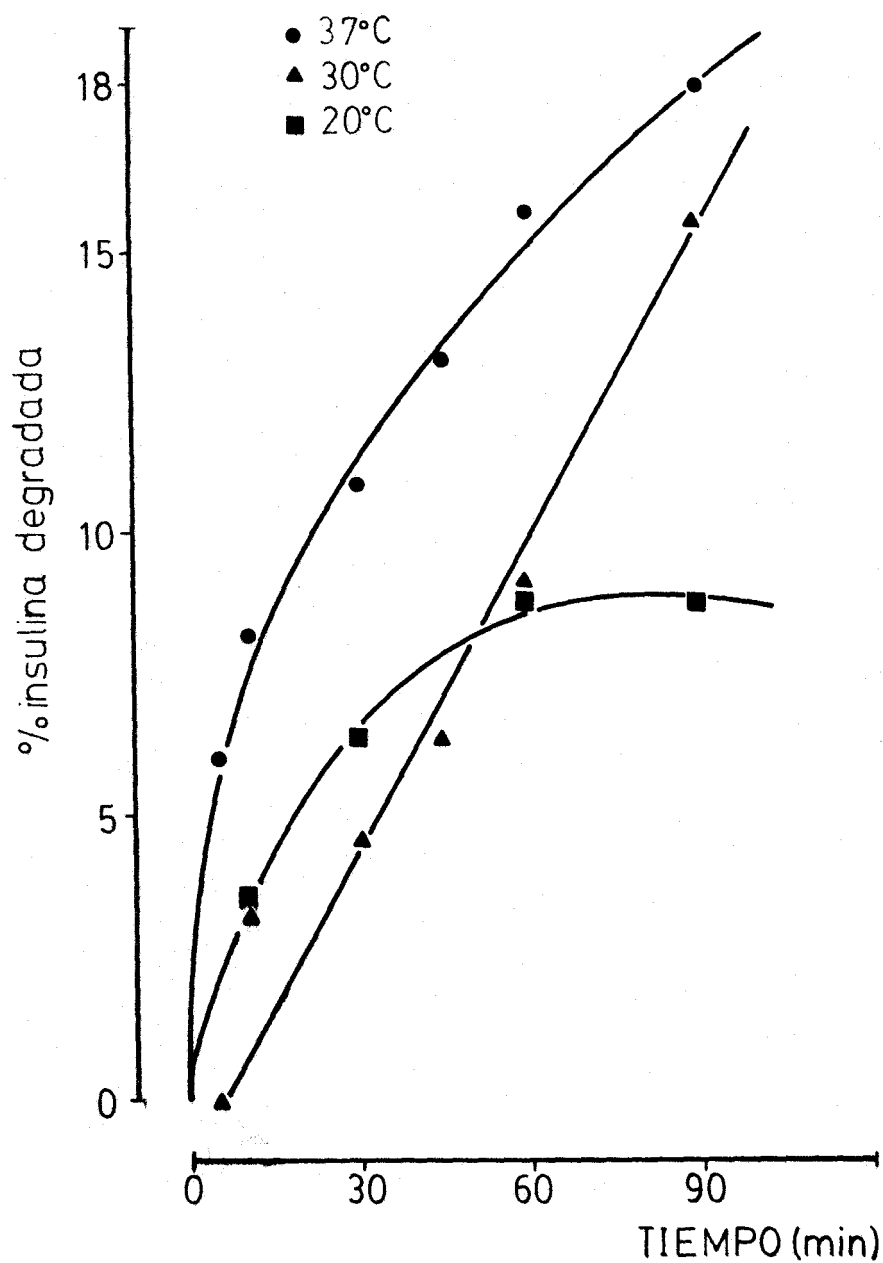


Fig. 12 Porcentaje de insulina ^{125}I degradada mediante adsorción a talco, dependiente del tiempo y la temperatura de incubación.

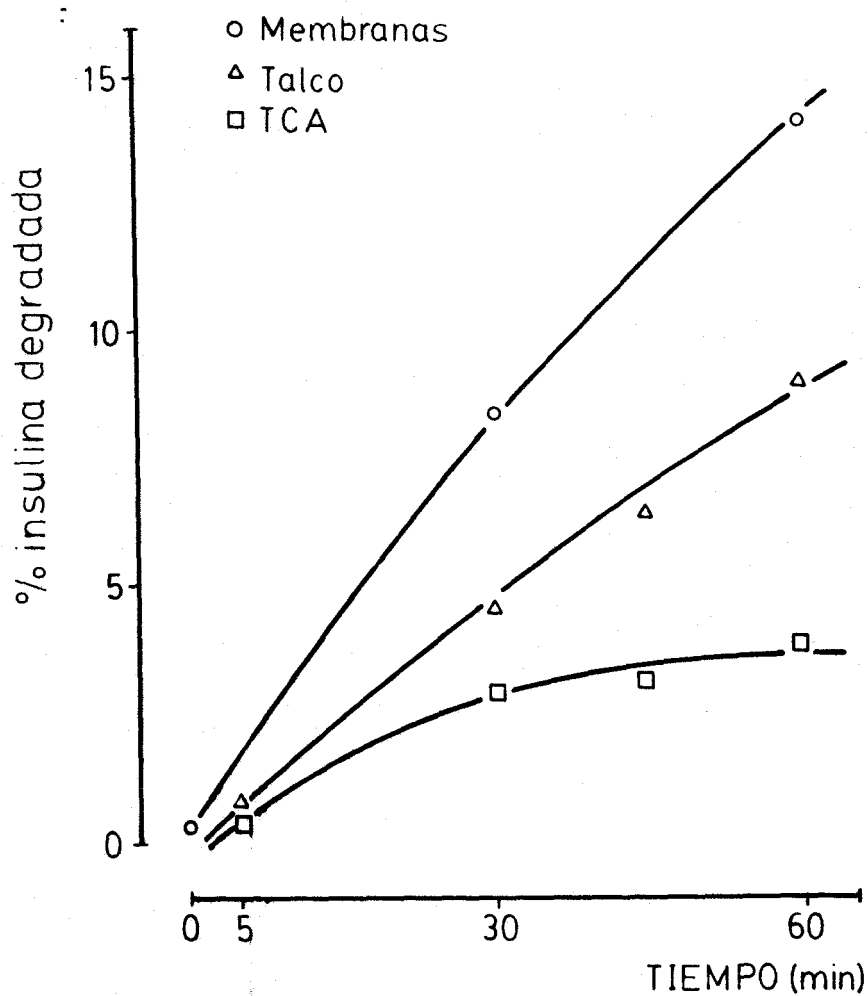


Fig.13 Porcentaje de insulina ^{125}I degradada a 30°C con precipitación con TCA, adsorción con talco y reasociación a membranas hepáticas frescas.

3.3. Efecto del pH y de la composición del medio de incubación

Efecto del pH

En la figura 14 se representa el efecto que ejerce el pH del medio de incubación sobre la unión de la insulina a sus receptores (tabla 16). El pH en que se obtiene un porcentaje mayor de unión específica es 7'5, observándose un rango de $\pm 0'5$ en el que dicha unión se mantiene a unos niveles cercanos a los máximos. En un pH superior a 8 o inferior a 7 la unión disminuye rápidamente.

Se ha estudiado asimismo la degradación de la insulina a diferentes valores de pH (tabla 17). En la figura se observa cómo la degradación es máxima a pH 7'5 mientras que, por encima y por debajo de este valor, es mucho menor. Esto indicaría que el sistema degradante de la insulina es activo en un margen de pH muy estrecho.

TABLA N° 16

Porcentaje de insulina-¹²⁵I unida específicamente a las membranas a diferentes pH. (\bar{X} de triplicados).

pH	6'3	6'7	7'5	8'0	8'6	9'1
%B	3'1	8'3	9'0	8'4	6'7	4'7

TABLA N° 17

Porcentaje de insulina degradada (% ins. deg.) a diferentes pH estimada por adsorción a talco (\bar{X} de triplicados).

pH	6'7	7'5	8'0	8'6	9'1
% ins.deg.	1'9	6'9	3'5	1'3	-

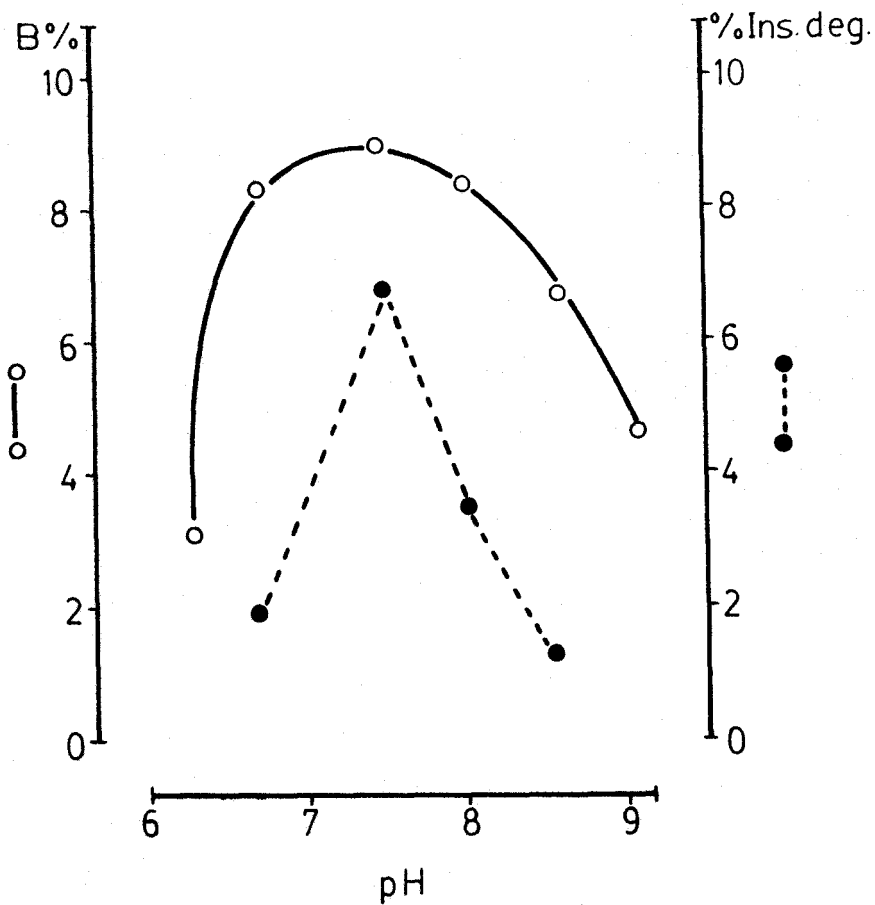


Fig.14 Efecto del pH sobre la unión específica y la degradación de la insulina- ^{125}I .

Efecto de la fuerza iónica

En la figura 15 puede observarse el efecto de la fuerza iónica sobre la unión específica de la insulina-¹²⁵I a las membranas (tabla 18). El aumento de la concentración de NaCl en el medio de incubación provoca una disminución del %B. El mismo efecto ocurre en presencia de altas concentraciones de KCl aunque de forma más atenuada.

TABLA N° 18

Porcentaje de insulina-¹²⁵I unida específicamente a membranas, a diversas concentraciones de NaCl y KCl, con respecto a los controles (\bar{X} de triplicados).

	control	0'1	0'5	1	2
NaCl	100	80'0	77'6	55'0	38'0
KCl	100	70'3	63'3	62'3	60'3

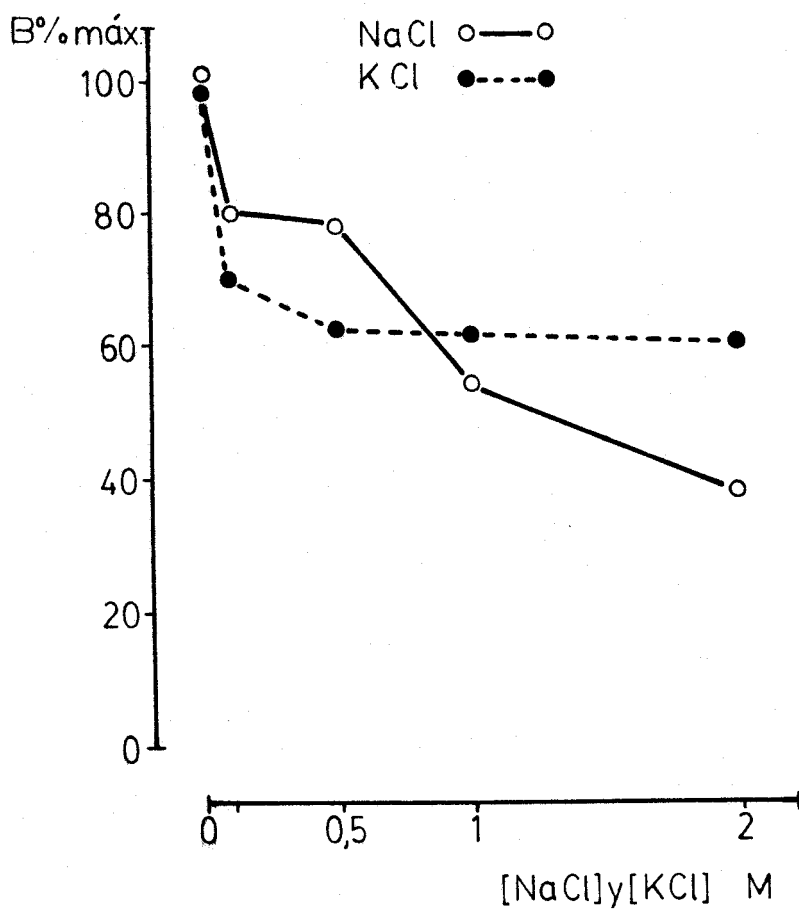


Fig.15 Efecto de la fuerza iónica sobre la unión específica de la insulina-¹²⁵I.

Efecto del tampón

En la tabla 19 puede observarse que la utilización de KRP, KRB o Tris-HCl 50 mM, todos a pH7'5, como medio de incubación no altera sensiblemente la unión de la insulina a las membranas. Por otra parte, la adición al medio de incubación de EDTA (10 y 20 mM) tampoco afecta a dicha unión (tabla 19).

TABLA N° 19

Efecto de diferentes tampones sobre la unión específica de la insulina-¹²⁵I a las membranas. Los valores expresan la relación porcentual entre el %B control (KRP) y el %B obtenido en la incubación con cada tampón. (\bar{X} de triplicados).

Control	KRP	Tris 50mM	EDTA 10mM	EDTA 20 mM
100	97%	81%	105%	107%

3.4. Efecto de la concentración de membranas

En la figura 16 y en la tabla 20 se representa el efecto de la concentración de membranas sobre la unión de insulina a su receptor. Dicha unión es proporcional a la concentración de membranas en el rango estudiado (50-700 μg de prot./ml). Asimismo, la degradación de la insulina, estudiada mediante adsorción a talco, sigue el mismo patrón de proporcionalidad con respecto a la concentración de proteínas de membranas (fig. 16 y tabla 20).

TABLA N° 20

Porcentaje de insulina unida específicamente a los receptores y de insulina degradada, en presencia de concentraciones crecientes de membranas (\bar{x} de triplicados).

	(prot. de membrana) $\mu\text{g}/\text{ml}$					
	50	100	200	300	500	700
%B esp.	1'7	2'7	6'0	8'3	14'5	19'8
% ins.deg.	0'7	3'8	8'3	15'0	17'6	21'6

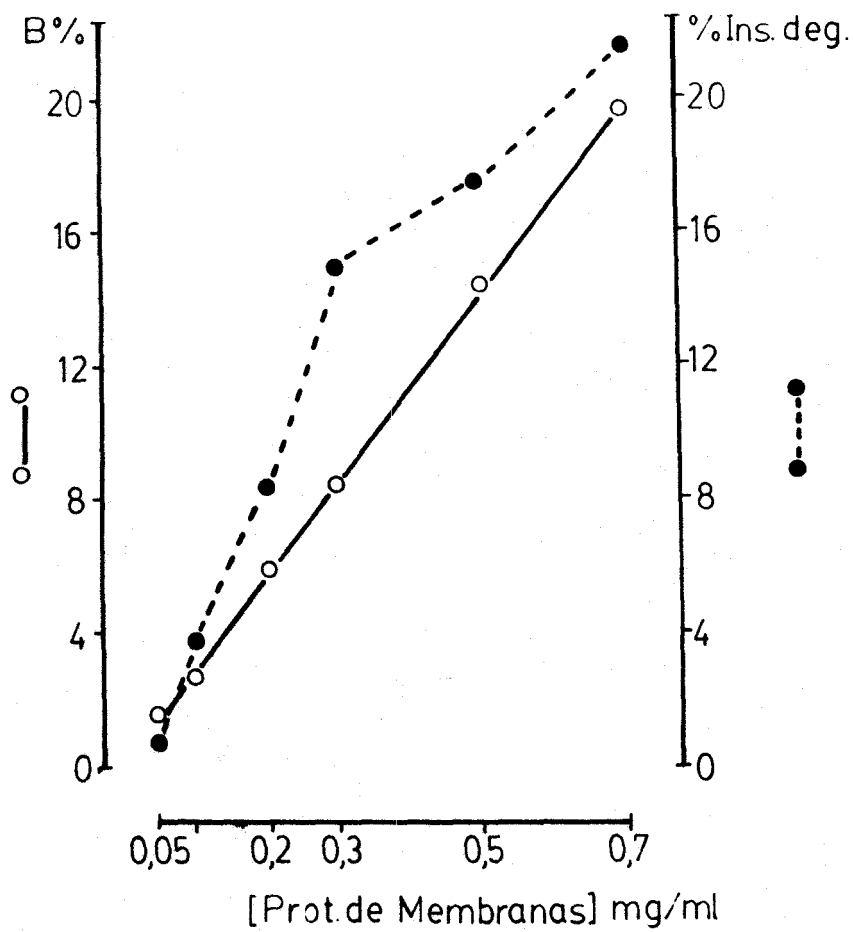


Fig. 16 Efecto de la concentración de membranas sobre el porcentaje de unión específica y la degradación de la insulina-¹²⁵I.

3.5. Cinética de disociación: cooperatividad negativa.

La unión de la insulina a los receptores específicos de membrana es un fenómeno reversible como se comprueba en la fig. (17) en la que se ha disociado el complejo hormona-receptor mediante dos métodos: por dilución (50 veces) en ausencia o en presencia de una alta concentración de insulina fría ($1 \mu\text{M}$) (tabla 21).

La velocidad de disociación es mayor en presencia de insulina fría indicando la existencia de un fenómeno de cooperatividad negativa entre los receptores de la membrana, de modo que la afinidad disminuye cuanto más elevado sea el grado de ocupación de los receptores por la hormona. El tiempo de semidisociación es de 15 min cuando se estudia solo la dilución y de 10 min cuando la disociación se realiza en presencia de insulina fría.

TABLA N° 21

Cinética de disociación: porcentaje de unión mediante dilución en presencia y en ausencia de un exceso de insulina fría (\bar{X} de triplicados).

Tiempo (min)	0	5	10	30	45	60
Dilución	4'8	3'5	2'9	2'0	1'8	1'7
Dilución + insulina	4'6	2'8	2'2	1'5	1'3	1'1

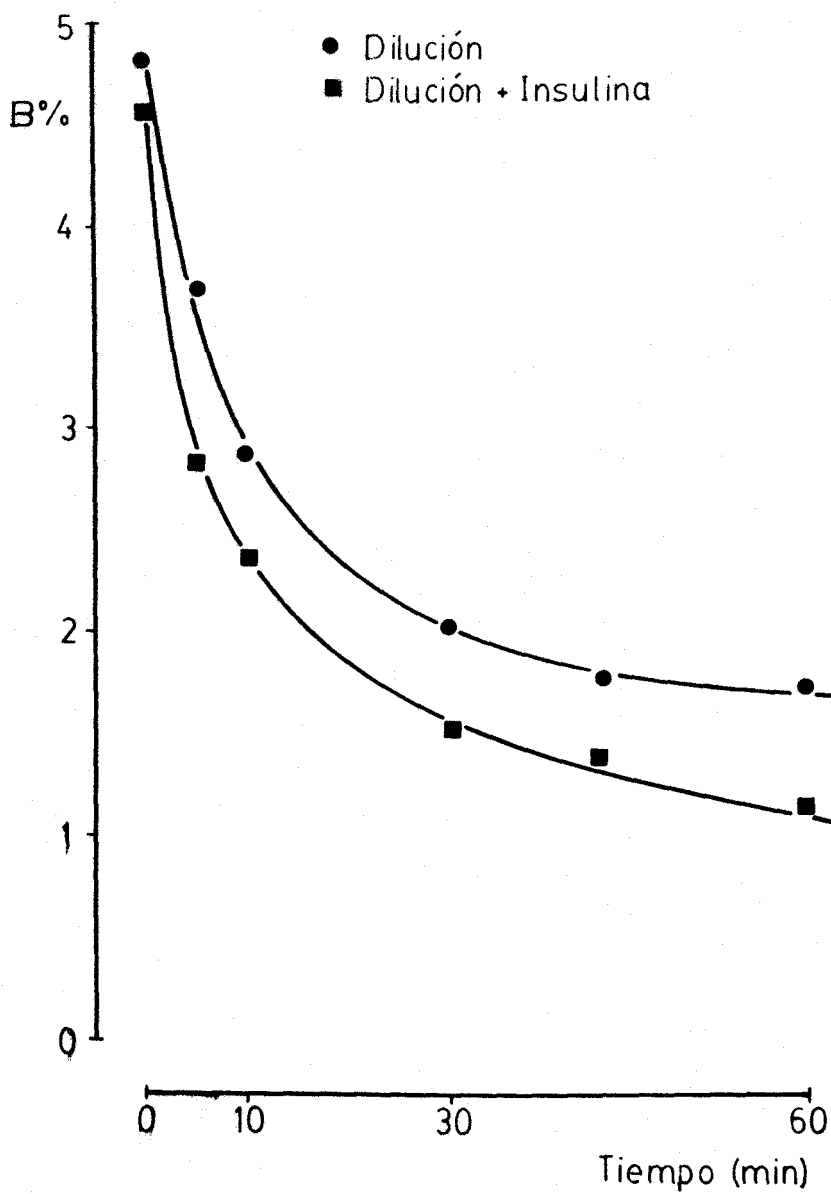


Fig.17 Cinética de disociación del complejo hormona-receptor mediante dilución, en ausencia o presencia de una alta concentración de insulina fría.

3.6. Estequiometría de la unión insulina-receptor. Efecto de la concentración de insulina fría.

Para estudiar la estequiometría de la unión insulina-receptor se han realizado incubaciones de membranas hepáticas en presencia del trazador (insulina-I¹²⁵) añadiendo al medio concentraciones crecientes de insulina fría.

Puede observarse en la fig.(18) como el incremento de concentraciones de insulina fría va desplazando el trazador que se encuentra unido a los receptores. Esto indica que la insulina fría compite con la marcada para unirse al mismo receptor.

El 50% de inhibición de la unión del trazador a las membranas se observa a una concentración de insulina fría del orden de $2 \cdot 4$ nM. Este valor correspondería a la constante de disociación K_d (inversa de la constante de afinidad K_a) en el caso de que existiera una sola clase de receptores de insulina, pero la situación real es mucho más compleja, como se ha discutido anteriormente.

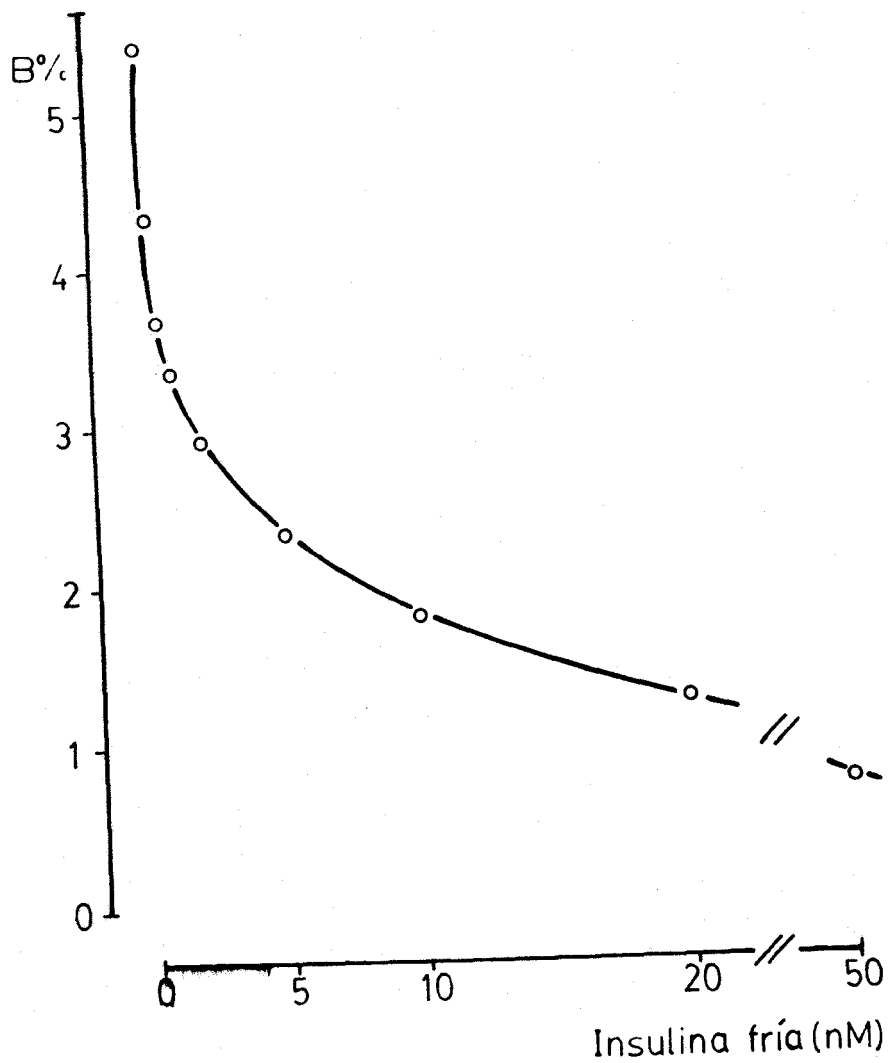


Fig.18 Desplazamiento de la insulina- ^{125}I unida a membranas hepáticas en presencia de concentraciones crecientes de insulina fría.

3.7. Equivalencia entre insulina fría e insulina marcada.

Para observar el comportamiento del trazador (insulina- ^{125}I) en su unión con las membranas hepáticas y si esta unión era equiparable a la de la insulina fría se han realizado incubaciones en presencia de concentraciones crecientes de la hormona marcada.

En la fig. 19 puede observarse que en el rango de concentraciones 0'05-5 nM la insulina- ^{125}I y la insulina fría tienen el mismo comportamiento frente a las membranas hepáticas. Con ello puede concluirse que la insulina- ^{125}I conserva íntegra su capacidad de unión a las membranas.

TABLA N° 22

Cantidad de insulina fría y marcada unida a las membranas en presencia de concentraciones crecientes de ambos tipos de hormona. Los valores expresan los fmoles de insulina ligados por mg de proteínas (\bar{X} de triplicados).

	(insulina- ^{125}I) nM					
	0'036	0'05	0'18	0'45	0'9	
fmoles ins./mg prot.	5'4	7'6	25'8	63'9	111	
	(insulina fría) nM					
	0	0'2	0'5	1	2	5
fmoles ins./mg prot.	7'6	37	78	138	264	606

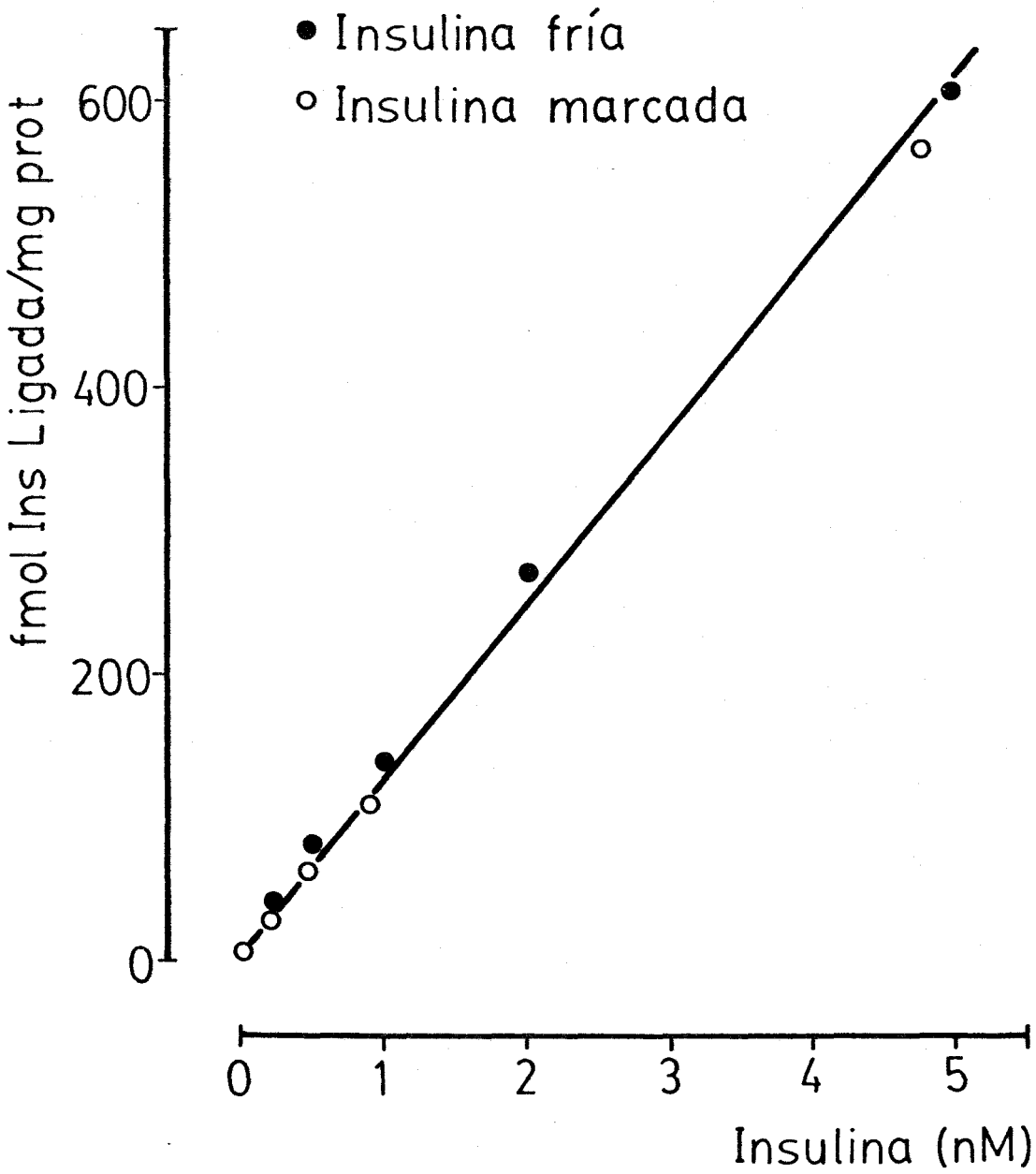


Fig. 19 Relación entre la hormona fría y el trazador en su capacidad para unirse al receptor.

3.8. Estudio de especificidad

Para determinar el grado de especificidad de la unión de insulina a membranas hepáticas, se incubó el trazador en presencia de diversas hormonas. Las hormonas utilizadas son: insulina, glucagón, gastrina, somatomotropina coriónica humana (HCS), gonadotropina coriónica humana (HGH) y hormona liberadora de tirotropa (TRH).

En la tabla 23 puede observarse como la unión de la insulina-¹²⁵I sólo se modifica por la presencia en el medio de incubación de insulina fría, mientras que no cambia en absoluto por la presencia de las demás hormonas estudiadas. Esto indica que la insulina se une a receptores específicos.

TABLA N° 23

Porcentaje de unión máxima del trazador a las membranas en presencia de diversas hormonas (\bar{X} de triplicados).

	% B máxima
Insulina- ¹²⁵ I (0'05 nM)	100 %
Insulina (4 nM)	50 %
Glucagón (1 μ M)	100 %
Gastrina (1'4 nM)	100 %
HCS (7'4 nM)	100 %
HGH (0'4 nM)	100 %
TRH (166 nM)	100 %

4. UNION INSULINA A MEMBRANAS HEPATICAS TRAS PERIODOS VARIABLES DE AYUNO (0,1,2,4 y 6 DIAS).

En este apartado se estudiaron las modificaciones que los distintos periodos de ayuno pueden producir en la unión específica de la insulina a sus receptores de membranas hepáticas. En la exposición de resultados se comentan simultáneamente dos grupos:

1° Grupo control, 1, 2 y 4 días de ayuno.

2° Grupo control y 6 días de ayuno.

4.1. Cinética de asociación

Con el objeto de comprobar si en las distintas condiciones de ayuno se alcanza el equilibrio de la unión insulina-receptor en periodos similares de tiempo se han estudiado las cinéticas de asociación correspondientes.

En las figs. 20 y 21 aparece la unión específica de la insulina marcada a las membranas en función del tiempo de incubación a 30°C expresado en fmoles/mg de prot.

Se alcanzó un equilibrio aparente en todos los casos a los 45 min, que se mantuvo al menos hasta los 90 min.

La unión fué similar en membranas hepáticas de ratas controles o de 1 día de ayuno y aumentó progresivamente tras periodos superiores de privación de alimento.

TABLA N° 24

Cinética de asociación de la insulina a los receptores en membranas hepáticas (0,1,2 y 4 días de ayuno). Expresado en fmol/mg de prot.) (\bar{X} de triplicados).

Tiempo (min)	5	10	30	45	60	90
R ₀	4'8	7'1	8'7	9'0	9'3	9'8
R ₁	5'2	6'5	9'3	10'2	10'7	11'2
R ₂	5'5	7'7	10'3	11'7	12'3	13'6
R ₄	7'6	10'1	14'0	15'0	15'4	16'0

TABLA N° 25

Cinética de asociación de la insulina a los receptores de membranas hepáticas (0 y 6 días de ayuno). Expresado en fmoles/mg de prot. (\bar{X} de triplicados).

Tiempo (min)	5	10	30	45	60	90
R ₀	3'4	5'0	6'2	8'1	8'3	8'7
R ₆	5'6	9'5	11'0	12'5	13'5	13'6

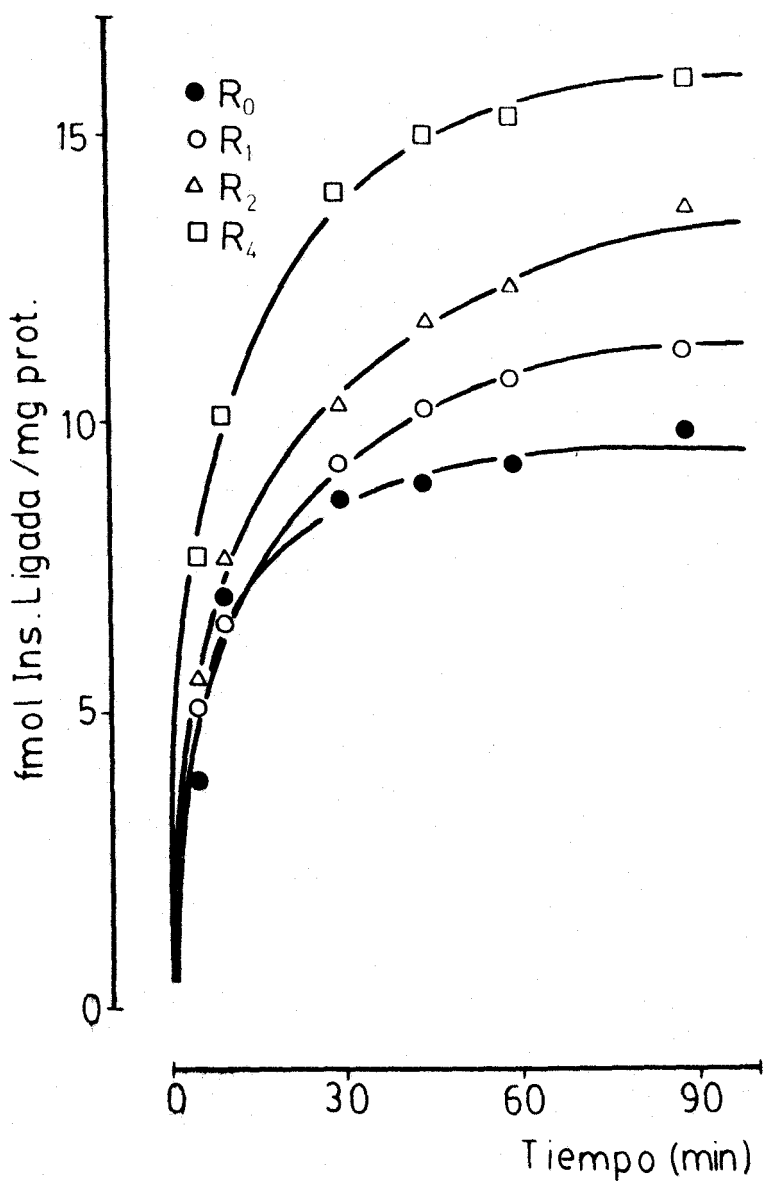


Fig. 20 Cinética de asociación de la insulina-¹²⁵I a membranas hepáticas de ratas controles o sometidas a 1,2 y 4 días de ayuno expresada en fmoles/mg proteína en función del tiempo.

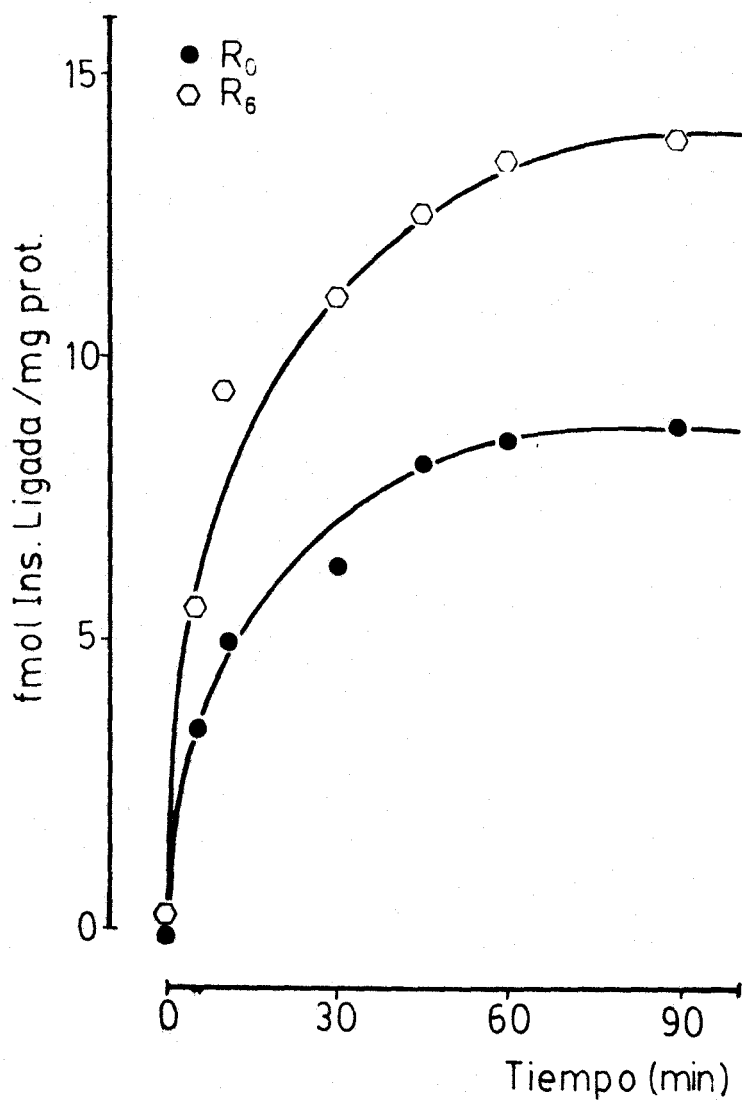


Fig. 21 Cinética de asociación de la insulina-¹²⁵I a membranas hepáticas de ratas controles y sometidas a 6 días de ayuno expresada en fmoles/mg proteína en función del tiempo.

4.2. Degradación de la insulina-¹²⁵I

La degradación o inactivación de la insulina-¹²⁵I se estudió por la pérdida de actividad biológica en cuanto a su capacidad para reasociarse a preparaciones frescas de membranas hepáticas después del periodo habitual de incubación. Fué del orden de 13-16% en todos los casos como puede observarse en la tabla (26).

TABLA N° 26

Degradación de insulina-¹²⁵I estudiada por reasociación a membranas hepáticas frescas, expresado como porcentaje de controles sin incubación previa (\bar{X} de triplicados).

	R ₀	R ₁	R ₂	R ₄	R ₆
Degradación	14'2	14'1	16'7	13'7	15'7

4.3. Degradación de los receptores

La degradación de los receptores estudiada preincubando las membranas en ausencia de hormona, depende del tiempo de incubaciones siendo a los 30 min de alrededor de 15% en todas las preparaciones de membrana (tabla 27) y del 25% a los 60 min de incubación.

TABLA N° 27

Porcentaje de degradación de receptores incubando 30 y 60 min, tras 60 min de preincubación. (\bar{X} de triplicados).

Tiempo (min)	30	60
R ₀	12'8	23'5
R ₂	16'9	25'1
R ₄	12'2	19'0
R ₆	17'8	24'6

4.4. Cinética de disociación

La disociación del complejo insulina-¹²⁵I receptor se estudió, tras alcanzar el equilibrio aparente, mediante la adición de un exceso (1 μ M) de insulina fría. Se trató, por lo tanto, de una dilución isotópica en la que se impedía que el trazador disociado se volviera a unir al receptor. Como se observa en las figs. 22,23 y en las tablas 28,29 , la cinética de disociación fué similar en todos los tipos de membranas (0,1,2,4 y 6 días de ayuno), alcanzándose el 50% de la unión inicial ($t_{1/2}$) a los 9-10 min. Cuando el porcentaje de unión (B%) se expresa en una escala logarítmica, no se obtiene una recta, por lo que puede afirmarse que el proceso no sigue una cinética de primer orden. De todos modos, como se indicó anteriormente, dado que los receptores de insulina presentan interacciones sitio-sitio del tipo de cooperatividad negativa es irrelevante la deducción de velocidades de disociación a partir de los datos experimentales, por lo que solo es válida la comparación cualitativa realizada que demuestra la identidad de comportamiento entre todas las preparaciones de membrana.

TABLA N° 28

Cinética de disociación del complejo insulina-receptor de ratas sometidas a 0,1,2 y 4 días de ayuno. Se expresa el porcentaje (B%) en función del tiempo transcurrido desde la adición de un exceso de insulina fría (\bar{X} triplicados).

Tiempo (min)	0	5	10	30	60
R ₀	4'4	2'7	2'3	1'1	1'1
R ₁	4'5	2'8	2'3	1'1	1'1
R ₂	4'6	3'8	2'3	1'3	1'2
R ₄	5'4	4'4	2'5	1'6	1'4

TABLA N° 29

Cinética de la disociación del complejo insulina-receptor de membranas hepáticas de ratas sometidas a 0 y 6 días de ayuno. Se expresa el porcentaje (%B) en función del tiempo transcurrido desde la adición de un exceso de insulina fría. (\bar{X} triplicados).

Tiempo (min)	0	5	10	30	60
R ₀	4'0	2'5	1'7	1'2	1'1
R ₆	4'5	3'1	1'9	1'4	1'2

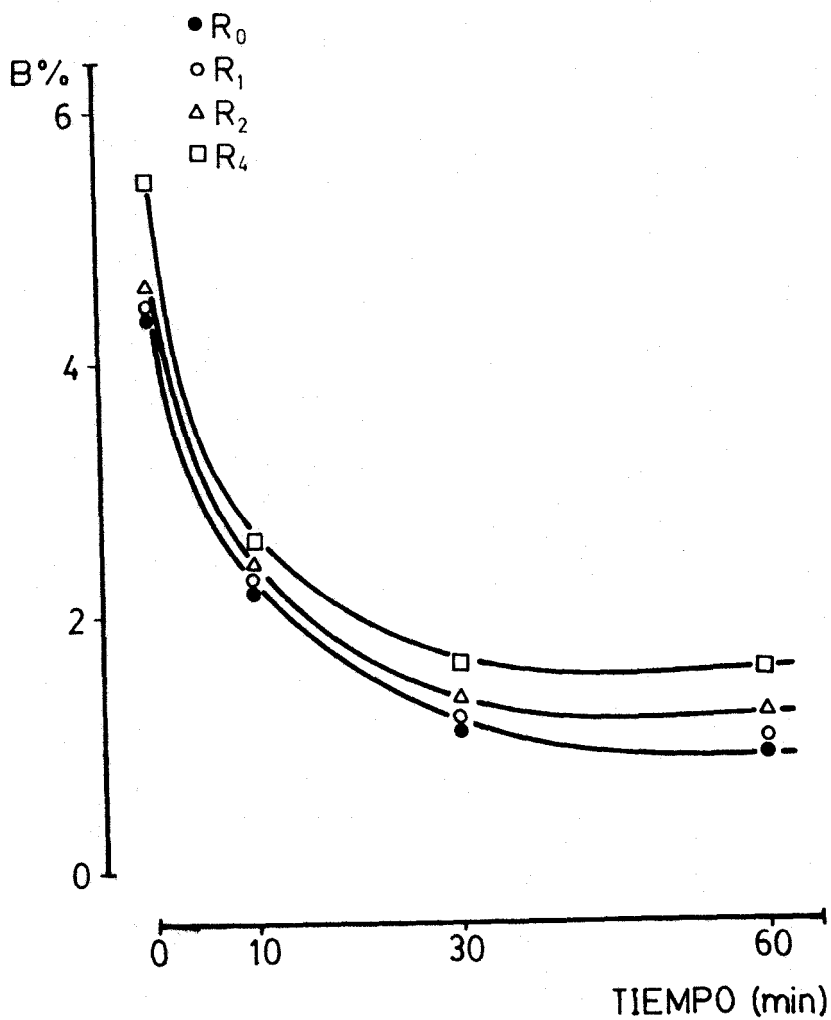


Fig. 22 Cinética de disociación de la insulina-¹²⁵I a membranas hepáticas de ratas controles o sometidas a 1, 2 y 4 días de ayuno expresada en porcentaje de unión (B%) en función del tiempo transcurrido desde la adición de un exceso de insulina fría (1 μ M).

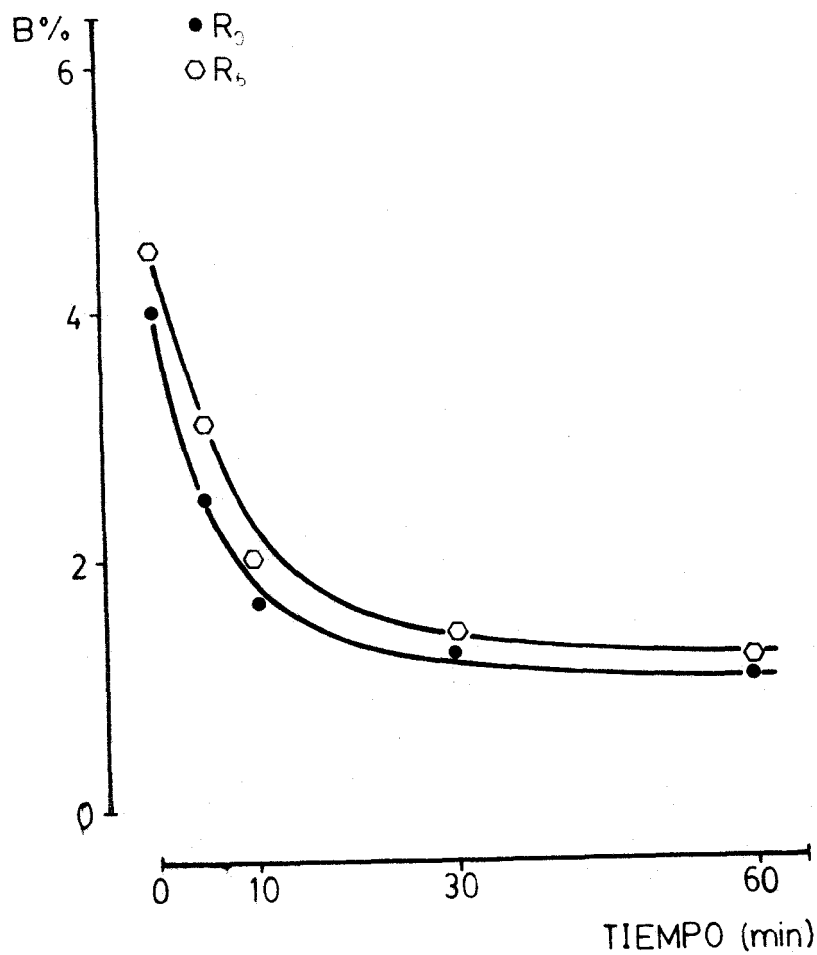


Fig. 23 Cinética de disociación de la insulina ^{125}I a membranas hepáticas de ratas controles o sometidas a 6 días de ayuno expresada en porcentaje de unión (B%) en función del tiempo transcurrido desde la adición de un exceso de insulina fría ($1 \mu\text{M}$).

4.5. Estequiometría de la unión insulina-receptor.

Se han realizado incubaciones de membranas hepáticas de ratas controles o sometidas a 1,2,4 y 6 días de ayuno con insulina- ^{125}I y concentraciones crecientes de insulina fría.

En las figs. 24 y 25 y tablas 30,31 puede observarse como en presencia de concentraciones crecientes de insulina fría se va desplazando la insulina- ^{125}I de los receptores, siendo el patrón de desplazamiento análogo en todos los casos (0,1,2,4 y 6 días de ayuno). De estas gráficas puede deducirse de una forma aproximada la afinidad global aparente. En las tablas 32,33 recoge el valor de K_d que corresponde a la concentración de insulina fría, que desplaza el 50% del trazador unido a los receptores en ausencia de ésta, y que es similar en todos los casos estudiados (4-5 nM).

Expresando los resultados como fentomoles de insulina ligada por mg de proteína de membrana (figs. 26 y 27 tablas 34,35) se observa un aumento de la unión de insulina a receptores tras 2 y 4 días de ayuno en el primer grupo y tras 6 días de ayuno en el 2º grupo con respecto a sus controles, pero no tras cortos periodos de ayuno (1 día). Los valores de $S_{0,5}$ o concentraciones de insulina a la cual se ocupan la mitad de los receptores aparecen en las tablas 36 y 37.

TABLA N° 30

Unión de la insulina al receptor (membranas hepáticas de ratas controles y sometidas a 1,2 y 4 días de ayuno) en presencia de concentraciones crecientes de insulina fría, expresado en B% (porcentaje de unión) $\bar{X} \pm ESM$.

Insulina										
fría nM	0	0'2	0'5	1	2	5	10	20	50	
R ₀	6'0 \pm 0'5	5'0 \pm 0'4	4'4 \pm 0'5	3'9 \pm 0'3	3'5 \pm 0'4	2'9 \pm 0'4	2'2 \pm 0'3	1'8 \pm 0'4	0'9 \pm 0'1	
R ₁	6'6 \pm 0'3	5'7 \pm 0'3	5'0 \pm 0'3	4'2 \pm 0'2	3'5 \pm 0'3	2'9 \pm 0'2	2'2 \pm 0'2	1'7 \pm 0'2	0'9 \pm 0'1	
R ₂	7'6 \pm 0'2	6'7 \pm 0'4	5'9 \pm 0'4	5'2 \pm 0'3	4'6 \pm 0'4	3'6 \pm 0'4	2'8 \pm 0'4	1'9 \pm 0'1	1'1 \pm 0'1	
R ₄	8'8 \pm 0'2	7'5 \pm 0'1	6'9 \pm 0'1	6'0 \pm 0'3	5'3 \pm 0'2	4'2 \pm 0'3	3'1 \pm 0'4	2'4 \pm 0'3	1'3 \pm 0'1	

TABLA N° 31

Unión de la insulina al receptor (membranas hepáticas de ratas controles y sometidas a 6 días de ayuno) en presencia de concentraciones crecientes de insulina fría expresado en B% (porcentaje de unión) $\bar{X} \pm \text{ESM}$

Insulina fría nM	0	0'2	0'5	1	2	5	10	20	50
R ₀	4'9 \pm 0'5	4'0 \pm 0'5	3'6 \pm 0'5	3'4 \pm 0'3	2'8 \pm 0'2	2'3 \pm 0'5	1'8 \pm 0'2	1'3 \pm 0'2	0'8 \pm 0'1
R ₆	6'9 \pm 0'3	6'2 \pm 0'2	5'5 \pm 0'4	4'9 \pm 0'2	4'4 \pm 0'3	3'6 \pm 0'6	2'8 \pm 0'3	1'9 \pm 0'2	1'1 \pm 0'1

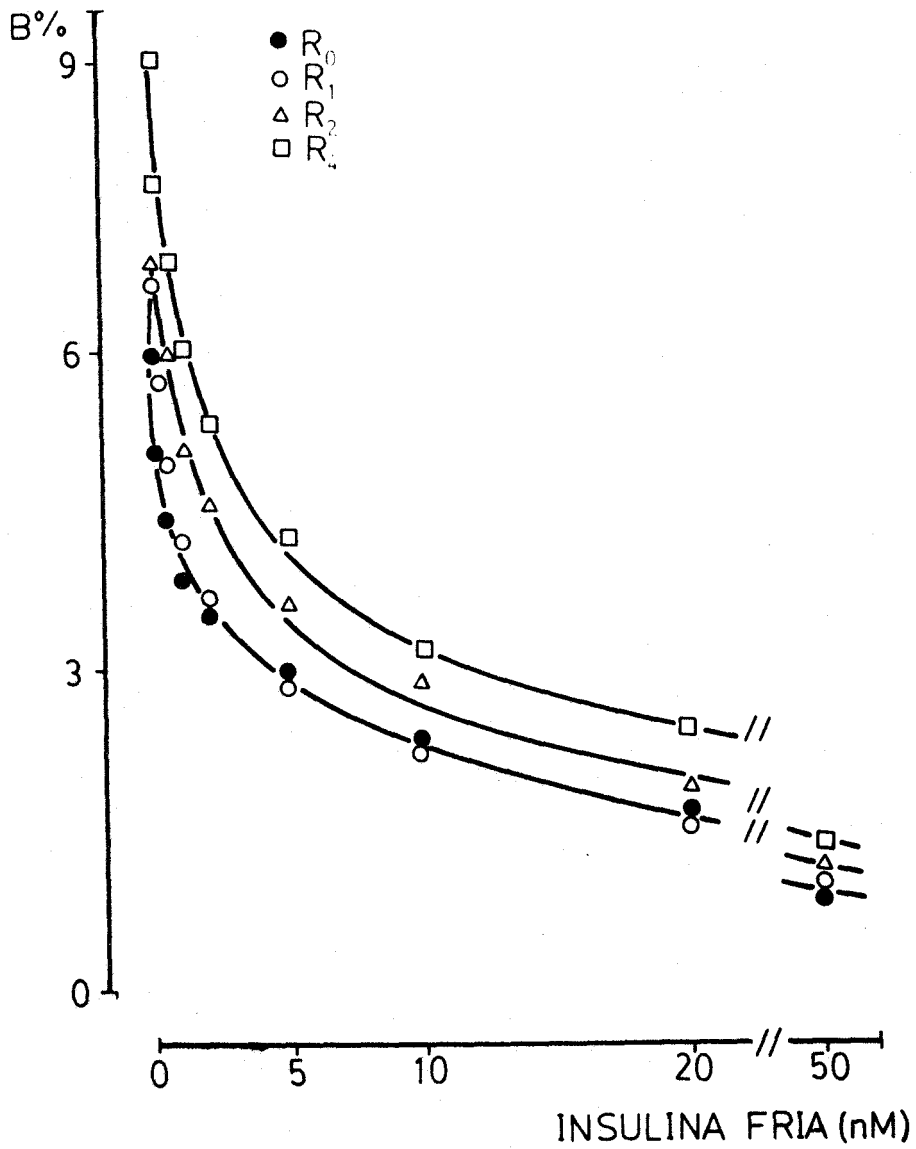


Fig. 24 Desplazamiento de la insulina ^{125}I unida a membranas hepáticas de ratas sometidas a 0, 1, 2 y 4 días de ayuno en presencia de concentraciones crecientes de insulina fría.

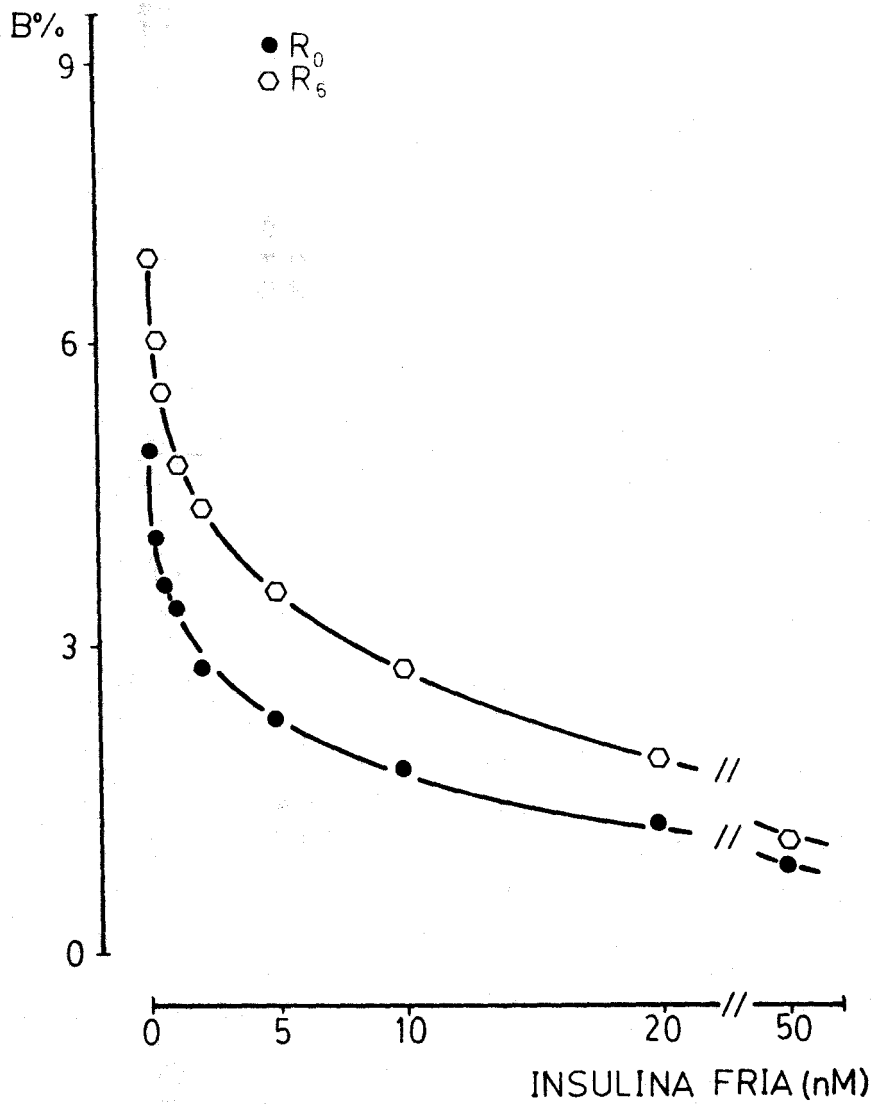


Fig. 25 Desplazamiento de la insulina ^{125}I unida a membranas hepáticas de ratas sometidas a 0 y 6 días de ayuno en presencia de concentraciones crecientes de insulina fría.

TABLA N° 32

Constante de disociación global (Kd) de membranas hepáticas controles, 1, 2 y 4 días de ayuno, expresado en mol/l.

	R_0	R_1	R_2	R_4
Kd	$4'1 \times 10^{-9}$	$3'9 \times 10^{-9}$	$4'4 \times 10^{-9}$	$4'1 \times 10^{-9}$

TABLA N° 33

Constante de disociación global (Kd) de membranas hepáticas controles y 6 días de ayuno, expresado en mol/l.

	R_0	R_6
Kd	4×10^{-9}	5×10^{-9}

TABLA N° 34

Unión de la insulina al receptor de membranas hepáticas de ratas sometidas a 0,1,2 y 4 días de ayuno con concentraciones crecientes de insulina fría expresado en fmoles/mg de proteínas. n=3

Insulina fría nM		0	0'2	0'5	1	2	5	10	20	50
	\bar{X}	9'9	41'9	81'2	135'5	240'6	491'0	747'4	1196'9	1569'0
R_0	ESM	0'8	3'5	8'8	10'8	25'2	60'6	97'1	254'0	183'6
	\bar{X}	11'1	47'7	91'3	148'8	239'9	483'3	750'8	1123'3	1585'7
R_1	ESM	0'4	2'2	5'5	7'0	22'5	30'3	60'3	140'4	200'3
	\bar{X}	12'7	55'6	108'9	181'0	312'4	613'3	955'2	1243'7	1902'0
R_2	ESM	0'3	3'0	7'3	11'9	28'0	60'6	147'4	73'5	87'5
	\bar{X}	14'6	62'9	126'3	209'0	360'3	575'6	1045'0	1611'0	2169'0
R_4	ESM	0'3	0'3	1'4	10'8	13'6	58'9	120'6	151'0	183'6

TABLA N° 35

Unión de la insulina al receptor de membranas hepáticas de ratas sometidas a 0 y 6 días de ayuno con concentraciones crecientes de insulina fría expresado en fmoles/mg de proteína. n = 4

Insulina										
fría nM		0	0'2	0'5	1	2	5	10	20	50
R ₀	\bar{X}	8'21	33'6	66'8	110'8	194'2	394'1	603'3	907'4	1368'7
	ESM	0'8	4'3	9'2	12'4	20'8	31'7	58'2	156'4	117'5
R ₆	\bar{X}	11'5	51'6	101'4	173'3	301'8	602'9	938'5	1300'6	1919'5
	ESM	0'5	1'7	7'3	7'0	20'5	101'0	100'5	133'7	166'9

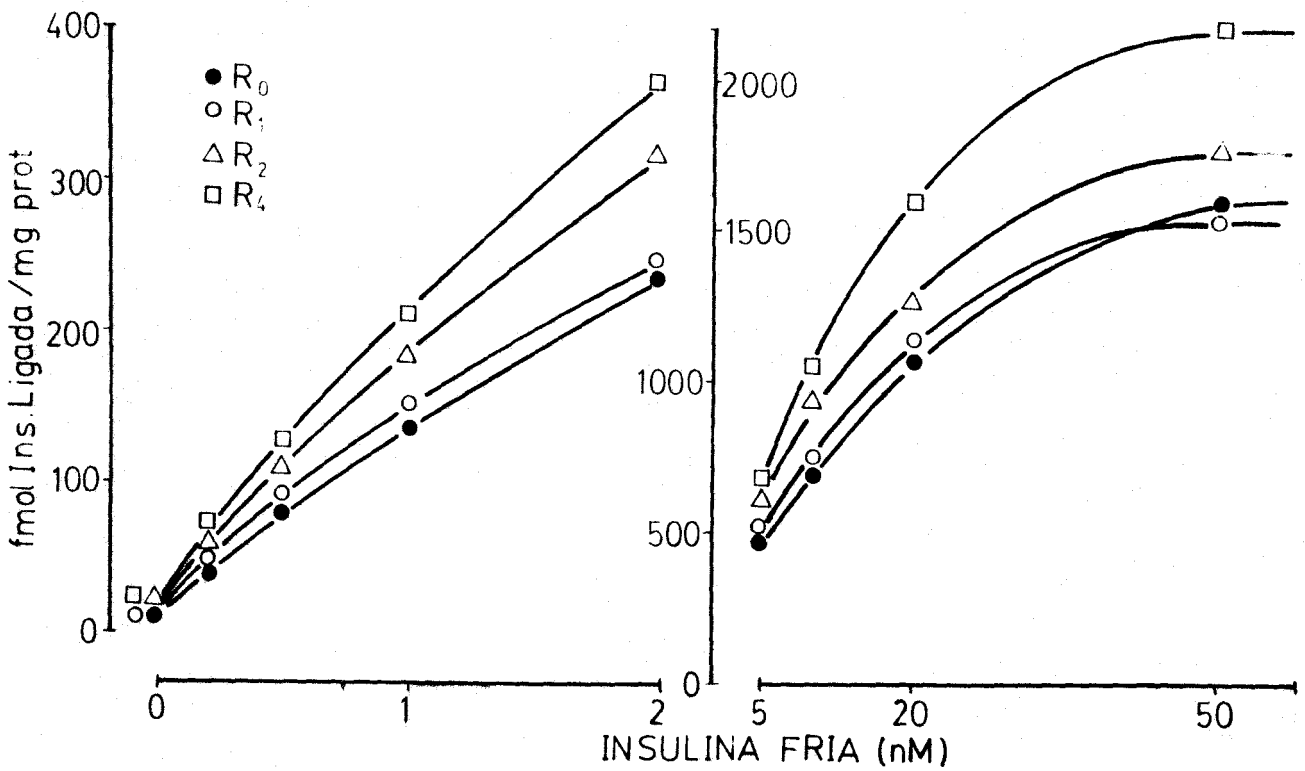


Fig. 26 Dosis-efecto; unión de insulina a membranas hepáticas de ratas sometidas a 0,1,2 y 4 días de ayuno expresado en fentomoles/mg de proteínas en función de la concentración de insulina fría (nM).

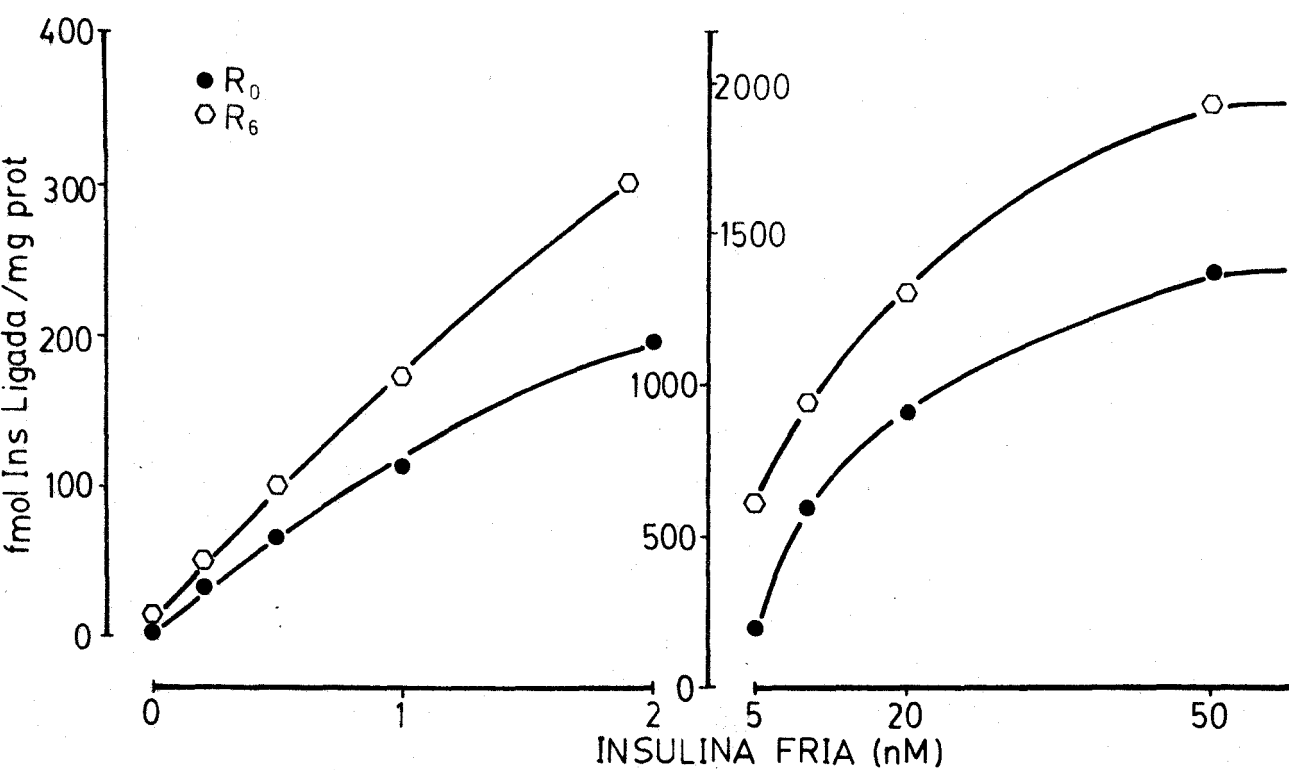


Fig. 27 Dosis-efecto: unión de insulina a membranas hepáticas de ratas sometidas a 0 y 6 días de ayuno expresado en fentomoles/ mg proteína en función de la concentración de insulina fría (nM).

TABLA N° 36

Concentración de insulina a la cual se ocupan la mitad de los receptores ($S_{0,5}$) de membranas hepáticas de ratas sometidas a 1, 2 y 4 días de ayuno expresado en moles/l.

	R_0	R_1	R_2	R_4
$S_{0,5}$	$8'2 \times 10^{-9}$	$8'4 \times 10^{-9}$	$10'3 \times 10^{-9}$	$11'0 \times 10^{-9}$

TABLA N° 37

Concentración de insulina a la cual se ocupan la mitad de los receptores ($S_{0,5}$) de membranas hepáticas de ratas controles y sometidas a 6 días de ayuno expresado en moles/l.

	R_0	R_6
$S_{0,5}$	10'5	11'2

4.5.1. Representación de Scatchard

Interpretando los resultados anteriores según el método de Scatchard (1949) (figs. 28,29) aparece para todas las preparaciones de membrana (controles, 1,2,4 y 6 días de ayuno) el mismo tipo de patrón curvilíneo, lo que podría indicar la existencia de dos poblaciones de receptores: una de alta afinidad con un número bajo de receptores y otra de baja afinidad con un número mayor de receptores. La constante de afinidad de cada clase de receptor no se modifica por el ayuno, como se observa en las tablas (38 y 39) no habiendo en ninguno de los casos diferencias significativas.

En cuanto a la concentración de los receptores no hay diferencias entre membranas de ratas controles o sometidas a 1 día de ayuno (tablas 40 y 41). Tras 2 días de ayuno, en cambio, aumenta la concentración total de los receptores, así como los de alta y baja afinidad considerados por separado. Tras periodos de ayuno más largos (4 y 6 días) el incremento del número de receptores es aún mayor.

Estos resultados indican, por lo tanto, que el ayuno da lugar a un aumento progresivo de la unión de insulina a membranas hepáticas que se debe a un incremento del número de receptores de membrana sin que se modifique la afinidad.

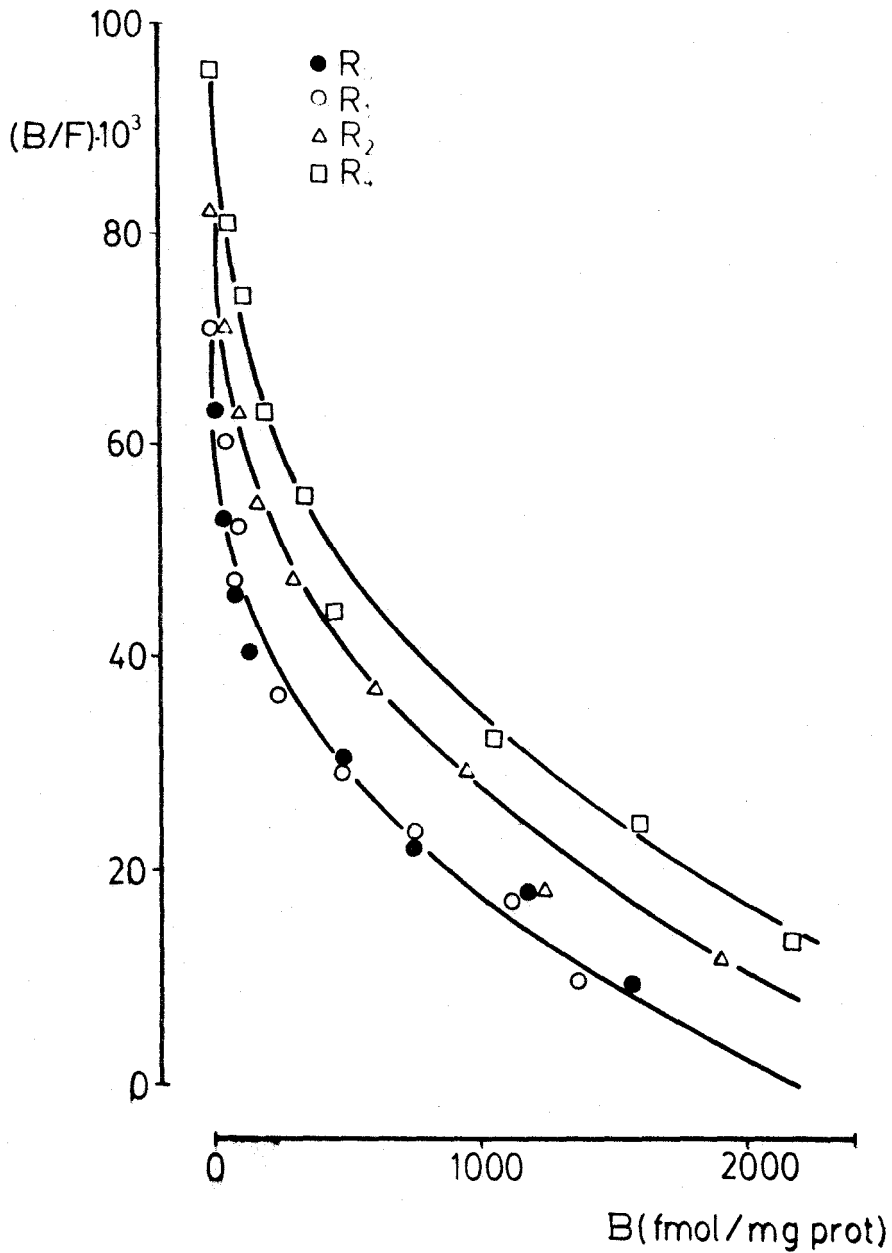


Fig. 28 Representación de Scatchard. Cociente de los porcentajes de trazador unido y libre en función de la hormona unida total para membranas hepáticas de ratas sometidas a 0,1,2 y 4 días de ayuno.

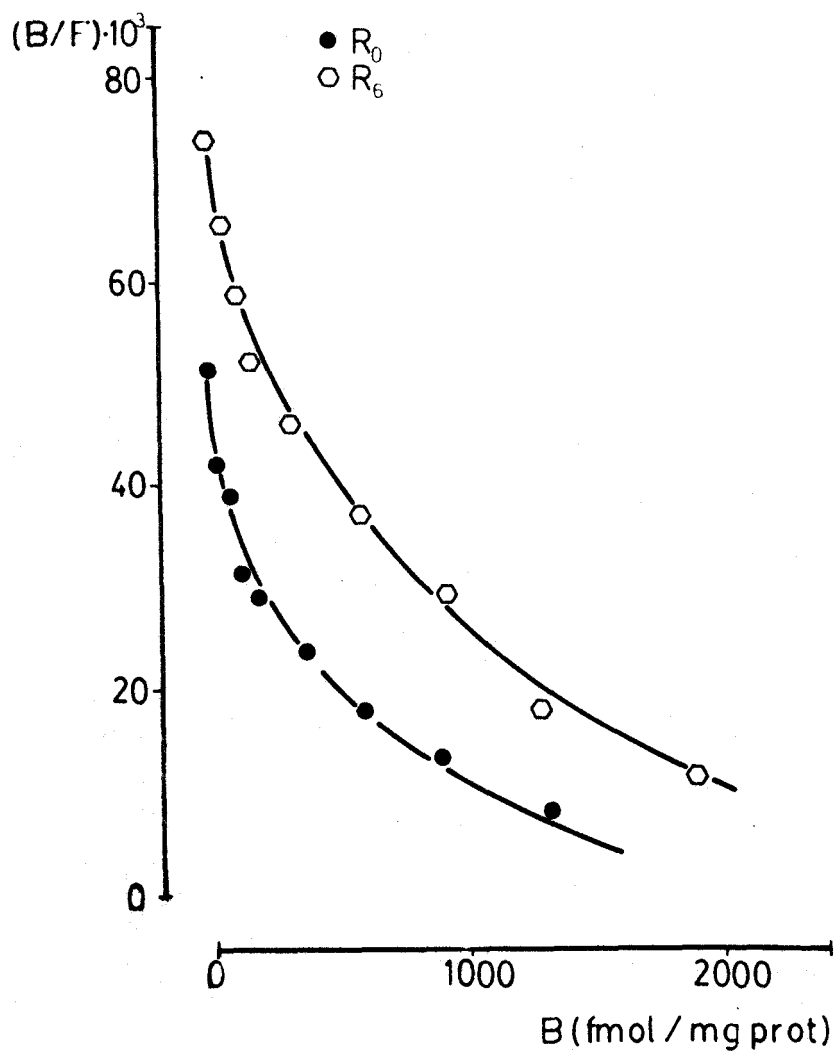


Fig. 29 Representación de Scatchard. Cociente de los porcentajes de trazador unido y libre en función de la hormona unida total para membranas hepáticas de ratas sometidas a 0 y 6 días de ayuno.

TABLA N° 38

Afinidad de los receptores de insulina en membranas hepáticas de ratas sometidas a 0,1,2 y 4 días de ayuno, expresado por la constante de disociación (K_D , M). $\bar{X} \pm ESM$

Receptor	R_0	R_1	R_2	R_4
Alta afinidad	$(1'2 \pm 0'1) \times 10^{-9}$	$(1'3 \pm 0'1) \times 10^{-9}$	$(1'3 \pm 0'2) \times 10^{-9}$	$(1'2 \pm 0'2) \times 10^{-9}$
		N.S.	N.S.	N.S.
Baja afinidad	$(2'2 \pm 0'4) \times 10^{-8}$	$(2'1 \pm 0'1) \times 10^{-8}$	$(2'2 \pm 0'2) \times 10^{-8}$	$(2'4 \pm 0'5) \times 10^{-8}$

TABLA N° 39

Afinidad de los receptores de insulina en membranas hepáticas de ratas sometidas a 0 y 6 días de ayuno, expresado por la constante de disociación (K_D , M). $\bar{X} \pm ESM$

Receptor	R_0	R_6
Alta afinidad	$(1'3 \pm 0'1) \times 10^{-9}$	$(1'4 \pm 0'1) \times 10^{-9}$
Baja afinidad	$(4'0 \pm 0'1) \times 10^{-8}$	$(4'3 \pm 0'3) \times 10^{-8}$
		N.S.

TABLA N° 40

Número de receptores de insulina en membranas hepáticas de ratas sometidas a 0,1,2 y 4 días de ayuno, expresado en fmol/mg de proteína. \bar{X} _ ESM p vs R₀

Receptor	R ₀	R ₁	R ₂	R ₄
Total	2216 ± 72'2	2230 ± 169'8 N.S.	2710 ± 130'9 p < 0'01	3351 ± 72'1 p < 0'0005
Alta afinidad	260 ± 12'7	320 ± 12'7 N.S.	360 ± 48'1 p < 0'005	400 ± 54'8 p < 0'0025
Baja afinidad	1956 ± 59'1	1910 ± 59'1 N.S.	2250 ± 116'2 p < 0'05	2951 ± 22'0 p < 0'0005

TABLA N° 41

Número de receptores de insulina en membranas hepáticas de ratas sometidas a 0 y 6 días de ayuno, expresado en fmol/mg de proteína. $\bar{X} \pm \text{ESM}$ p vs R_0

Receptor	R_0	R_6
Total	2260 \pm 62'4	3340 \pm 66'2 p < 0'0005 n = 4
Alta afinidad	220 \pm 9'7	460 \pm 18'9 p < 0'0005 n = 4
Baja afinidad	2040 \pm 52'6	2880 \pm 47'3 p < 0'0005

4.5.2. Representación de Hill: grado de cooperatividad negativa.
Representación de De Meyts.

La hipótesis de dos sitios de unión (alta y baja afinidad) asume que estos son independientes, lo que no es totalmente cierto dada la existencia de cooperatividad negativa entre los receptores. De todos modos, es válido el razonamiento en orden a comparar las distintas preparaciones de membrana, aún teniendo en cuenta que los datos de número de receptores y K_d son solo aproximaciones. En cualquier caso, el número absoluto de receptores es un parámetro real y queda demostrado su aumento progresivo durante el ayuno.

Debe tenerse en cuenta también, apoyando lo dicho anteriormente, que el grado de cooperatividad negativa fue similar en todas las membranas estudiadas, como se comprobó mediante representaciones gráficas de Hill (1913) que aparecen en las figs. (30) y (31). El índice obtenido fue del orden de 0'92-0'93 en todos los casos. Al ser inferior a la unidad, indica interacciones sitio-sitio de tipo negativo.

Con el objeto de observar como se modificaba la afinidad de los receptores a medida que el grado de ocupación por insulina aumentaba, se realizaron perfiles de afinidad según De Meyts (1976), que fueron similares en todas las preparaciones de membrana (figs. 32,33). La constante

de disociación de los receptores vacíos fué $K_e = 0'15-0'16$ nM y la de los receptores saturados $0'09$ nM en todos los casos (tablas 42 y 43).

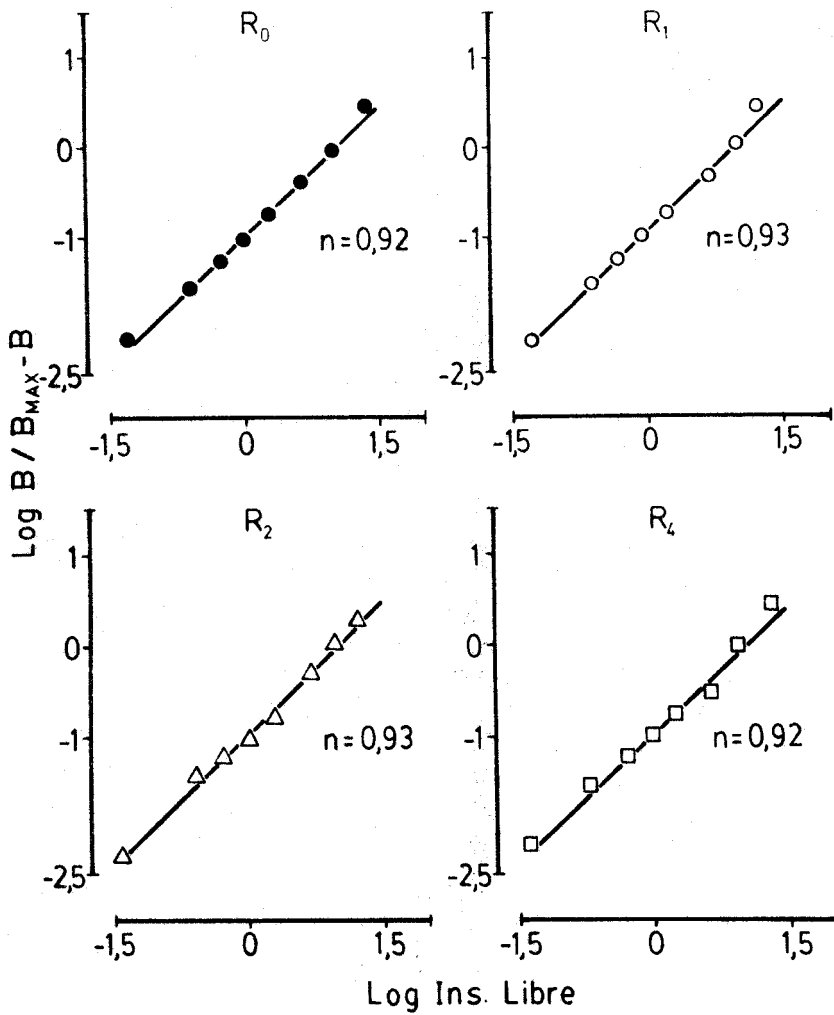


Fig. 30 Representación de Hill para membranas hepáticas de ratas sometidas a 0,1,2 y 4 días de ayuno.

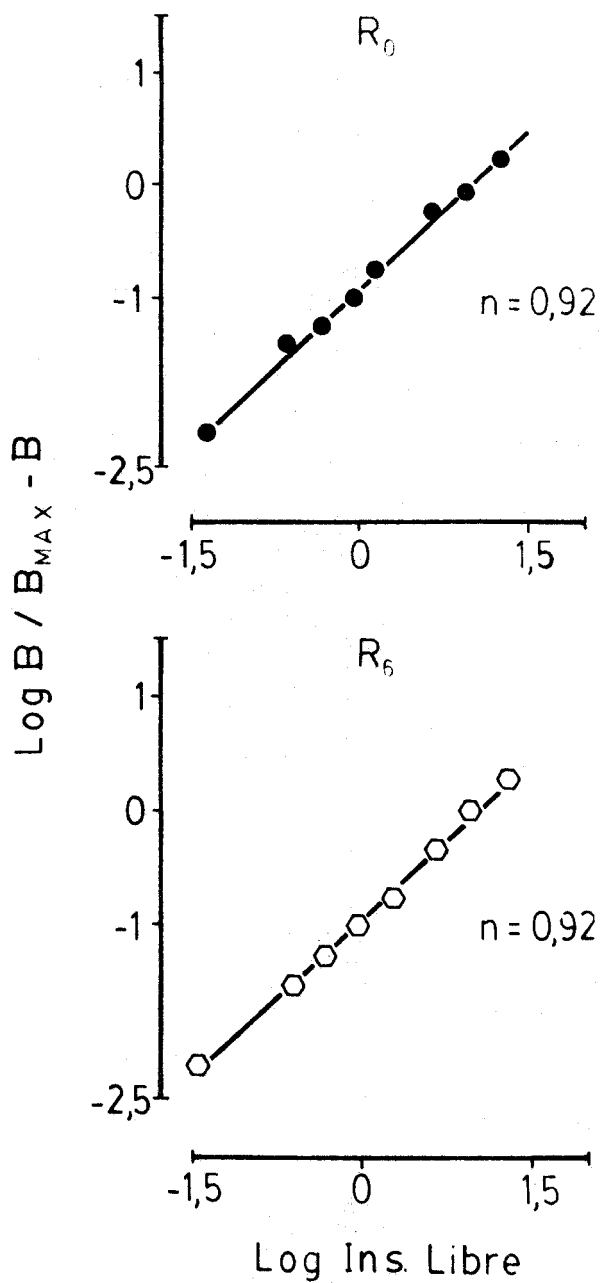


Fig. 31 Representación de Hill para membranas hepáticas de ratas sometidas a 0 y 6 días de ayuno.

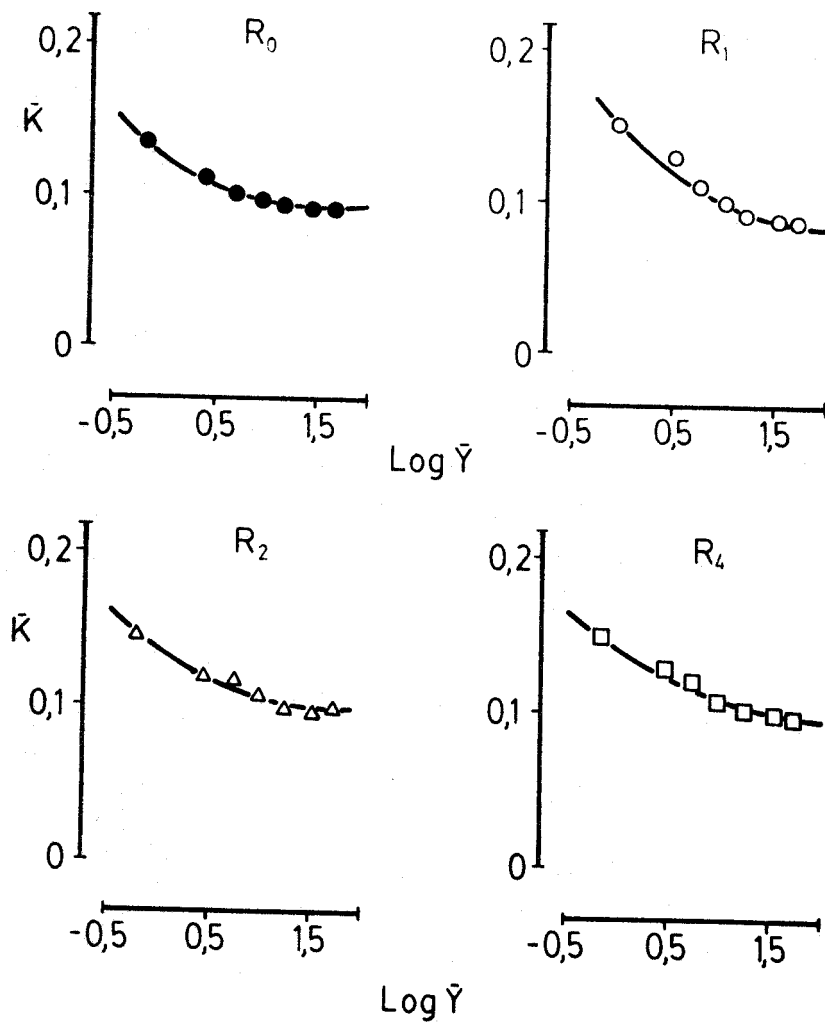


Fig. 32 Perfil de afinidad de De Meyts (membranas hepáticas de ratas sometidas a 0,1,2 y 4 días de ayuno)..

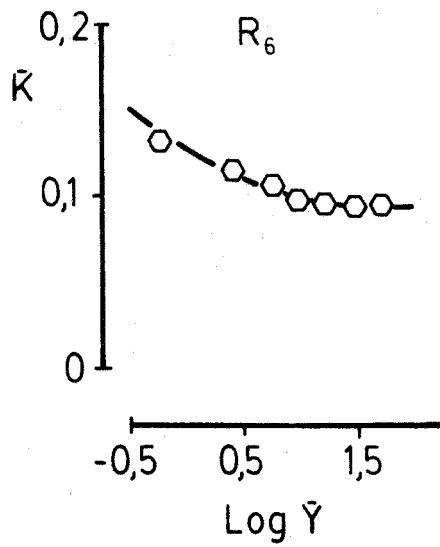
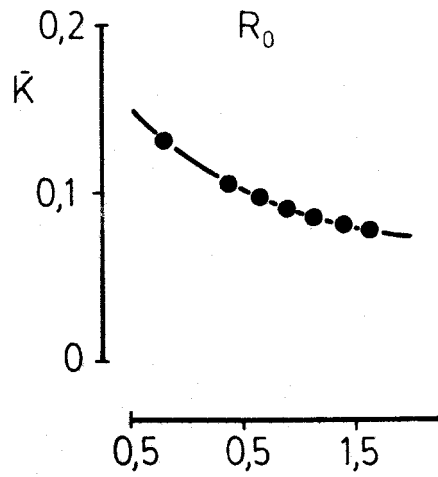


Fig. 33 Perfil de afinidad de De Meyts (membranas hepáticas de ratas sometidas a 0 y 6 días de ayuno).

TABLA N° 42

Valores de las constantes de afinidad para una ocupación nula (K_e) y para una ocupación total (K_f) de membranas hepáticas de ratas sometidas a 0, 1, 2 y 4 días de ayuno, expresado en moles/l.

	R_0	R_1	R_2	R_4
K_e	0'14	0'16	0'15	0'15
K_f	0'09	0'09	0'09	0'09

TABLA N° 43

Valores de las constantes de afinidad para una ocupación nula (K_e) y para una ocupación total (K_f) de membranas hepáticas de ratas controles y 6 días de ayuno, expresado en moles.

	R_0	R_6
K_e	0'15	0'16
K_f	0'09	0'09

5. UNION INSULINA-MEMBRANAS HEPATICAS TRAS REALIMENTACION

Dado que tras 4 y 6 días de ayuno el número de receptores aumenta considerablemente, hemos estudiado si este incremento remitía tras la realimentación. Para ello se han realizado dos grupos de experiencias.

1° Membranas hepáticas de ratas sometidas a 4 días de ayuno y 4 días de ayuno más dos de realimentación con dieta standard (la misma dieta con la cual han estado alimentadas los controles).

2° Membranas hepáticas de ratas sometidas a 6 días de ayuno, 6 días de ayuno más dos de realimentación con dieta standard y 6 días de ayuno más dos de realimentación con glucosa oral al 40%.

Con estos dos grupos se ha realizado un estudio estequiométrico con el mismo tratamiento de los resultados que en las ratas sometidas a ayuno.

El desplazamiento de la insulina ¹²⁵I por la insulina fría fué paralelo en todos los casos (figs.34,35) obteniendo valores similares de Kd global en el rango nM como se ve en la tabla (44).

TABLA N° 44

Unión de la insulina al receptor de membranas hepáticas de ratas sometidas a 4 días de ayuno y 4 días de ayuno más dos de realimentación con dieta standard, con concentraciones crecientes de insulina fría expresado en B% (porcentaje de unión) n=2.

Ins. fría	0	0'2	0'5	1	2	5	10	20	50
R_4 \bar{X}	6'7	6'0	5'6	5'0	4'4	3'5	2'5	1'9	1'1
ESM	0'5	0'1	0'4	0'1	0'1	0'3	0'3	0'1	0'1
R_{4+2} \bar{X}	4'9	4'6	4'4	4'0	3'7	2'8	2'1	1'5	0'8
ESM	0'5	0'5	0'3	0'1	0'1	0'1	0'5	0'1	0'1

TABLA N° 45

Valores de la unión de la insulina al receptor (membranas hepáticas de ratas sometidas a 6 días de ayuno, 6 días de ayuno más dos de realimentación con sieta standard y 6 días de ayuno más dos de realimentación con glucosa) con concentraciones crecientes de insulina fría expresado en B% (porcentaje de unión) $n = 2$.

Ins. fría	0	0'2	0'5	1	2	5	10	20	50
R_0 \bar{X}	6'8	6'2	6'1	5'3	4'9	3'8	2'7	2'1	1'3
ESM	0'1	0'2	0'2	0'1	0'3	0'3	0'2	0'2	0'1
R_{6+2} \bar{X}	4'2	3'7	3'6	3'3	3'1	2'4	1'9	1'2	0'8
ESM	0'2	0'2	0'1	0'1	0'3	0'2	0'1	0'1	0'1
$R_{6+2 G}$ \bar{X}	4'6	4'4	4'3	4'0	3'7	2'8	2'1	1'6	0'9
ESM									

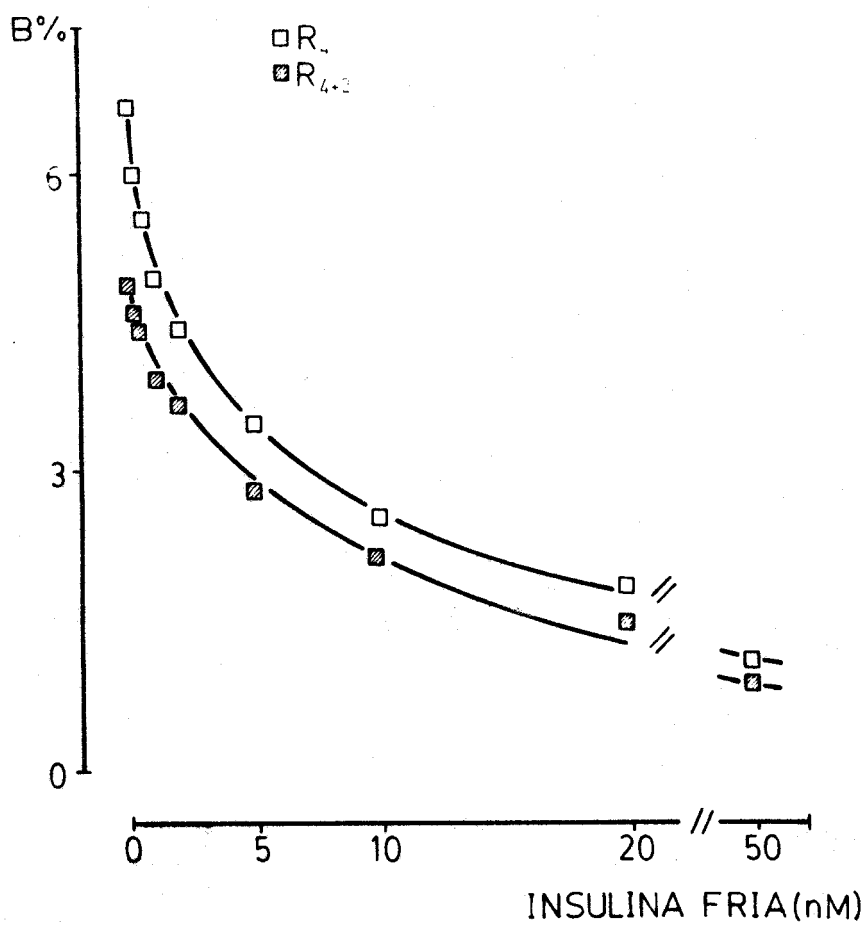


Fig. 34 Desplazamiento de la insulina ^{125}I unida a membranas hepáticas de ratas sometidas a 4 días de ayuno y 4 días de ayuno más 2 de realimentación por concentraciones crecientes de insulina fría.

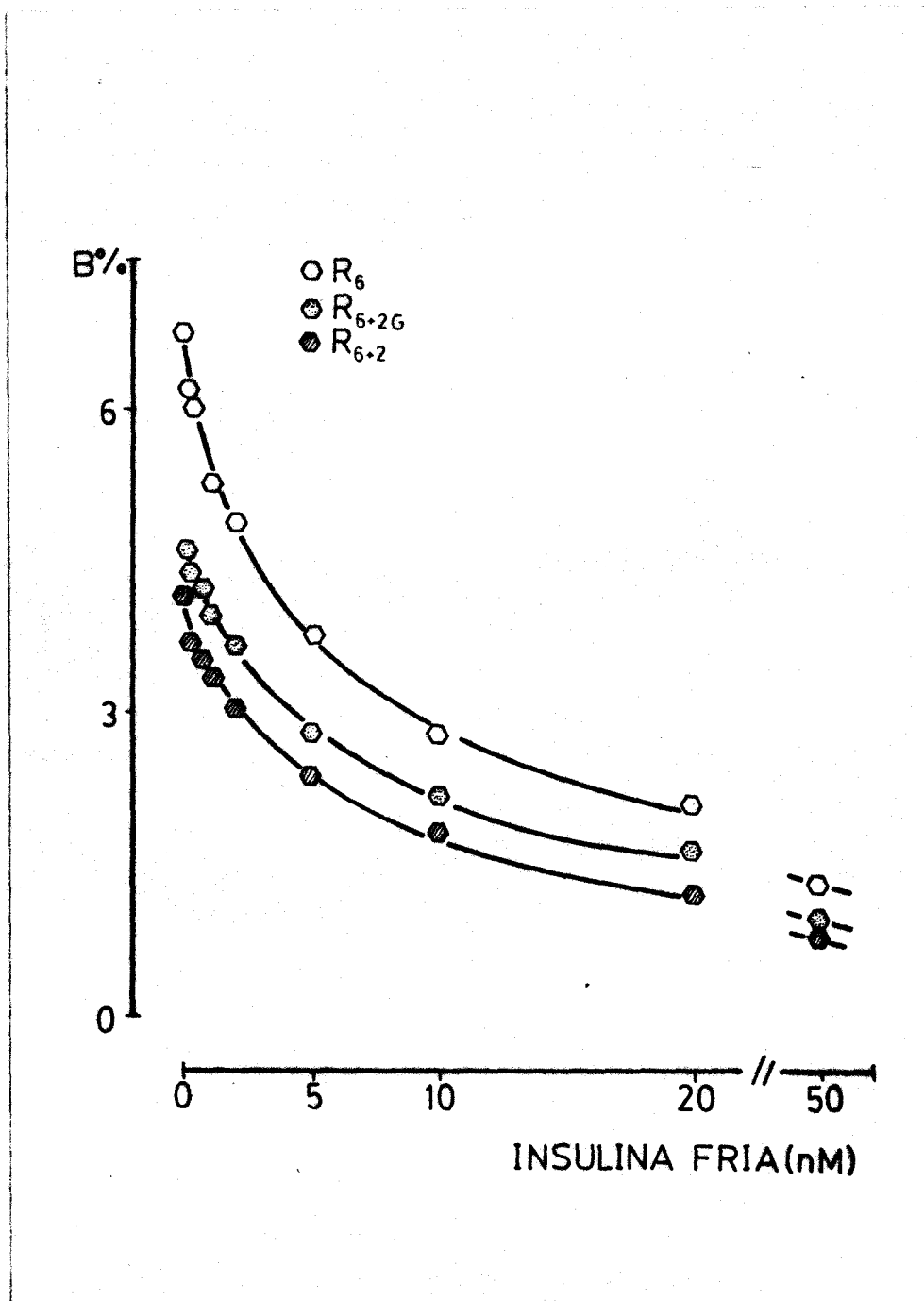


Fig. 35 Desplazamiento de la insulina ^{125}I unida a membranas hepáticas de ratas sometidas a 6 días de ayuno, 6 días de ayuno más 2 de realimentación con glucosa o dieta standard.

TABLA N° 44

Constante de disociación global (Kd) de membranas hepáticas de ratas sometidas a 4 días de ayuno y 4 días de ayuno más dos de realimentación con dieta standard expresado en nmoles/l.

	R_4	R_{4+2}	
Kd, nM	5'4	7'2	
	R_6	R_{6+2}	$R_{6+2} G$
Kd, nM	6'4	5'8	8'6

TABLA N° 45

Unión de la insulina a membranas hepáticas de ratas sometidas a 4 días de ayuno y 4 días de ayuno más 2 de realimentación con dieta standard, incubadas con concentraciones crecientes de insulina fría expresado en fmoles/mg de proteína. n 2

Ins. fría	0	0'2	0'5	1	2	5	10	20	50	
R ₀	\bar{X}	11'1	49'9	102'9	173'7	303'5	591'1	854'7	1243'7	1786'0
	ESM	0'9	0'5	6'7	3'5	0'5	51'2	123'2	108'2	118'1
R ₄₊₂	\bar{X}	8'1	38'3	81'4	138'7	250'9	474'9	717'2	1029'7	1385'0
	ESM	0'9	3'9	5'6	5'2	0'1	10'7	161'1	84'4	130'1

TABLA N° 46

Valores de la unión de la insulina al receptor (membranas hepáticas de ratas sometidas a 6 días de ayuno, 6 días de ayuno más dos de realimentación con dieta standard y 6 días de ayuno más dos de realimentación con glucosa) con concentraciones crecientes de insulina fría expresado en fmoles/mg de proteína.

Ins. fría	0	0'2	0'5	1	2	5	10	20	50	
R ₆	\bar{X}	11'3	51'8	111'9	184'5	334'3	640'0	921'7	1424'3	2169'9
	ESM	0'2	0'6	1'4	3'5	23'2	47'6	78'2	160'5	153'4
R ₆₊₂	\bar{X}	6'9	30'8	65'3	117'3	208'5	399'1	623'4	815'8	1418'0
	ESM	0'4	1'5	1'8	4'9	20'8	24'3	49'5	42'4	212'1
R _{6+2 G}	\bar{X}	7'6	36'7	78'7	140'4	250'2	469'9	737'4	1096'6	1485'0
	ESM	0'2	0'2	0'9	6'4	5'8	12'0	106'6	146'1	294'9

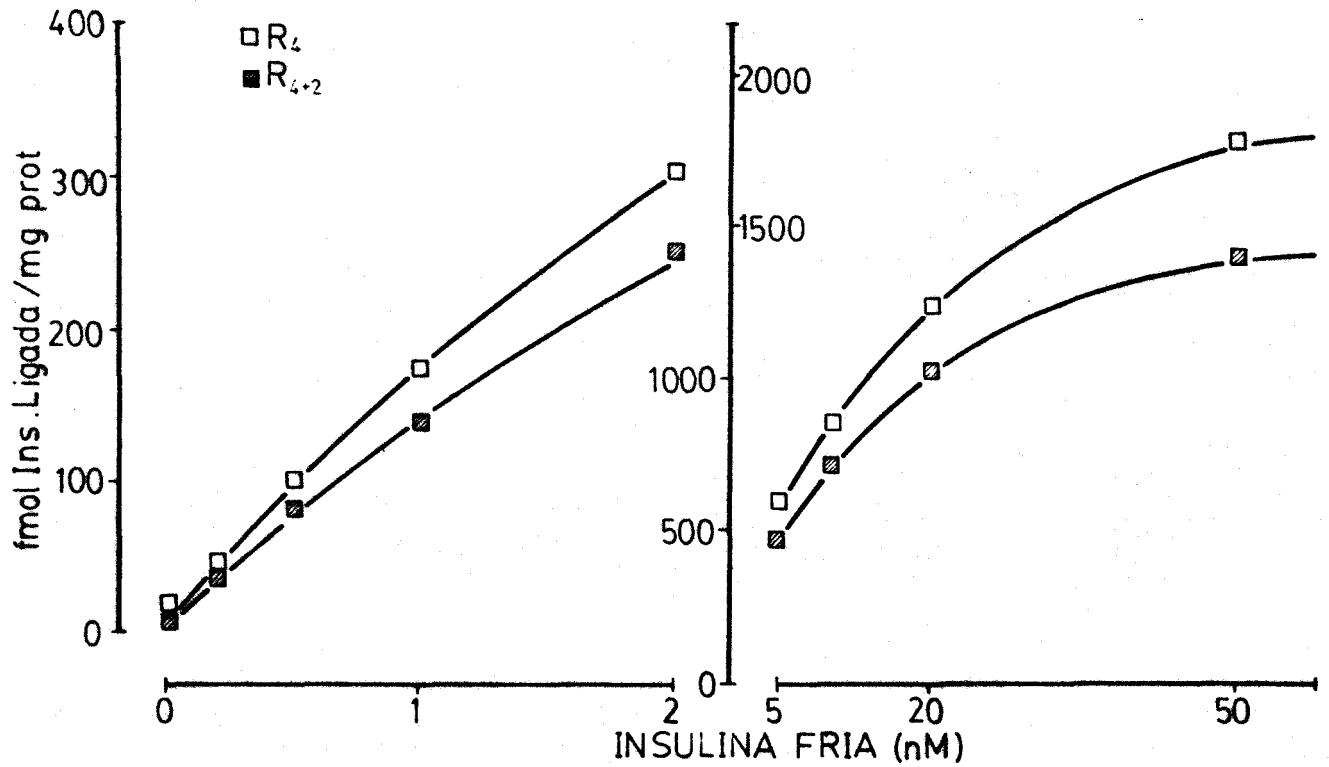


Fig. 36 Dosis-efecto: unión de insulina a membranas hepáticas de ratas sometidas a 4 días de ayuno y 4 días de ayuno más 2 de realimentación expresado en fmoles/mg de proteína en función de la concentración de insulina fría.

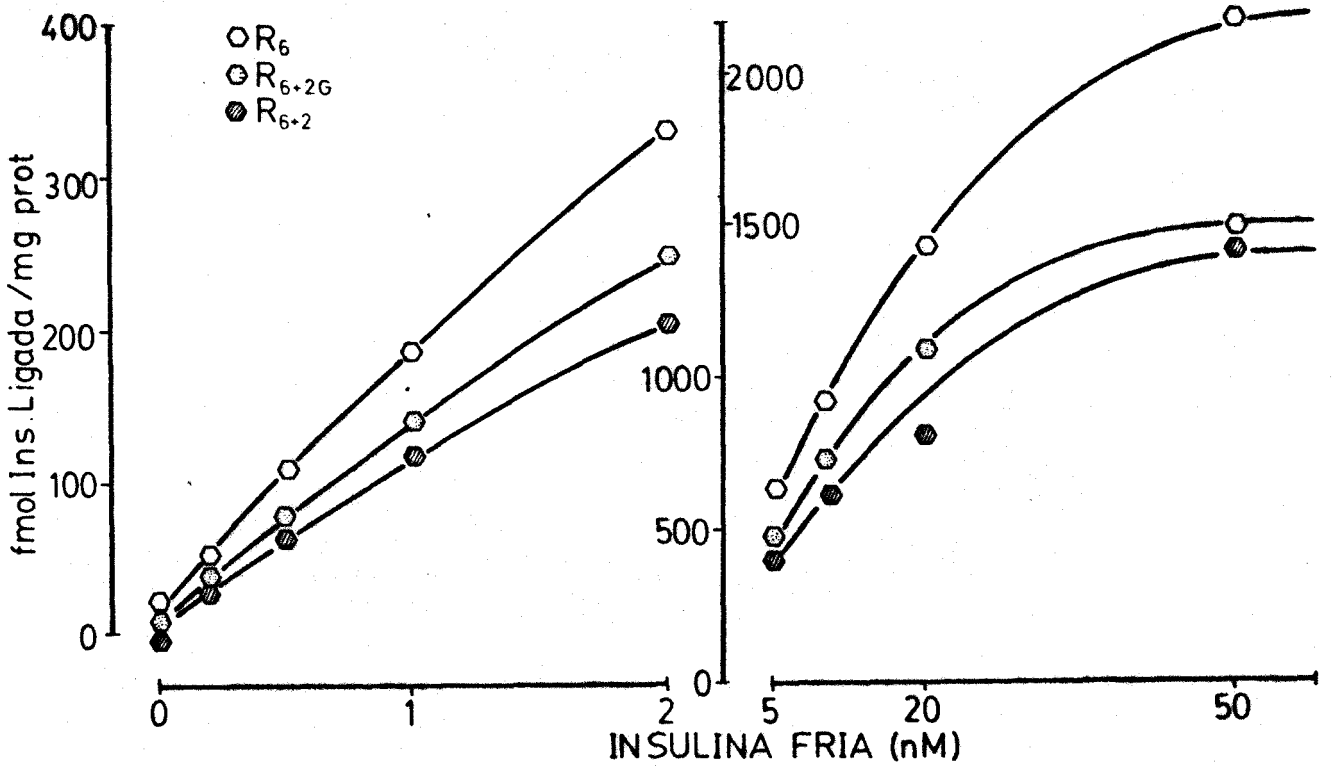


Fig. 37 Dosis-efecto: unión de insulina a membranas hepáticas de ratas sometidas a 6 días de ayuno y 6 días de ayuno más 2 de realimentación con dieta standard o con glucosa oral, expresado en fmoles/mg de proteína en función de la concentración de la insulina fría.

TABLA N° 47

Concentración de insulina a la cual se ocupan la mitad de los receptores ($S_{0,5}$) de membranas hepáticas de ratas sometidas a 4 días de ayuno y 4 días de ayuno más dos de realimentación expresado en moles.

	R_4	R_{4+2}	
$S_{0,5}$	11×10^{-9}	10×10^{-9}	
	R_6	R_{6+2}	$R_{6+2} G$
$S_{0,5}$	13'0	$12'5 \times 10^{-9}$	$11'0 \times 10^{-9}$

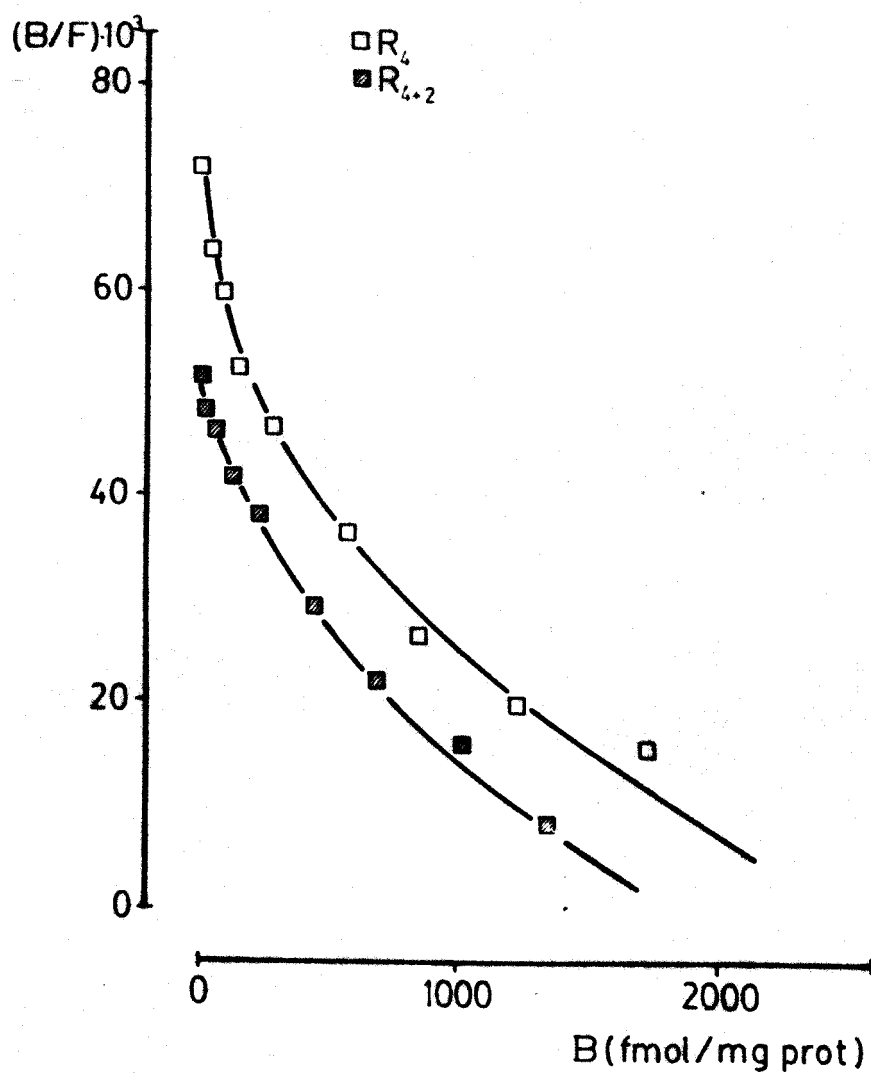


Fig. 38 Representación de Scatchard. Cociente de los porcentajes de trazador unido y libre en función de la hormona unida total para membranas aisladas de ratas sometidas a 4 días de ayuno y 4 días de ayuno más 2 de realimentación.

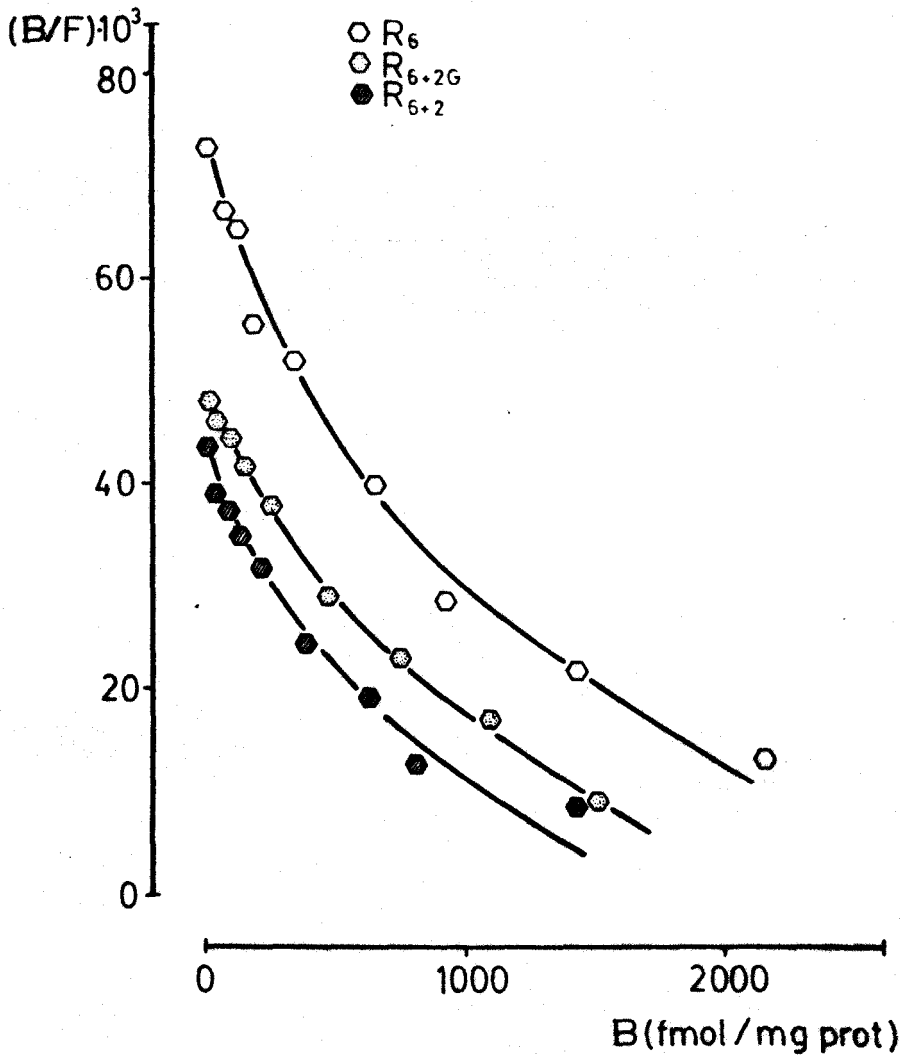


Fig. 39 Representación de Scatchard. Cociente de los porcentajes de trazador unido y libre en función de la hormona unida total para membranas aisladas de ratas sometidas a 6 días de ayuno y 6 días de ayuno más 2 de realimentación con dieta standard o glucosa oral.

TABLA N° 48

Número de receptores de insulina en membranas hepáticas de ratas sometidas a 4 días de ayuno y 4 días de ayuno más dos de realimentación. $\bar{X} \pm \text{ESM}$ p vs R_4 $n = 2$

	R_6	R_{6+2}
Total	2510 \pm 14'1	1990 \pm 127'3 p < 0'025
Alta afinidad	440 \pm 28'3	300 \pm 53'0 p < 0'05
Baja afinidad	2070 \pm 14'1	1727 \pm 74'2 p < 0'0125

TABLA N° 49

Afinidad de los receptores de insulina en membranas hepáticas de ratas sometidas a 6 días de ayuno, 6 días de ayuno más dos de realimentación con dieta standard y 6 días de ayuno más dos de realimentación con glucosa, expresado en K_D nM. $\bar{X} \pm \text{ESM}$ p vs R_6 $n = 2$

Receptores	R_6	R_{6+2}	$R_{6+2} G$
Alta afinidad	2'3 \pm 0'3	2'5 \pm 0'1 N.S.	2'4 \pm 0'2 N.S.
Baja afinidad	18 \pm 1	19 \pm 3 N.S.	19 \pm 2 N.S.

TABLA N° 50

Afinidad de los receptores de insulina en membranas hepáticas de ratas sometidas a 4 días de ayuno y 4 días de ayuno más dos de realimentación, expresado en K_D M. $\bar{X} \pm ESM$ p vs R_4 n = 2

Receptores	R_4	R_{4+2}
Alta afinidad	$(1'9 \pm 0'4) \times 10^{-9}$	$(1'6 \pm 0'2) \times 10^{-9}$ N.S.
Baja afinidad	$(1'6 \pm 0'2) \times 10^{-8}$	$(1'7 \pm 0'2) \times 10^{-8}$ N.S.

TABLA N° 51

Número de receptores de insulina en membranas hepáticas de ratas sometidas a 6 días de ayuno, 6 días de ayuno más dos de realimentación con dieta standard y 6 días de ayuno y dos de realimentación con glucosa. $\bar{X} \pm ESM$ vs R_6 , n 2

Réceptores	R_6	R_{6+2}	$R_{6+2} G$
Total	$2795 \pm 162'6$	$1950 \pm 113'1$ p < 0'0125	2130 ± 183 p < 0'05
Alta afinidad	$575 \pm 70'7$	$367 \pm 17'7$ p < 0'05	$400 \pm 28'3$ p < 0'05
Baja afinidad	$2220 \pm 229'8$	$1583 \pm 130'8$ p < 0'05	1730 ± 155 p < 0'05

Representando los resultados como fmoles ligados/mg de proteína (tablas 45,46) (figs. 36,37), puede observarse como después de periodos de 4 y 6 días de ayuno más dos de realimentación, disminuye la unión de la insulina aproximándose a los valores de controles alimentados. Tras 2 días de realimentación con glucosa oral al 40% se obtuvieron resultados similares a los conseguidos con dieta standard, aunque menos acusados.

La tabla 47 recoge los valores de de $S_{0,5}$ (10-13 nM en todos los casos). Tratando los resultados según el método de Scatchard (1949) figs. 38, 39; se calcularon las K_d de los receptores de alta y baja afinidad (tablas 49,50) siendo similares para las ayunadas y las realimentadas.

En cuanto al número de receptores, se observó como la realimentación daba lugar a una disminución con respecto a los resultados obtenidos en ratas ayunadas, llegándose a una situación próxima a las ratas controles alimentadas.

La realimentación con glucosa oral al 40%, dió lugar a un descenso menos acusado del número de receptores que el obtenido con dieta standard, siendo estadísticamente significativo el descenso del número total de receptores y el de los de alta afinidad pero no el de los de baja afinidad.

6. UNION INSULINA-HEPATOCITOS INTACTOS TRAS PERIODOS VARIAB-
LES DE AYUNO (0,2,4 y 6 DIAS).

Resulta evidente a partir de los resultados expuestos anteriormente que el ayuno da lugar a un incremento del número de receptores hepáticos para insulina, normalizándose después de la realimentación. Sin embargo, puede aducirse que este fenómeno se ha estudiado solamente a nivel de membranas plasmáticas aisladas, con los posibles artefactos a que puede dar lugar el proceso de purificación. Parece por tanto obligatorio comprobar si esta modificación de los receptores de insulina tiene también lugar a nivel de células intactas, es decir, de hepatocitos aislados.

Con esta finalidad, se estudiaron los aspectos estequiométricos de la interacción insulina-receptor utilizando hepatocitos aislados mecánicamente, sin la utilización de enzimas que hubieran podido dañar la estructura de la membrana. Los hepatocitos se obtuvieron de ratas controles alimentadas o sometidas a 2,4 y 6 días de ayuno.

Como se observa en la tabla 52 y figura 40 , la unión del trazador a los hepatocitos fue superior en las ratas ayunadas que en las controles alimentadas. En presencia de concentraciones crecientes de insulina fría la unión del trazador a las células fué inhibida de modo competi-

tivo, aunque de forma paralela en todas las preparaciones celulares, como lo demuestra el hecho de que la K_D global fué similar en todos los casos (24,22,24 y 23 nM tras 0,2,4 y 6 días de ayuno, respectivamente).

Al estudiar la cantidad de insulina ligada por las células, pudo comprobarse que la saturación de los receptores tenía lugar a concentraciones de insulina fría del orden de 100 nM (tabla 53 y fig. 41). Sin embargo, los hepatocitos de ratas sometidas a ayuno de 4 o 6 días mostraron una capacidad de unión superior a los de 2 días, siendo aún más bajos los de animales controles. La concentración de insulina a la que se ocupaban la mitad de los receptores ($S_{0,5}$) fué similar en todos los casos (25,34,30 y 30 nM tras 0,2,4 y 6 días de ayuno, respectivamente).

Con el objeto de comprobar si el ayuno da lugar a un aumento del número de receptores sin modificaciones en la afinidad, como se había observado en membranas hepáticas, se trataron los resultados de las experiencias dosis-efecto según el método de Scatchard (1949), como aparece en la fig. 42 y tablas 54,55. Esta hipótesis se confirmó plenamente puesto que las curvas fueron paralelas en hepatocitos de ratas alimentadas y ayunadas, no habiendo por lo tanto alteraciones de la afinidad de

ninguno de los dos tipos de receptores, aunque si que hubo un aumento de su número tras 2 días de ayuno, aún más acusado tras 4 y 6 días de ayuno. No pudo pensarse en distintos grados de cooperatividad negativa sitio-sitio puesto que el índice de cooperatividad n (fig. 43) obtenido en todos los grupos según el método de Hill (1913) fué similar (0'92-0'93).

TABLA N° 52

Unión de la insulina al hepatocito de ratas controles y sometidas a 2,4 y 6 días de ayuno con concentraciones crecientes de insulina fría expresado en B% (porcentaje de unión) n =3

Ins. fría	0	0'2	0'5	1	2	5	10	20	50	100	
R ₀	\bar{X}	4'4	4'1	4'1	4'0	3'6	3'3	2'8	2'4	1'4	1'1
	ESM	0'2	0'7	0'6	0'6	0'6	0'7	0'2	0'3	0'3	0'1
R ₂	\bar{X}	5'2	4'8	4'5	4'2	4'1	3'8	3'3	2'1	1'8	1'4
	ESM	0'9	0'8	0'9	0'9	0'7	0'7	0'6	0'7	0'2	0'2
R ₄	\bar{X}	6'8	6'3	6'0	5'9	5'3	5'1	4'6	4'1	2'7	2'0
	ESM	1'1	1'3	1'3	1'3	1'5	1'5	1'4	1'2	0'7	0'7
R ₆	\bar{X}	7'0	6'6	5'9	5'8	5'4	4'9	4'4	3'7	2'8	2'1
	ESM	1'7	1'5	1'8	1'8	1'6	1'7	1'3	1'1	0'9	0'4

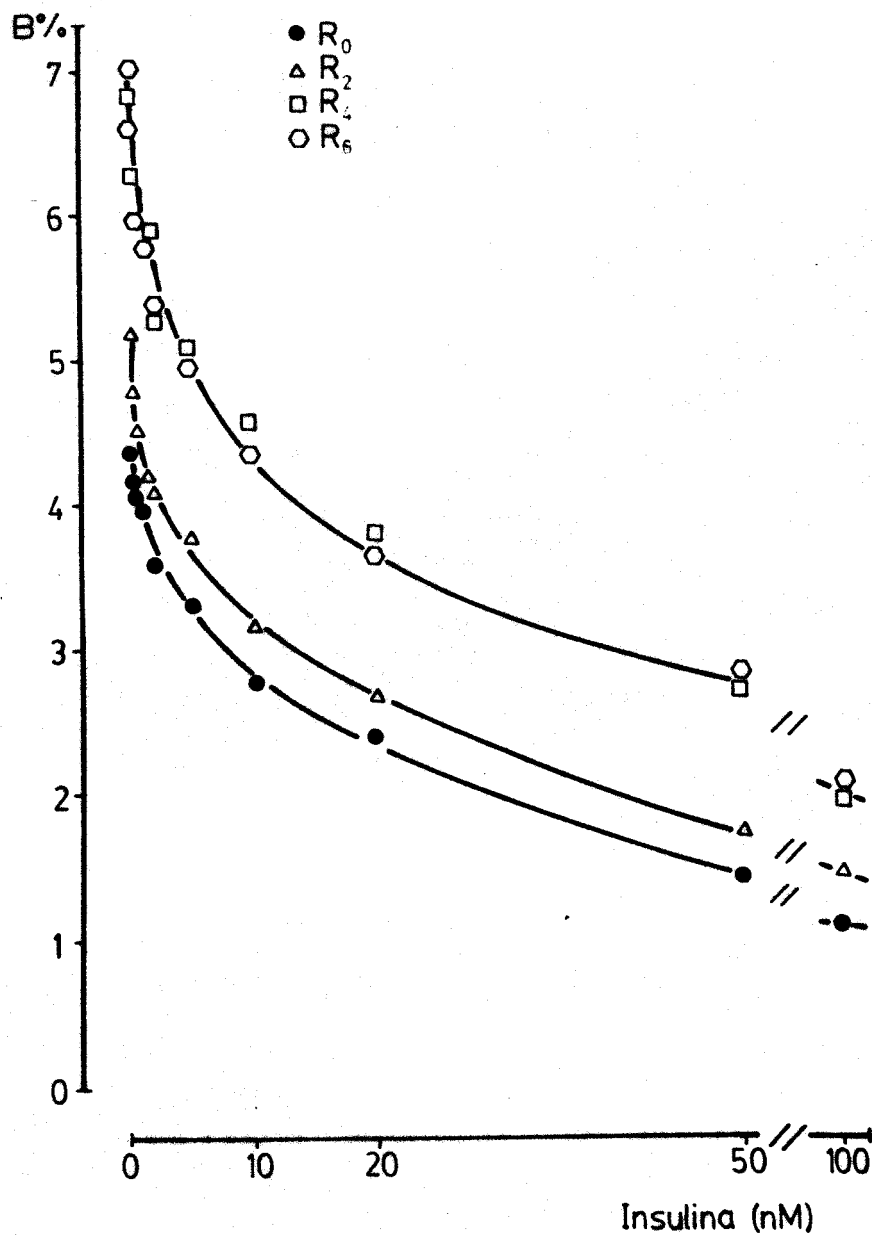


Fig. 40 Desplazamiento de la insulina ^{125}I unida a hepatocitos de ratas sometidas a 0, 2, 4 y 6 días de ayuno en presencia de concentraciones crecientes de insulina fría.

TABLA N° 53

Unión de la insulina a hepatocitos de ratas sometidas a 0, 2, 4 y 6 días de ayuno con concentraciones crecientes de insulina fría, expresado en fmoles/100µg DNA. (n = 3)

Ins. fría	0	0'2	0'5	1	2	5	10	20	50	100	
R ₀	\bar{X}	1'1	5'2	11'2	20'9	36'8	83'6	140'1	242'6	360'4	555'3
	ESM	0'2	0'8	1'6	3'1	6'2	17'9	10'5	31'1	80'1	40'0
R ₂	\bar{X}	1'3	6'0	12'4	21'9	42'1	95'4	168'3	208'5	440'4	725'4
	ESM	0'2	0'9	2'5	3'4	7'2	17'7	21'1	20'8	45'0	120'1
R ₄	\bar{X}	1'7	7'8	16'6	30'8	54'4	128'8	232'1	416'0	685'7	1005'5
	ESM	0'3	1'6	3'5	6'6	15'7	36'9	70'3	118'3	175'1	355'2
R ₆	\bar{X}	1'8	8'2	16'4	30'3	55'1	125'0	219'1	366'9	705'7	1030'5
	ESM	0'4	1'8	4'9	9'5	16'7	40'6	65'3	112'2	220'2	220'1

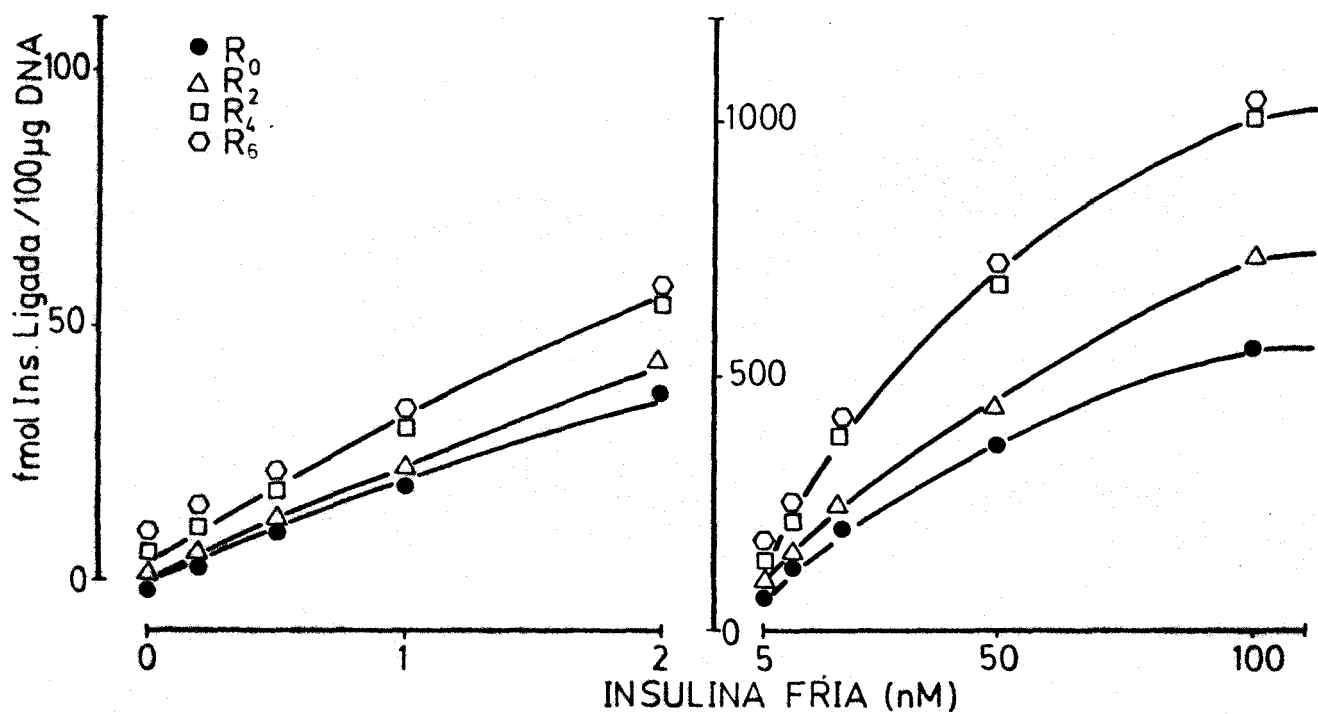


Fig. 41 Dosis-efecto: unión de insulina a hepatocitos de ratas sometidas a 0, 2, 4 y 6 días de ayuno, expresado en fmoles/100 µg de DNA en función de la concentración de insulina fría (nM).

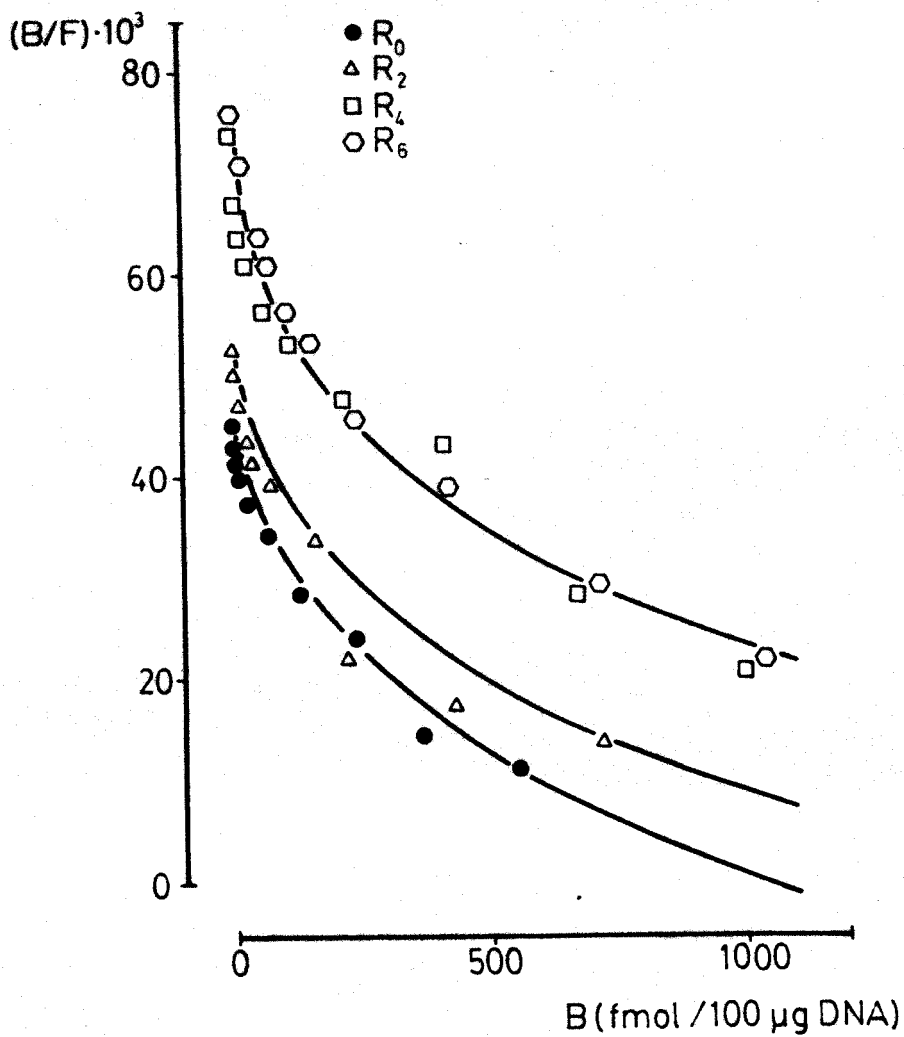


Fig. 42 Representación de Scatchard. Cociente de los porcentajes del trazador unido y libre en función de la hormona unida total para hepatocitos aislados de ratas sometidas a 0, 2, 4 y 6 días de ayuno.

TABLA N° 54

Número de receptores de insulina en hepatocitos de ratas sometidas a 0, 2, 4 y 6 días de ayuno, expresado en fmol/mg de proteína. $\bar{X} \pm \text{ESM}$ p vs R_0 n = 3

Receptor	R_0	R_2	R_4	R_6
Total	$1110 \pm 173'7$	$1590 \pm 169'0$ p < 0'05	$2400 \pm 241'7$ p < 0'01	$2400 \pm 191'0$ p < 0'005
Alta afinidad	$110 \pm 7'1$	$165 \pm 19'6$ p < 0'05	$208 \pm 74'7$ p < 0'05	$240 \pm 53'5$ p < 0'05
Baja afinida	$1000 \pm 166'6$	$1425 \pm 150'1$ p < 0'05	$2192 \pm 166'3$ p < 0'01	$2160 \pm 155'3$ p < 0'0025

TABLA N° 55

Afinidad de los receptores de insulina de hepatocitos de ratas sometidas a 0, 2, 4 y 6 días de ayuno, expresado por la constante de disociación (K_D , M). $\bar{X} \pm ESM$ p vs R_0

Receptor	R_0	R_2	R_4	R_6
Alta afinidad	$(0'5 \pm 0'1) 10^{-9}$	$(0'6 \pm 0'1) 10^{-9}$ N.S.	$(0'6 \pm 0'2) 10^{-9}$ N.S.	$(0'6 \pm 0'2)$ N.S.
Baja afinidad	$(0'9 \pm 0'1) 10^{-8}$	$(1'0 \pm 0'1) 10^{-8}$ N.S.	$(1'1 \pm 0'3) 10^{-8}$ N.S.	$(1'1 \pm 0'3) 10^{-8}$ N.S.

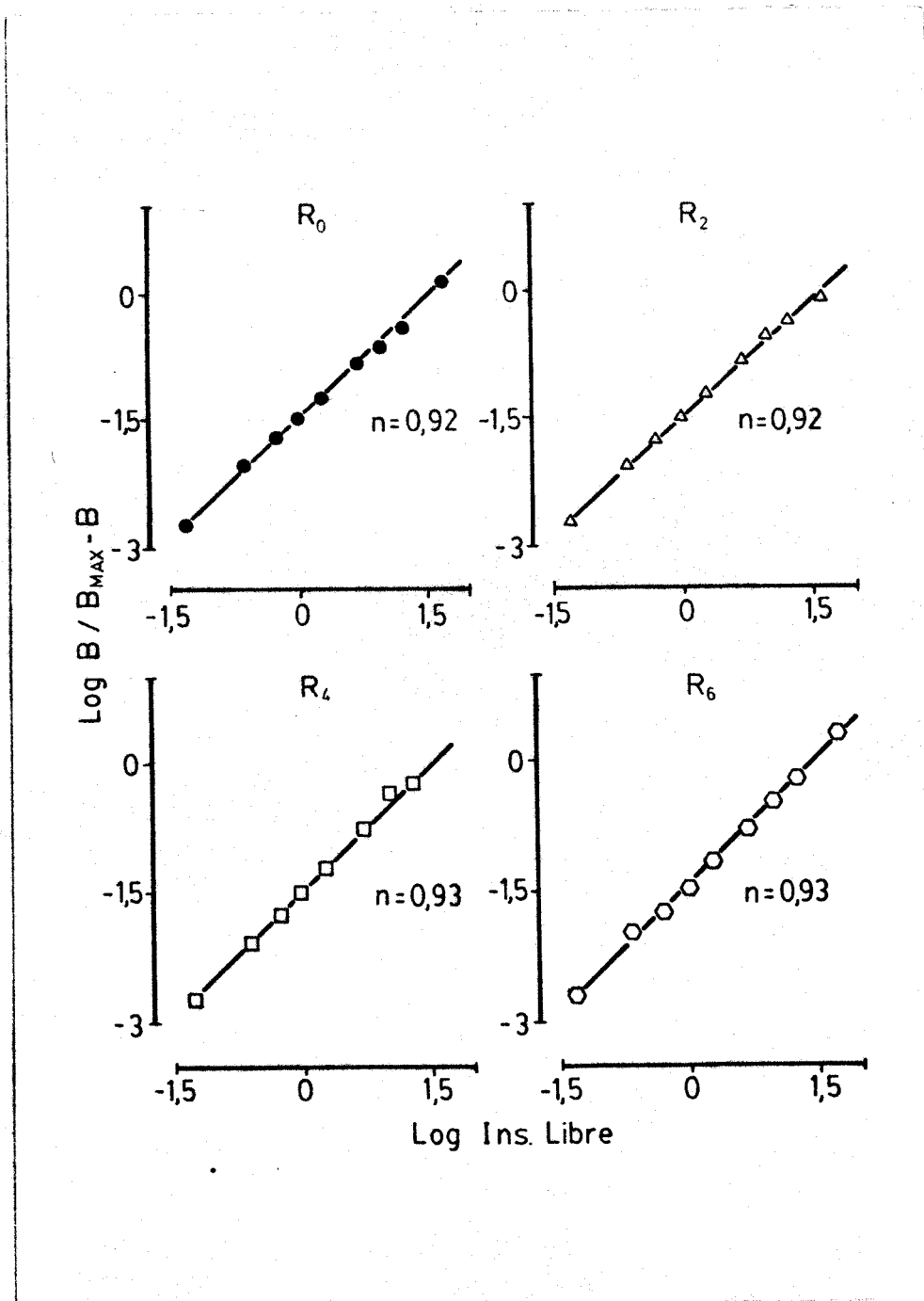


Fig. 43 Representación de Hill para hepatocitos aislados de ratas sometidas a 0,2,4 y 6 días de ayuno.

50 DISCUSSION:

Para estudiar la unión de la insulina a sus receptores se necesita por una parte un trazador apropiado y por otra una preparación válida de receptores.

Trazador

Conforme aumenta el grado de incorporación de iodo va disminuyendo la actividad biológica de la insulina (De Zoeten y Havinga, 1961; Garrat, 1964; Izzo y col. 1964). Utilizando monoiodoinsulina (Freychet, 1971 a), es decir insulina marcada con un solo átomo de iodo radiactivo, en la que según Hamlin y Arquilla (1974) se marcaría la Tyr A₁₉, las modificaciones tanto a nivel estructural como en cuanto a su actividad biológica son mínimas.

La monoiodoinsulina marcada por la técnica de Hunter y Greenwood (1962) con modificaciones (Freychet, 1971 a y 1974) es el trazador que se ha utilizado en el presente trabajo. Como se ve en la fig. (19) la monoiodoinsulina compite perfectamente con la insulina nativa en su unión al receptor, no observándose diferencia alguna cuando se compara la capacidad de unión de la insulina fría y del trazador a membranas hepáticas.

Membranas plasmáticas hepáticas.

El presente trabajo se ha realizado con membranas hepáticas, confirmándose posteriormente los resultados con hepatocitos aislados. Las membranas hepáticas se han aislado por el método de Neville (1968) técnica utilizada en prácticamente todos los estudios realizados sobre unión de insulina a membranas plasmáticas de hígado: Freychet (1971, 1974 a; Freychet y col, 1972 a; Olefsky y col, 1975; Kahn, 1975, etc. Hay que contar con un método que permita identificar la pureza relativa del preparado de membranas. Para ello se utilizan técnicas microscópicas o marcadores enzimáticos. Las técnicas microscópicas utilizadas por Neville (1960); Coleman y Fineau (1966) tienen el inconveniente de ser un método más cualitativo que cuantitativo por lo que en la literatura, se han preferido, generalmente marcadores enzimáticos, tales como enriquecimiento en actividad de 5' mononucleotidasa (Michell y col, 1967; Evans, 1969; Allan y Crumpton, 1970, etc.), ATPasas (Coleman y col, 1967; Evans, 1970, etc.), fosfatasa alcalina (Porteus y Clark, 1965; Ray y col, 1970, etc.), leucina aminopeptidasa (Porteus y Clark, 1965; Evans, 1969 y 1970) y adenil ciclasa (Mc Keel y Jaret, 1970; Ray, 1970). Estas enzimas se encuentran prácticamente en su totalidad en la membrana plasmática, por lo que la demostración

de su actividad en la preparación de membranas puede utilizarse como índice de que dicha preparación contiene realmente membranas plasmáticas, proporcionando además el grado de purificación respecto al homogenado inicial.

En el presente trabajo se ha utilizado la 5' mononucleotidasa para comprobar el grado de pureza de las membranas hepáticas como aparece en la tabla 11, teniendo todas las preparaciones de membranas un grado de purificación similar próximo a 10. Dentro de un mismo grupo de experiencias se ha trabajado con membranas que tuvieran grado de purificación análogos, corrigiendo las mínimas diferencias que hubiera entre ellas.

Hepatocitos

Este tipo de células se preparan habitualmente por dos técnicas: la digestión enzimática se realiza con hialuronidasa y colagenasa (Berry y Friend, 1969) o colagenasa solo (Seglen y Solheim, 1977); mientras que la agitación mecánica (Olefsky y col, 1975) no utiliza ningún tipo de enzimas.

Con los hepatocitos obtenidos por procedimientos mecánicos se obtiene una viabilidad de aproximadamente del 90% próximo a la que se encuentra por tratamiento por colagenasa.

Olefsky y col. (1975) han comprobado que los hepatocitos preparados por agitación mecánica o por digestión con colagenasa tienen idénticas características de unión a la insulina.

En el presente trabajo se han utilizado hepatocitos preparados por una técnica de agitación mecánica, modificación de los métodos descritos por Olefsky y col. (1975) para hepatocitos y Prieto y col. (1979) para enterocitos.

Mientras que las ventajas de utilizar membranas plasmáticas son numerosas desde el punto de vista práctico (ver página 33), Los hepatocitos intactos permiten correlacionar la unión de insulina a receptores con su actividad biológica (Jeferson, 1976; Le Cam y Freychet, 1978; Teperman y col, 1978, etc.).

Unión insulina-receptor.

La unión específica de la insulina ^{125}I a las membranas plasmáticas aumenta progresivamente con el tiempo de incubación fig.(10) hasta que se alcanza el equilibrio aparente de la reacción $\text{H} + \text{R} \rightleftharpoons \text{HR}$.

El tiempo en el cual se alcanza el equilibrio es inversamente proporcional a la temperatura; así, a 4°C no se ha llegado al equilibrio a las 2 horas, lo que concuerda con los datos aportados con Kahn y col. (1974) y Forgue

y Freychet (1975) en los que son precisos periodos de 12 a 24 horas de incubación para alcanzar el equilibrio, siendo en todo caso la degradación prácticamente nula. A 20°C el porcentaje de unión específica es mayor que a 4°C aunque tampoco son suficientes 2 horas de incubación para alcanzar el equilibrio a pesar de haber una degradación muy pequeña, en concordancia con lo encontrado por Forgue y Freychet (1975); Soll y col. 1975) en periodos de 3 a 5 horas.

A 30°C el equilibrio se alcanza entre los 45 y 60 min de incubación manteniéndose al menos durante 2 horas, datos que concuerdan con los obtenidos por Freychet y col. (1971, 1972); Kahn y col. (1972 y 1973); Goldfine y col. (1973); Freeman y col. (1973), etc.

A 37°C el equilibrio se alcanza rápidamente como puede apreciarse en la fig.10, pero la degradación (fig.11 y 12) es muy alta, por lo que en la literatura se aportan pocos datos en los estudios realizados a esa temperatura.

Hemos realizado las experiencias a 30°C durante 60 min debido a que esta temperatura se alcanza un equilibrio estable con escasa degradación de la hormona.

Para estudiar la degradación se pueden utilizar distintos métodos, tales como precipitación con ácido tricloroacético, adsorción a talco o unión a membranas hepáticas frescas. Como se puede observar en la fig. 13 el más sensible

es el de unión a membranas hepáticas, en concordancia con resultados previos tales como los de Freychet y col. (1972 a).

El pH óptimo para la unión de la insulina a membranas hepáticas es de 7'5 con un rango de $\pm 0'5$ en el que no se observan modificaciones acusadas. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por Freychet y col. (1973); Kahn y col. (1974) y Olefsky, (1975).

Con respecto a la fuerza iónica, Cuatrecasas (1971 b) y Kahn y col. (1974), describen que utilizando cloruro sódico a altas concentraciones se producía un incremento de la unión específica de la insulina a los receptores. En el presente trabajo el aumento de concentración de cloruro sódico y cloruro potásico produce un descenso de la unión de la insulina a membranas hepáticas.

La disociación del complejo insulina-receptor una vez formado se puede estudiar por varios métodos (tripsina, dilución, exceso de insulina fría) (Kahn y Baird, 1978). De Meyts y col. (1973) fueron los primeros que encontraron interacciones receptor-receptor del tipo de cooperatividad negativa, al observar como la disociación del complejo hormona-receptor se desarrollaba a mayor velocidad, cuando además de diluir, se añadía al medio un exceso de insulina fría. Las experiencias representadas en la fig.17, reproducen fielmente este hecho al igual que Kahn (1975).

Las experiencias de disociación por si solas, aunque necesarias, no son suficientes para demostrar la existencia de interacciones receptor-receptor. Habría que realizar una preincubación previa a la disociación, en presencia de una concentración mayor de insulina fría o marcada. La disociación subsiguiente es más rápida incluso sin añadir al medio un exceso de insulina fría (De Meyts, 1976). Esto serviría para mostrar que la velocidad de disociación aumentaría solamente por una ocupación de los receptores. Pollet (1977) no reproduce los resultados obtenidos por De Meyts (1976) pero Olefsky y Chang (1978 y 1979) sí que lo han hecho.

Unión de insulina a membranas hepáticas y hepatocitos intactos: ayuno y realimentación.

Se discuten a continuación los resultados obtenidos en el estudio de la unión de insulina a membranas hepáticas de animales alimentados (controles) o sometidos a periodos variables de ayuno y realimentación.

El tiempo en el cual se alcanza el equilibrio de asociación (fig. 20) fue aproximadamente 45 min para todas las membranas manteniéndose el equilibrio al menos hasta los 90 min (Freychet y col, 1971, 1972; Kahn y col, 1972 y 1973; Goldfine y col, 1973; Freeman y col, 1973; etc.).

Esto es importante ya que si cada preparación de membranas alcanzara el equilibrio de asociación a la insulina a distintos tiempos podrían interpretarse inadecuadamente los resultados.

La velocidad inicial de asociación fué la misma en todos los casos ya que representando los resultados en función del máximo, es decir, considerando el 100% el valor máximo de B en cada caso, se obtienen curvas de asociación superponibles tal como observan Soll y Kahn (1975) en ratones obesos.

Las modificaciones de la unión de insulina a sus receptores específicos en membranas hepáticas, serían difícilmente interpretables en el caso de que la capacidad de cada preparación de membranas para degradar insulina variara durante el ayuno o bien que la propia preparación de membranas se inactivara de distinto modo durante la incubación con la hormona, dependiendo del periodo de privación de alimento. Estos dos parámetros, degradación o inactivación de la insulina o de los receptores, han sido estudiados en este trabajo.

La degradación de la insulina por las membranas hepáticas fue independiente del ayuno, obteniéndose una conclusión similar en cuanto a la inactivación de los receptores. Este último estudio es casi sistemáticamente olvidado en los trabajos publicados en la literatura sobre las modi-

ficaciones de los receptores de insulina en diversas situaciones fisiológicas y fisiopatológicas.

El aumento de insulina a membranas hepáticas durante el ayuno puede deberse a un incremento de la afinidad o del número de receptores. Un aumento de la afinidad sería explicable por un incremento en la velocidad de asociación o un descenso en la velocidad de disociación del complejo hormona-receptor. Ya se ha indicado que no hay modificaciones en cuanto a la velocidad de asociación, y lo mismo puede decirse sobre la velocidad de disociación, ya que tanto en animales alimentados como sometidos a ayuno se observaron cinéticas de disociación superponibles al representarlas en función de la fracción ligada en el equilibrio como 100%, inmediatamente antes de añadir un exceso de hormona fría. Pudo comprobarse en todos los casos un periodo de semidisociación $t_{1/2}$ de 9-10 min. Lógicamente, y como se comprobó más tarde, no debería modificarse la afinidad de los receptores de insulina durante el ayuno a la vista de estos resultados.

Incubando membranas hepáticas o hepatocitos con insulina ^{125}I en presencia de concentraciones crecientes de insulina fría, esta última va desplazando progresivamente de un modo competitivo a la insulina marcada, como se comprueba en las figuras 24 y 25. A partir de estas gráficas se puede calcular la K_d global en los distintos

periodos de ayuno. Los valores obtenidos para la Kd fueron idénticos en todos los casos siendo del mismo orden que los encontrados por Kahn y col.(1974), Freychet (1974 a) y Simon (1977).

Representando estos resultados como insulina total unida frente a las concentraciones de insulina fría tal como se realiza habitualmente en la literatura (Freychet, 1974; Le Marchand y col, 1977, etc.) se observó que, conforme va aumentando el periodo de ayuno, se incrementa la unión de la insulina a los receptores. Tras 1 día de ayuno la unión de la insulina a las membranas hepáticas es prácticamente igual que en los controles, en contraposición con los datos aportados por Soll y col.(1975) en membranas hepáticas de ratones delgados correspondientes a hermanos heterocigóticos de ratones obesos (ob/ob), pero debe tenerse en cuenta que estos ratones no pueden considerarse estrictamente como animales normales.

Tras 2 días de ayuno aumenta la unión de la insulina, datos que concuerdan con los obtenidos en adipocitos por Olefsky (1976); Kasuga y col.(1977) y Olefsky y Kobayashi(1978).

A periodos más prolongados de ayuno (4 y 6 días) aumenta aún más la unión de la insulina al receptor, aunque los resultados en ambos periodos son indistinguibles entre si.

Es interesante resaltar que el aumento de la unión de

insulina a sus receptores hepáticos ha sido observado en este trabajo no solo a nivel de membranas plasmáticas aisladas sino también con células intactas que conservan íntegra su actividad metabólica.

En las ratas sometidas a 4 o 6 días de ayuno y realimentadas a continuación durante 2 días con dieta standard o con glucosa oral al 40% , la unión de la insulina a los receptores disminuye frente a sus controles respectivos (en este caso 4 o 6 días de ayuno).

Kasuga y col.(1977) trabajan con adipocitos de ratas sometidas a 2 días de ayuno y realimentadas 2 días, observando también una disminución de la unión de insulina a los adipocitos de los animales realimentados con respecto a los ayunados.

En resumen, la unión de la insulina a membranas hepáticas y hepatocitos de ratas sometidas a 2,4 y 6 días de ayuno aumenta con respecto a los controles. Tras realimentación el fenómeno se revierte hacia la normalidad.

Los hechos anteriormente expuestos se pueden deber a un aumento de la afinidad del receptor de la insulina (aunque ya se ha descartado esta posibilidad) o a un aumento del número de receptores o a ambos. En orden a encontrar una explicación, se trataron los resultados anteriores mediante el análisis de Scatchard (1949).

La representación de Scatchard ha sido muy utilizada en el estudio de los receptores de insulina en membranas hepáticas, hepatocitos, adipocitos, etc. (Kahn y col, 1973; Freeman y col, 1973; Freychet y col, 1973; Olefsky y Reaven, 1974; Soll y col, 1974; Freychet, 1975; Simon y col, 1977; Olefsky y Kobayashi, 1978, etc.); obteniéndose una gráfica curvilínea que refleja una disminución progresiva de la afinidad del receptor para la insulina, además de una heterogeneidad real de los sitios de unión. Ello podría explicarse por dos posibles modelos:

- Un solo tipo de receptores con cooperatividad negativa.
- Dos o más tipos de receptores distintos en cuanto a su afinidad para la insulina.

Desde un punto de vista fisiológico estos modelos se podrían considerar como un sistema tampón que al modificar las concentraciones de insulina, sería sensible a los cambios de concentración de la hormona.

La peculiar disposición de la representación de Scatchard permite identificar dos tipos de receptores, una población de alta afinidad con un número relativamente pequeño de receptores y otra, de baja afinidad con un mayor número de receptores. Cuando se representaron mediante este análisis los resultados de la unión de la insulina a membranas hepáticas y hepatocitos en los distintos periodos de

ayuno se obtuvo lo siguiente:

En membranas hepáticas de ratas sometidas a 0,1,2 y 4 días de ayuno las curvas fueron paralelas (fig.28), lo que indicaba que la afinidad de las dos clases de receptores no se modifica durante el ayuno. Los valores de las constantes de afinidad observados son del orden de los encontrados en la literatura en otros sistemas de receptores de insulina (Olefsky, 1976; Kasuga y col, 1977, etc.).

Lo mismo ocurrió en animales sometidos a 6 días de ayuno al compararlos con sus controles. Los resultados anteriores se confirman plenamente en células aisladas intactas.

Tras realimentar las ratas durante 2 días después de 4 o 6 días de ayuno la afinidad siguió siendo la misma.

La intersección de la curva con el eje de abcisas en la representación de Scatchard corresponde al número total de receptores. El número de receptores de alta y baja afinidad puede calcularse a partir de la intersección de la prolongación de ambos tramos de la curva con el eje de abcisas.

Pudo observarse que el número de receptores no varía al comparar controles y ratas sometidas a 1 día de ayuno.

A los 2 días de ayuno aumentó el número de receptores

tanto en membranas hepáticas como en hepatocitos, datos que concuerdan con los obtenidos por Kasuga y col. (1977) en adipocitos; pero no así con los obtenidos por Olefsky (1976), Olefsky y Kobayashi (1978), Weringa y Krans (1978) que atribuyeron el aumento a un incremento de la afinidad.

En periodos más prolongados de ayuno (4 y 6 días) aumentó aún más el número de receptores, confirmándose los resultados obtenidos en membranas plasmáticas al estudiar hepatocitos intactos.

Al realimentar las ratas tras 4 y 6 días de ayuno con dieta standard o con glucosa oral al 40% disminuye el número de receptores con respecto a los animales sometidos a 4 y 6 días de ayuno considerados como controles.

Un factor a considerar, y que podría invalidar la interpretación de los resultados, es la posibilidad de que las interacciones receptor-receptor del tipo de cooperatividad negativa sean diferentes dependiendo del periodo de ayuno. Sin embargo, éste no fué el caso en el presente trabajo dado que al estudiar los resultados estequiométricos de la unión insulina-receptor por el método de Hill (1913) se obtuvo un índice similar de cooperatividad ($n = 0.92-0.93$) en todas las preparaciones de membranas y de hepatocitos. Incluso, al estudiar los resultados mediante un perfil de afinidad según De Meyts (1975),

pudo comprobarse que la constante de afinidad del receptor de insulina disminuía progresivamente a medida que el grado de ocupación por hormona aumentaba, sin encontrarse diferencias debidas a las condiciones de ayuno.

Como se muestra en la tabla(10) se observó una gran disminución de los niveles plasmáticos de insulina en las ratas objeto del estudio ya desde el primer día de ayuno, manteniéndose a continuación relativamente estable durante todo el tiempo que permitió la privación de alimento, lo que concuerda con lo observado en humanos y en otras especies animales (Cahill, 1966; Cahill y col, 1970).

Esta disminución en los niveles circulantes de insulina es paralela al descenso de la glucemia y se debe a una inactivación de la célula beta del páncreas (Cahill y col, 1966; Goberna y col, 1978. a y b).

Muchos estudios realizados en animales de experimentación y en humanos sugieren que los niveles de insulina circulantes pueden regular la concentración de los receptores de insulina en las células "diana" (Gavin y col, 1974; Soll y col, 1975; Archer y col, 1975; Beck Nielson y col, 1976; Le Marchand y col, 1977, etc.).

Un esquema para el mecanismo de la resistencia insulínica de la obesidad ha sido propuesto por Bar y Roth (1977).

(fig. 44). Un aumento de la ingesta elevaría los niveles de glucosa en sangre, los que a su vez estimularían un

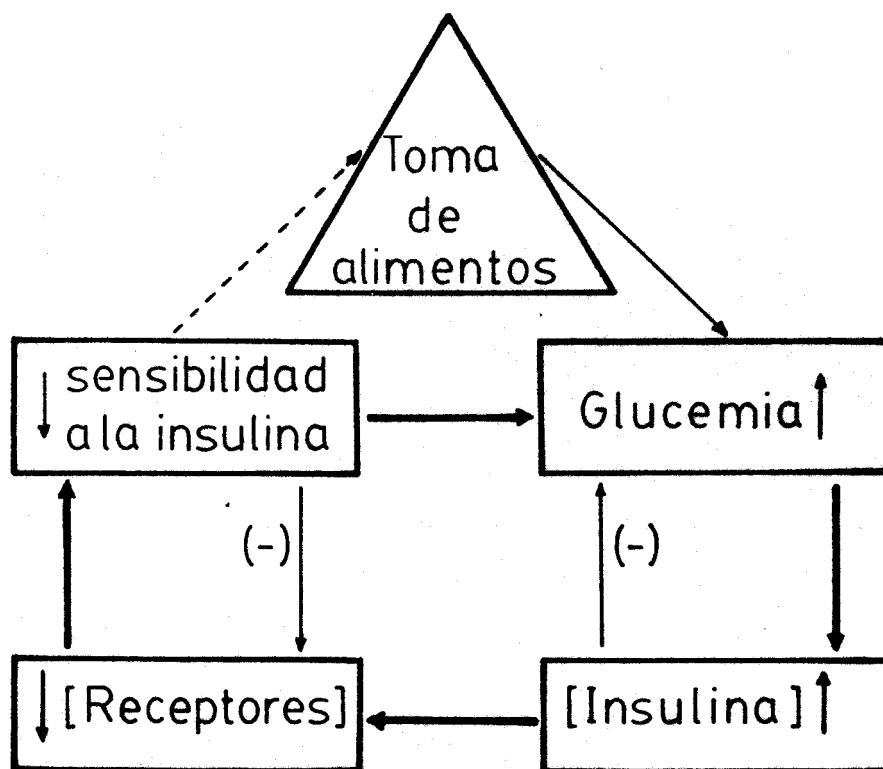


Fig. 44 Mecanismo de la resistencia insulínica en la obesidad según Bar y Roth (1977).

incremento de los niveles de insulina, los cuales causarían una disminución de la concentración de receptores; es por lo tanto un fenómeno de contraregulación del número de receptores de membrana por los niveles de insulina circulante. Soll (1976) entre otros, propone este modelo para otras hormonas tales como hormona de crecimiento, TRH, progesterona y catecolaminas, las cuales al elevarse su concentración en sangre regularían negativamente el número de receptores respectivo. El fenómeno inverso tendría lugar al disminuir la concentración de hormona (en el caso de la insulina tras un periodo de ayuno o tras una hipofisectomía).

En el presente trabajo, tras un periodo determinado de ayuno (1,2,4 o 6 días) los niveles de insulina y glucosa en el plasma de la rata han disminuido con respecto a los controles alimentados a la vez que por el fenómeno de contraregulación aumenta la unión de la insulina a membranas hepáticas y hepatocitos explicable por un aumento del número de receptores. Este hecho es comparable a los resultados publicados en la literatura en cuanto a unión de insulina a receptores en hombres y animales obesos sometidos a ayuno (Kahn, 1975 a, 1976; Beck Nielsen y col, 1976; Kolterman y col, 1979, etc.). La hiperinsulinemia del animal obeso coincide con un número disminuido de receptores de membranas; sin embargo,

tras un periodo de ayuno la insulinemia desciende hasta niveles similares a los de controles delgados, a la vez que el número de receptores aumenta hasta situarse en valores normales.

El problema se complica cuando algunos autores tales como Olefsky (1976), Olefsky y Kobayashi (1978), Weringa y Kraus (1978) explican el aumento de la unión de la insulina a preparaciones tales como adipocitos por un incremento de la afinidad del receptor por la insulina, al contrario que Kasuga y col. (1977) que sugieren un aumento del número de receptores. No obstante, recientemente el grupo de Olefsky (Kolterman y col, 1979) ha presentado estudios realizados en adipocitos de humanos obesos sometidos a 3 y 14 días de ayuno en los que a los 3 días de ayuno se modifica la afinidad, pero con periodos más prolongados de ayuno aumenta el número de receptores; concluyen que durante los 14 días de ayuno los pacientes obesos estaban expuestos a niveles de insulina muy bajos para ellos y que este prolongado periodo de hipoinsulinemia esté relacionado con un incremento en el número de receptores. Es decir, tal como se ha expuesto anteriormente, altos niveles de insulina conducen a una disminución del número de receptores de insulina en linfocitos, adipocitos, etc. El presente trabajo realizado a nivel de tejido hepático

y los aportados por otros autores (Kasuga y col, 1977; Kolterman y col, 1979, etc.) con respecto al tejido adiposo sugieren que la hipoinsulinemia puede conducir a un aumento del número de los receptores de insulina.

Esta hipoinsulinemia del ayuno, requiere un cierto tiempo para modular la concentración de los receptores de insulina en la membrana plasmática, tal como han sugerido Kolterman y col.(1979). Así se explicaría el por qué tras cortos periodos de ayuno (1 día) todavía no ha variado el número de receptores, mientras que tras periodos más largos (2 o más días) aumenta progresivamente.

El aumento del número de receptores de insulina durante el ayuno se revierte con la realimentación. Efectivamente, con 2 días de realimentación con dieta standard o con glucosa oral al 40% después de 4 o 6 días de ayuno disminuye el número de receptores hasta el valores de controles alimentados al haberse normalizado la insulinemia y la glucemia, datos que están en consonancia con los aportados por Kasuga y col.(1977).

Dado que el reconocimiento de una hormona peptídica por su receptor específico de membrana va seguido por una cascada de reacciones intracelulares que originan finalmente la respuesta biológica, es evidente que los estudios de unión hormona-receptor exploran una condición necesaria,

pero no suficiente, de la acción hormonal. A pesar de que el ayuno provoca una resistencia de los tejidos a la acción de la insulina, la unión de la hormona a sus receptores hepáticos aumenta, como demuestra el presente trabajo, mostrando una disociación entre los fenómenos de unión al receptor y posterior acción biológica. Parece pues evidente que los niveles bajos de insulina circulante durante el ayuno determinan por contrarregulación un número aumentado de receptores, mientras que son la etapas posteriores a nivel intracelular las que causan una disminución de la acción biológica de esta hormona, en concordancia con trabajos anteriores publicados en la literatura para otros tejidos y situaciones fisiológicas y fisiopatológicas.

69 CONCLUSIONES.

1. La unión de la insulina a sus receptores hepáticos, es un proceso reversible, saturable, específico y dependiente de la temperatura y del pH.
2. La moniodoinsulina posee la misma actividad biológica que la insulina nativa en cuanto a su unión al receptor.
3. Los resultados obtenidos sugieren la existencia de dos tipos de receptores para la insulina o un solo receptor mostrando cooperatividad negativa, de modo que disminuyera la afinidad al aumentar el grado ocupacional.
4. La unión de insulina a membranas hepáticas, es similar en ratas controles o sometidas a 1 día de ayuno, pero aumenta progresivamente tras 2,4 y 6 días de privación de alimento.
5. Este aumento no es debido a modificaciones en la afinidad de los receptores comprobándose además que las velocidades de asociación y de disociación se mantienen inalterables en los distintos periodos de ayuno.
6. Tampoco puede explicarse por modificaciones en la degradación de los receptores o de la insulina, puesto que ambos fenómenos fueron independientes de las condiciones nutricionales.

7. Igualmente, no hubo modificaciones en el grado de cooperatividad negativa en los distintos grupos.
8. El aumento de la unión insulina-receptor durante el ayuno fué debido a un incremento en el número de receptores de la membrana plasmática, tanto en los de alta como en los de baja afinidad.
9. Los resultados obtenidos a nivel de membranas hepáticas aisladas se reproducen de igual manera al estudiar hepatocitos intactos.
10. El fenómeno se revierte por realimentación, puesto que con membranas hepáticas de ratas sometidas a 4 o 6 días de ayuno seguidos de 2 días de realimentación se observa una unión de la insulina próxima a la de animales alimentados.
11. La concentración de insulina en sangre circulante disminuyó a la mitad de los controles alimentados tras 1 día de ayuno y se mantuvo ya prácticamente constante tras 2,4 y 6 días de privación de alimento, volviendo a valores controles tras 2 días de realimentación.

12. El aumento del número de receptores hepáticos para la insulina y la disminución de la insulinemia durante el ayuno indica una contraregulación de la hormona sobre sus receptores de modo que la exposición continuada de los tejidos a concentraciones bajas de insulina en plasma determina un aumento progresivo de los receptores en la membrana plasmática.

7^o BIBLIOGRAFIA.

ALLAN, D. y CRUMPTOM, M.J.

Preparation and characterization of the plasma membrane of pig lymphocytes.

Biochem.J. 120: 133, 1970.

ARCHER, J.A., GORDEN, P., GAVIN, J.R., LESNIAK, M.A. y ROTH, J.

Insulin receptors in human circulating lymphocytes: application to the study of insulin resistance in man.

J.Clin.Endocrinol. 36: 627, 1973.

ARILLA, E.

Cinética de la secreción de insulina durante el ayuno.

Tesis doctoral. Sevilla, 1979.

AVRUCH, J., LEONE, G.R. y MARTIN, D.B.

Effects of epinephrine and insulin on phosphopeptide metabolism in adipocytes.

J.Biol.Chem. 251: 1511, 1976.

BANTING, F.G. y BEST, C.H.

Pancreatic extracts.

J.Lab.Clin.Med. 7: 464, 1922.

BANTING, F.G. y BEST, C.H.

The internal secretion of the pancreas.

J.Lab.Clin.Med. 7: 465, 1922.

BAR, R.S., GORDEN, P., ROTH, J., KAHN, C.R. y De MEYTS, P.

Fluctuations in the affinity and concentration of insulin receptors on circulating monocytes of obese patients: effects of starvation, refeeding and dieting.

J.Clin.Invest. 58: 1123, 1976.

BAR , R.S. y ROTH, J.

Insulin receptors in disease states of man.

Arch. Intern. Med. 137: 434, 1977.

BECK-NIELSEN, H., PEDERSEN, O., BAGGER, J. y SOSENSEN, N.S.

The insulin receptor in normal and obese persons.

Acta Endocrinologica 83: 565, 1976.

BENNET, V.G. y CUATRECASAS, P.

Insulin receptor of fat cells in insulin resistant metabolic states.

Science 176: 805, 1972.

BENNET, V.G., O'KEEFE, E. y CUATRECASAS, P.

Mechanism of action of cholera toxin and the mobile receptor theory of hormone receptor. Adenylate cyclase interations.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 33, 1975.

BERGERON, J.J.M., LEVINE, G., SIKSTROM, R., O'SHAUGHNESSY, D., KOPRUNA, B., NADLER, N.J. y POSNER, B.I.

Polypeptide hormone binding sites in vivo; initial location of ^{125}I insulin to hepatocytes plasmalemma as visualized by electron microscopic radioautography.

Proc. Natl. Acad. Sci USA 71: 5051, 1977.

BERGERON, J.J.M., POSNER, B.I. y SIKSTROM, R.

Intracellular polypeptide hormone receptors: the demonstration of specific binding sites for insulin and human growth hormone in Golgi fractions isolated from the liver of female rats.

J. Biol. Chem. 253: 4058, 1978.

BERRY, M.N. y FRIEND, D.S.

High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study.

J.Cell. Biol. 43: 506, 1969.

BIHLER, D.A. y MORRIS, J.W.

Preparation and properties of monoiodotyrosine-insulin.

Biochem.J. 130: 321, 1972.

BLUNDELL, T.L., CUTFIELD, J.F., CUTFIELD, S.M., DODSON, E.J., DODSON, G.G., HODKIN, D.C. y MERCOLA, D.A.

Three dimensional atomic structure of insulin and its relationship to activity.

Diabetes. 21: 492, 1972.

BROMER, W.W., BOUCHER, M.E. y PATERSON, J.M.

Glucagon structure and function.II. Increased activity of iodoglucagon.

Biochem.Biophys.Res.Commun. 53: 134, 1973.

BRUSH, J.S.

Purification and characterization of a protease with specificity for insulin from rat muscle.

Diabetes. 20: 151, 1971.

BUTCHER, R.W., BAIRD, C.E. y SUTHERLAND, E.W.

Effect of lipolytic and antilipolytic substances on adenosine 3' 5'-monophosphate levels in isolated fat cells.

J.Biol.Chem. 243: 1705, 1968.

BUTCHER, R.W., CROFFORD, D.B., GAMMELTOFT, S., GLIEMAN, J., GAVIN, J.R., GOLDFINE, I.D., KAHN, C.R., ROBBELLM, J., ROTH, J. y LETTER.

Insulin activity: the solid matrix.

Science. 182: 396, 1973.

CAHILL, G.F., HERRERA, M.G., MORGAN, A.P., SOELDNER, J.S. STEINKE, J., LEVY, P.L., REICHARD, G.A. y KIPNIS, P.M.

Hormone fuel interrelationships during fasting.

J.Clin.Invest. 45: 1751, 1966.

CAHILL, G.F.

Starvation in man.

N.Eng.J.Med. 282: 668, 1970.

CARON, M., PICERD, J. y KERN, P.

Involvement of glycoconjugates in insulin-receptor interactions.

Biochim.Biophys.Acta. 512: 29, 1978.

CARPENTIER, J.L., GORDEN, P., AMHERATT, M., VAN OBBERGHAN, E., KAHN, C.R. y ORCI, L.

¹²⁵I-insulin binding to cultured human lymphocytes.

Initial localization and fate of hormone determined by quantitative electron microscopie autoradiography.

J.Clin.Invest. 61: 1057, 1978.

CATT, K.J., DUFAU, M.L. y TSURUHARA, T.

Gonadotropin receptors in rat testis.

Nature New. Biology. 244: 219, 1972.

CATT, K.J. y DUFAU, M.L.

Basic concepts of the mechanism of action of peptide hormones.

Biol.Reprod. 14: 1, 1976.

CATT, K.J.

Peptide hormone receptors.

Ann.Rev.Physiol. 39: 529, 1977.

CATT, K.J. y DUFAU, M.L.

Receptors for gonadotropic hormones. En: Isolation of hormone receptors. Ed. G.S. Levey. M.Dekker Inc., New York, 171, 1977.

CHANDLER, M.L. y VARANDANI, P.T.

Kinetic analysis of the mechanism of insulin degradation by glutathione-insulin transhydrogenase. (Thiol: protein disulfide oxidoreductase).

Biochemistry 14: 2107, 1975.

CHANG, K.J., HUANG, D. y CUATRECASAS, P.

The defect in insulin receptors in obese-hyperglycemic mice: a probable accompaniment of more generalized alterations in membrane glycoproteins.

Biochem.Biophys.Res.Cummun. 64: 566, 1975.

CIZEK, K.J., SINCHON, S. y NOCENTI, M.R.

Effects of fasting of plasma volume and fluid and sodium exchanges in male rabbits.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 154: 299, 1977.

COHEN, P., ANTONIW, J.F., NIMMO, H.G. y YEAMAN, S.J.
Protein phosphorylation and hormone action. En: Poly-
peptide hormones: Molecular and cellular aspects.
Ciba Found Symp. 41. Elsevier, Excerpta Medica, North
Holland, Amsterdam, 281: 1976.

COLEMAN, R. y FINEAN, J.B.
Preparation and properties of isolated plasma membranes
from guinea-pig tissues.
Biochim.Biophys. Acta 125: 197, 1966.

COLEMAN, R., MICHELL, R.H., FINEAN, J.B. y HAWTHORNE, J.N.
A purified plasma membrane fraction isolated from rat
liver under isotonic conditions.
Biochim.Biophys. Acta, 135: 573, 1967.

CROFFORD, O.B.
Time course of termination of the glucose transport
action of insulin in adipocytes.
J.Biol.Chem. 250: 7089, 1975.

CUATRECASAS, P.
Interaction of insulin with the cell membrane: the pri-
mary action of insulin.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 63: 450, 1969.

CUATRECASAS, P.
Unmasking of insulin receptors in fat cells and fat cell
membranes.
J.Biol.Chem. 246: 6532, 1971 a.

CUATRECASAS, P.

Properties of the insulin receptor of isolated fat cells membranes.

J.Biol.Chem. 246: 7265, 1971 b.

CUATRECASAS, P.

Properties of the insulin receptor isolated from liver and fat cell membranes.

J.Biol.Chem. 247: 1980, 1972 a.

CUATRECASAS, P.

Isolation of the insulin receptor of liver and fat-cell membranes.

Proc.Natl.Acad.Sci USA. 69: 318, 1972 b.

CUATRECASAS, P.

Insulin receptor of liver and fat cell membrane.

Fed. Proc. 32: 1858, 1973.

CUATRECASAS, P.

Membrane receptors.

Ann.Rev.Biochem. 43: 169, 1974.

CZECH, M.P.

Molecular basis of insulin action.

Ann.Rev.Biochem. 46: 359, 1977.

DE KRETZER, D.A., CATT, K.J., BURGER, H.G. y SMITH, G.C.

Radioautographic studies on the localization of ^{125}I labeled human luteinizing and growth hormone in immature males rats.

J.Endocrinol. 43: 105, 1969.

DE MEYTS, P., ROTH, J., NEVILLE, D.M., GAVIN, J.R. y
LESNIAK, M.A.

Insulin interactions with its receptors: experimental
evidence for negative cooperativity.

Biochem.Biophys.Res.Commum. 55: 154, 1973.

DE MEYTS, P.

Cooperative properties of hormone receptors in cell
membranes.

J.Supramol.Struct. 4: 241, 1976.

DE MEYTS, P., VAN OBERGHEN, E., ROTH, J., WOLLMER, A.
y BRANDEUBURG, D.

Mapping of the residues responsible for the negative
cooperativity of the receptor binding region of insulin.

Nature. 273: 504, 1978.

DE ROBERTIS, E.

Molecular biology of synaptic receptors.

Science, 171: 963, 1971.

DE ZOETEN, L.W. y HAVINGA, E.

The reactivity of the tyrosine residues in insulin with
respect to iodine II.

Res.Trar.Chim.Pays-Bas Belg. 80: 907, 1961.

DUCKWORTH, W.C., HEMEMANN, M.A. y KITABCHI, A.E.

Purification of insulin specific protease by affinity
chromatography.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 69: 3698, 1972.

DUFAU, M.L., CHAMEAN, E.H. y CATT, K.J.

Characteristics of a soluble gonadotropin receptor from the rat testis.

J.Biol.Chem. 248: 6973, 1973.

DUFAU, M.L., RYAN, D., CATT, J.

Disulphide forms of gonadotropin receptors are esencial for specific binding of human chorionic ganadotropin.

Biochim.Biophys.Acta. 343: 417, 1974.

ELDEFREWI, M.E., ELDEFREWI, A.T. y SHAMOO, A.E.

Molecular and fuctional properties of the acethyl choline receptor.

Ann.N.Y. Acad.Sci. 264, 183, 1973.

EVANS, W.H.

Subfractination of rat liver plasma membranes.

Febs.Letter. 3: 237, 1969.

EVANS, W.H.

Fractionation of liver plasma membranes prepared by zonal centrifugation.

Biochem.J. 116: 833, 1970.

FELIG, P., OWEN, O.E., WAHAREN, J. y CAHILL, G.F.

Amino acid metabolism during prolonged starvation in human pregnancy.

J.Clin.Invest. 48: 584, 1969.

FORGUE, M.E. y FREYCHET, P.

Insulin receptor in the hearth muscle. Demostration of specific binding sites and impairment of insulin binding in the plasma membrane of the obese hiperglycemic mouse.

Diabetes. 24: 715, 1975.

FORGUE, M.E., MARESCOT, M.R. y PRIETO, J.C.

Insulin receptors in rat intestinal epithelial cells.
Excerpta Med.Int.Congr.Ser, 481: 66, 1979.

FREEMAN, C., KAROLY, K. y ADELMAN, R.C.

Impairments in availability of insulin to liver in vivo and in binding of insulin to purified hepatic plasma membrane during aging.

Biochem.Biophys.Res.Comm. 54: 1573, 1973.

FREYCHET, P., ROTH, J. y NEVILLE, D.M.Jr.

Monoiodoinsulin: demonstration of its biological activity and binding to fat cells and liver membranes.

Biochem.Biophys.Res. Commun. 43: 400, 1971 a.

FREYCHET, P., ROTH, J. y NEVILLE, D.M.Jr.

Insulin receptors in the liver: specific binding of ^{125}I insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity.

Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 68: 1833, 1971 b.

FREYCHET, P., KAHN, C.R., ROTH, J. y NEVILLE, D.M.Jr.

Insulin interactions with liver plasma membranes: independence of binding of the hormone and its degradation.

J.Biol.Chem. 247: 3953, 1972 a.

FREYCHET, P., LAUDAT, M.H., LAUDAT, P., ROSSELIN, G., KAHN, C.R., GEORDEN, P. y ROTH, J.

Impairment of insulin binding to the fat cell plasma membrane in the obese hyperglycemic mouse.

Febs Lett. 25: 239, 1972 b.

FREYCHET, P., KAHN, C.R., ROTH, J. y NEVILLE, D.M.Jr.
Insulin receptors in liver cell plasma membranes.
En: Endocrinology (Ed. R.O. Scow) Proc. 4th Int. Congr.
Endocrinol. 1972. Int. Congr.Ser.N. 256, Excerpta Me-
dica, Amsterdam, 335, 1973.

FREYCHET, P.

The interations of proinsulin with insulin receptors on
the plasma membrane of the liver.
J.Clin.Invest. 54: 1020, 1974.

FREYCHET, P.

Insulin receptor. En: Methods in Receptors Research.
Ed. Melvin Blecher, M. Dekker, New York, 385, 1975.

FREYCHET, P.

Recepteurs de l'insuline.
Diabet. Metab. 1: 57, 1975 b.

FREYCHET, P.

Interations of polypeptide hormones with cell membrane
specific receptors: studies with insulin and glucagon.
Diabetologia 12: 83, 1976.

GAMMELTOFT, S. y GLIEMANN, J.

Binding and degradation of 125 I-insulin by isolated rat
fat cells.

Biochim.Biophys. Acta 320: 16, 1973.

GARRAT, C.J.

Effect of iodination on the biological activity of insulin.
Nature 201: 1324, 1964.

GARRAT, C.J., JARRET, R.J. y KEEN, H.

The relationship between insulin association with tissues and insulin action.

Biochim.Biophys.Acta. 121: 143, 1966.

GAVIN, J.R., ROTH, J., JEU, P. y FREYCHET, P.

Insulin receptors in human circulating cells and fibroblasts.

Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 69: 747, 1972.

GAVIN, J.R., GORDEN, P. y ROTH, J.

Characteristics of the human lymphocyte insulin receptor.

J.Biol.Chem. 248: 2002, 1973.

GAVIN, J.R., ROTH, J., NEVILLE, D.M., DE MEYTS, P. y

BUEL, D.N.

Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations: a direct demonstration in cell culture.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 71: 84, 1974.

GELETHOR, T.D. y TOMKINS, G.M.

Post-transcriptional control of tyrosine aminotransferase synthesis by insulin.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 66: 390, 1970.

GINSBERG, B.H., KAHN, C.R., ROTH, J. y DE MEYTS, P.

Insulin-induced dissociation of its receptor into subunits: possible molecular concomitant of negative cooperativity.

Biochem.Biophys.Res.Comm. 73: 1068, 1976.

GIORGIO, N.A., JOHNSON, C.B. y BLECHER, M.
Hormone receptors. III. properties of glucagon binding
proteins isolated from liver plasma membranes.

J.Biol.Chem. 249: 428, 1974.

GLIEMANN, J., GAMMELTOFT, S. y VINTEN, J.
Time course of insulin-receptor binding and insulin-
induced lipogenesis in isolated rat fat cells.

J.Biol.Chem. 250: 3368, 1975.

GLOSSMANN, H., BANKEL, A.J. y CATT, K.J.
Properties of angiotensin II receptors in the bovine
and rat adrenal cortex.

J.Biol.Chem. 249: 825, 1974.

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

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

Diabetologia. 15: 235, 1978 a.

GOBERNA, R., ARILLA, E., RUIZ, G., JIMENEZ, J., PRIETO,
J.C. y SOBRINO, F.

Cinética de la secreción de la insulina durante el ayuno.

III Congreso Nacional de Endocrinología 108, 1978 b.

GOBERNA, R., ORTIZ, S., ARILLA, E., BEDOYA, F. y SOBRINO, F.
Modifications of intracellular levels of cAMP in the
beta cell during fasting.

Excerpta Med.Int.Congr.Ser. 481: 75, 1979.

GOLDFINE, I.D., KAHN, C.R., NEVILLE, D.M.Jr., ROTH, J.,
GARRISON, M. y BATES, R.W.

Decreased binding of insulin to its receptors in rats
with hormone induced insulin resistance.

Biochem.Biophys.Res,Commun. 53: 852, 1973.

GOLDFINE, I.D., VIGNERI, R., COHEN, D., PHAM, N.B. y
KALON, C.R.

Intracellular binding sites for insulin are immunologi-
cally distinct from those on the plasma membrane.

Nature. 269: 698, 1977.

GOLDFINE, I.D., JONES, A.L., HRADEK, G.T., WONG, K.Y. y
MOONEY, J.S.

Entry of insulin in human cultured lymphocytes: electron
microscopic autoradiographic analysis.

Science. 202: 760, 1978.

GORDEN, P., CARPENTIER, J.L., FREYCHET, P., LE CAM, A.
y ORCI, L.

Intracellular translocation of iodine-125-labeled insulin
in direct demonstration in isolated hepatocytes.

Science. 200: 782, 1978 a.

GORDEN, P., CARPENTIER, J.L., FREYCHET, P., LE CAM, A.
y ORCI, L.

¹²⁵I-insulin direct demonstration of binding, internaliza-
tion and lysosomal association in isolated rat hepatocytes.

Diabetes, 27 : 450, 1978 b.

GUFFIN, W.L., GAVIN, J.R., LESNIAK, H.A., GORDEN, P.
y ROTH, J.

Water soluble specific growth hormone binding sites
from cultured human lymphocytes. Preparation and partial
characterization.

Endocrinology. 98: 1401, 1976.

HAMLIN, J.L. y ARQUILLA, E.R.

Monoiodoinsulin. Preparation, purification and character-
ization of a biologically active derivative substituted
predominantly on tyrosine A₁₄.

J.Biol.Chem. 249: 21, 1974.

HAOUR, F. y BERTRAND, J.

Insulin receptors in the plasma membrane of human placenta.

J.Clin.Endocrinol. Metab. 38: 334, 1974.

HAUGAARD, N. y MARSH, J.B.

Effect of insulin on the metabolism of adipose tissue
from normal rats.

J.Biol.Chem. 194: 33, 1952.

HAYNES, R.C., SUTHERLAND, E.W. y RALL, T.W.

The role of cyclic adenylic acid in hormone action.

Rec.Prog.Horm.Res. 16: 121, 1960.

HEDESKOW y CAPITO, K.

The effect of starvation on insulin secretion and glucose
metabolism in mouse pancreatic islets.

Biochem.J. 140: 423, 1974.

HEDING, L.G.

Determination of total serum insulin (IRI) in insulin treated diabetic patients.

Diabetologia. 8: 260, 1972.

HEPP, K.D.

Inhibition of glucagon stimulated adenylyl cyclase by insulin.

Febs Lett. 12: 263, 1971.

HEPP, K.D., LANGLEY, J., VAN FUNCKE, H.J., RENNER, R. y KEMLER, W.

Increased insulin binding capacity of liver membranes from diabetic chinese hamsters.

Nature, 258: 154, 1975.

HILL, A.V.

The combinations of haemoglobin with oxygen and with carbon monoxide.

Biochem. J. 7: 471, 1913.

HOLMGREN, J., LONNROTH, I. y SVENNERHOLM, L.

Tissue receptor for cholera exotoxin: postulated structure from studies with GM1 ganglioside and related glycolipids.

J.Infect.Immunol. 8: 208, 1972.

HOLLENBERG, y CUATRECASAS, P.

Methods for the Biochemical identification of insulin receptors. En: Methods in Receptor Research. (ed.M.

Blecher) . Marcel Dekker New York, 429, 1975.

HORVAT, A.

Insulin binding sites on rat liver nuclear membranes:
Biochemical and immunofluorescent studies.

J.Cell Physiol. 97: 37, 1978.

HUNTER, W.M. y GREENWOOD, F.C.

Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone
of high specific activity.

Nature 194: 495, 1962.

ILLIANO, G. y CUATRECASAS, P.

Modulation of adenylate cyclase activity in liver and
fat cell membranes by insulin.

Science 175: 906, 1972.

ILLIANO, G., TELL, G.P.E., SIAGEL, M.I. Y CUATRECASAS, P.

Guanosine 3' 5'-cyclic-monophosphate and the action
of insulin and acetylcholine.

Proc.Natl.Acad.Sci USA. 70: 2443, 1973.

IZZO, J.L., RANCONE, A., IZZO, M.J. y BALEW, F.

Relationship between degree of iodination of insulin
and its biological, electrophoretic and immunochemical
properties.

J.Biol.Chem. 239: 3749, 1964.

JACOBS, S. y CUATRECASAS, P.

The insulin receptor. En: Hormone-receptor interation:
Molecular aspects. Ed. G.S. Levey, Marcel Dekker. Inc.

New York and Basel, 31, 1976.

JACOBS, S., YORAM SHECHTER, K.B. y CUATRECASAS, P.
Purification and properties of insulin receptors from
rat liver membranes.

Biochem.Biophys.Res.Comm. 3: 981, 1977.

JARETT, L. y SMITH, R.M.

Electron microscopic demonstration of insulin receptors
on adipocyte plasma membrane utilizing a ferritin insulin
conjugate.

J.Biol.Chem. 249: 7024, 1974.

JARETT, L. y SMITH, R.M.

Ultrastructural localization of insulin receptors on
adipocytes.

Proc.Natl.Acad.Sci. USA 68: 3526, 1975.

JARETT, L. y SMITH, R.M.

The natural occurrence of insulin receptors in groups
on adipocyte plasma membranes as demonstrated with mono-
meric ferritin-insulin.

J.Supramol.Struct. 6: 45, 1977.

JARETT, L.

Pathophysiology of the insulin receptor.

Human Pathology. 10: 301, 1979.

JEFFERSON, L.S.

Stimulation by insulin and glucagon of α -aminoisobutyric
acid uptake in isolated hepatocytes.

Fed.Proc. (abstract). 213, 1976.

JUNGLAS, R.L.

Role of cyclic 3' 5'-AMP in the response of adipose tissue
to insulin.

Proc.Natl.Acad.Sci. USA 56: 757, 1966.

KAHN, C.R., NEVILLE, D.M.Jr., GORDEN, P., FREYCHET, P.
y ROTH, J.

Insulin receptor defect in insulin resistance: studies
in the obese-hyperglycemic mouse.

Biochem.Biophys.Res.Commun. 48: 135, 1972.

KAHN, C.R., NEVILLE, D.M.Jr. y ROTH, J.

Insulin receptor interaction in the obese-hyperglycemic
mouse. A model of insulin resistance.

J.Biol.Chem. 248: 244, 1973.

KAHN, C.R., FREYCHET, P., ROTH, J. y NEVILLE, D.M.

Quantitative aspects of the insulin receptor interaction
in liver plasma membranes.

J.Biol.Chem. 249: 2249, 1974.

KAHN, C.R.

Membrane receptors for polipeptide hormones. En: Methods
in membrane biology, vol.3 (ed. F.D. Korn).

Plenum Press, New York and London, 1975.

KAHN, C.R.

Membrane receptors for hormones and neurotransmitters.

J.Cell Biol. 70: 261, 1976.

KAHN, C.R. y ROTH, J.

Insulin receptors in disease states. En: Hormone-receptor
interactions: molecular aspects. Ed. G.S. Levey, Marcel
Dekker, Inc. New York and Basel, 1976.

KAHN, C.R., FLIER, J.S., BAR, R.S., ARCHER, J.A.,
GORDEN, P., MARTIN, M.M. y ROTH, J.

The syndromes of insulin resistance and Acanthosis
Nigricans. Insulin receptor disorders in man.

New Eng.J.Med. 294: 739, 1976.

KAHN, C.R., DE MEYTS, P., GINSBERG, B.M. y ROTH, J.
Cooperative properties of hormone receptors.

1st Int.Symp. Hormones Receptors in Digestive Tract,
INSERM Symp. n° 3, 103, 1977.

KAHN, C.R. y BAIRD, K.

The fate of insulin bound to adipocytes:evidence for
compartmentalization and processing.

J.Biol.Chem. 253: 4900, 1978.

KAHN, C.R.

What is the molecular basis for the action of insulin?.

T.I.B.S. 263, 1979.

KAROM. J.H., GRODSKY, G.M. y FORSAM, P.H.

Excessive insulin response to glucose in obese subjects
as measured by immunochemical assay.

Diabetes 12: 196, 1963.

KASUGA, M., AKANUMA, Y., IWAMOTO, Y. y KOSAKA, K.

Effects of fasting and refeeding on insulin receptors
and glucose metabolism in rat adipocytes.

Endocrinology 100: 1384, 1977.

KATZEN, H.M. y VLAHAKES, G.J.

Biological activity of insulin-Sepharose.

Science 179: 1142, 1973.

KISANE, J.M. y ROBINS, E.

The fluorimetric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous system.

J.Biol.Chem. 233: 184, 1958.

KOLTERMAN, O.G., SAEKOW, M. y OLEFSKY, J.M.

The effects of acute and chronic starvation on insulin binding to isolated human adipocytes.

J.Clin.Endocrinol.Metab. 48: 836, 1979.

KOLTERMAN, O.G., GREENFIELD, M., REAVEN, G.M., SAEKOW, M. y OLEFSKY, J.M.

Effect of a high carbohydrate diet on insulin binding to adipocytes and on insulin action in vivo in man.

Diabetes 28: 731, 1979.

KONO, T.

Destruction and restoration of the insulin effector system in isolated fat cells.

J.Biol.Chem. 244: 5777, 1969.

KONO, T. y BARHAM, F.W.

The relationship between the insulin-binding capacity of fat cells and the cellular response to insulin. Studies with intact and trypsin-treated cells.

J.Biol.Chem. 246, 6210, 1971.

KOREMANS, S.G., PERRIN, L.E. y Mc. CALLUM, T.P.

A radioligand binding assay for estradiol measurement in human plasma.

J.Clin.Endocrinol.Metab. 29: 879, 1969.

KRUPP, M.N. y LEVINGSTON, J.N.

Insulin binding to solubilized material from fat cell membranes: evidence for two binding species.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75:2593, 1978.

LAMBERT, B., SUTTER, B.C. y JACQUEMIN, C.

Effect of iodination on the biological activity of insulin,

Horm.Metab.Res. 4: 149, 1972.

LARNER, J., VILLAR PALASI, C., GOLDBERG, N.D., BISOP, J.S.

HUIZING, F., WENGAR, J.I., SASKO, H. y BROWN, W.D.

Hormonal and non hormonal control of glicogen synthesis-
control of transferase phosphatase and transferase I
kinase.

Adv.Enzyme Regul. 6: 409, 1968.

LARNER, J.

Polypeptide hormone receptors.

Fed.Proc. 36: 8, 1977

LE CAM, A. y FREYCHET, P.

Effect of insulin on amino acid transport in isolated
rat hepatocytes.

Diabetologia 15: 117, 1978.

LEFKOWITZ, R., ROTH, J., PRICER, J. y PASTON, W.

ACTH-receptors in the adrenal: specific binding of ACTH
 ^{125}I and its relation to adenyl cyclase.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 65: 745, 1970.

LE MARCHAND, B.Y., ERNEST, G., LOTEN, E.G., ASSIMACO-
POULOS-JEANNET, F., FORGUE, M.E., FREYCHET, P. y JEAN-
RENAUD, B.

Effect of fasting and streptozotocin in the obese-hyper-
glycemic (ob/ob) mouse; apparent lack of a direct rela-
tionship between insulin binding and insulin effects.
Diabetes 26: 582, 1977.

LE MARCHAND, B.Y., FREYCHET, P. y JEAN-RENAUD, B.

Longitudinal study on the establishment of insulin resis-
tence in hypothalamic obese mice.
Endocrinology 102: 74, 1978.

LE MARCHAND, B.Y. y FREYCHET, P.

Effect of fasting and streptozotocin diabetes on insulin
binding and action in the isolated mouse soleus muscle.
J.Clin.Invest. 64: 1505, 1979.

LESNIAK, M.A., ROTH, J., GORDEN, P. y GAVIN, J.R.

Human growth hormone radioreceptor assay using cultured
human lymphocytes.
Nature New Biol. 241: 20, 1973.

LESNIAK, M.A., ROTH, J., GORDEN, P. y GAVIN, J.R.

Binding of human growth hormone to specific receptors in
human cultured lymphocytes.
J.Biol.Chem. 249:1661, 1974.

LEVINE, R., GOLDSTEIN, M.S., KLEINS, S. y HUDDLESTUM, B.
The action of insulin on the distribution of galactose
in eviscerated nephrectomized dogs.

J.Biol.Chem. 179: 985, 1949.

LEVINE, R. y GOLDSTEIN, M.S.

Mechanism of hormone action: on the mechanism of action
of insulin.

Recent. Prog. Horm. Res. 11: 343, 1955.

LEVINE, R.

Cell membrane as a primary site of insulin action.

Fed.Proc. 24: 1071, 1965.

LILAVIVATHANA, V., CAMPBELL, R.G. y BRODEWES.

Control of insulin secretion during fasting in man.

Metabolism. 27: 815, 1978.

LIMBIRD, L.E., DE MEYTS, P., LEFKOWITZ, R.J.

Beta adrenergic receptors: evidence for negative cooperative-
rativity.

Biochem.Biophys.Res.Comm. 64: 1160, 1975.

LIN, S.Y. y GOODFRIEND, T.L.

Angiotensin receptors.

Am.J.Physiol. 218: 1319, 1970.

LIVINGSTON, J.N., CUATRECASAS, P. y LOCKWOOD, D.M.

Insulin insensitivity of large fat cells.

Science, 177: 626, 1972.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J.
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J.Biol.Chem. 193: 265, 1951.

MARSALL, R.N., UNDERWOOD, L.E., VOINA, S.J., FOUSHEE, D.B.
y VAN WYK, J.J.
Characterization of the insulin and somatomedin-c
receptors in human placental cell membranes.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 39: 283, 1974.

Mc INTOSH, C., WARNECKE, C., NIEGER, M., BARNER, A. y
KOBBERLING, J.
Solubilization and partial purification of a growth
hormone receptor from rabbit liver.
Febs.Lett. 66: 149, 1976.

Mc KEEL, D.W. y JARETT, L.
Preparation and characterization of a plasma membrane
fraction from isolated fat cells.
J. Cell Biol. 44: 417, 1970.

MEUNIER, J.C., OLSEN, R.W., CHANGEUX, J.P.
Studies on the cholinergic receptor protein from the
electrophorus electricus.
Febs Lett. 24: 63, 1972.

MICHELL, R.H. y HAWTHORNE, J.N.
Mononucleotidase: Characteristics and activity in the
plasma membrane.
Biochem.Biophys.Res. Commun. 21: 333, 1965.

MULLIN, B.R., FISHMAN, P.H., LEE, G., ALOJ, S.M., LEDLEY, F.D., WINAND, R.J., KOHN, L.D. y BRADY, R.A.

Thyrotropin-ganglioside interactions and their relationship to the structure and function of thyrotropin receptors.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73: 842, 1976.

NEER, E.J.

Vasopressin-responsive, soluble adenylate cyclase from the rat renal medulle.

J.Biol.Chem. 218: 3742, 1973.

NELSON, D.M., SMITH, R.M. y JARETT, L.

Nonuniform distribution and grouping of insulin receptors on the surface of human placental syncytial trophoblast.

Diabetes 27: 530, 1978.

NEVILLE, D.M.Jr.

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

Biochim.Biophys.Acta. 154: 540, 1968.

NEVILLE, D.M.Jr. y KAHN, C.R.

Subcellular particles structure and organelles. En: Methods in molecular Biology, 5, Ed. Laskin, A.I. y Last, J.A.

Marcel Dekker. New York, 57, 1974.

NEWERLY, K. y BERSON, S.A.

Lack of ¹³¹I- insulin binding by isolated rat diaphragm.

Proc.Soc.Exp.Biol. 94: 751, 1957.

OHANAKA, M.

Changes in energy expenditure of human subjects during starvation in relation to endocrine functions.

Nut.Rep.Internat. 14: 681, 1976.

OKA, T. y TOPPERY, J.

Insulin-sepharose and the dynamics of insulin actions.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 68: 2066, 1971.

O'KEEFE, E. y CUATRECASAS, P.

Insulin receptors in murine mammary cells: comparisons in pregnant and non pregnant animals.

Biochim.Biophys. Acta 343: 64, 1974.

OLEFSKY, J.M. y REAVEN, G.M.

Decreased insulin binding to lymphocytes from diabetics patients.

J.Clin.Invest. 54: 1323, 1974.

OLEFSKY. J.M.

Effect of dexamethasone on insulin binding, glucose transport and glucose oxidation of isolated rat adipocytes.

J.Clin.Invest. 56: 1499, 1975.

OLEFSKY, J.M. y REAVEN, G.M.

Effects of age and obesity on insulin binding to isolated adipocytes.

Endocrinology 96: 1486, 1975.

OLEFSKY, J.M., JOHNSON, J., LIN, F. EDWARDS, P. y BAUR, M.D.

Comparison of ^{125}I -insulin binding and degradation to isolated rat hepatocytes and liver membranes.

Diabetes 24: 801, 1975.

OLEFSKY, J.M.

The effects of spontaneous obesity on insulin binding glucose transport and glucose oxidation of isolated rat adipocytes.

J.Clin.Invest. 57: 842, 1976 a.

OLEFSKY, J.M.

Decreased insulin binding to adipocytes and circulating monocytes from obese subjects.

J.Clin.Invest. 57: 1165, 1976 b.

OLEFSKY, J.M.

The insulin receptor: its role in insulin resistance of obesity and diabetes.

Diabetes 25: 1154, 1976 c.

OLEFSKY, J.M. y CHANG, H.

Insulin binding to adipocytes: evidence for functionally distinct receptors.

Diabetes 27: 946, 1978.

OLEFSKY, J.M. y KOBAYASHY, M.

Mechanism of the fasting induced increase in insulin binding to rat adipocytes.

J. Clin. Invest. 61: 329, 1978.

OLEFSKY, J.M. y CHANG, M.

Further evidence for functional heterogeneity of adipocyte insulin receptors.

Endocrinology 104: 462, 1979.

PARK, C.R.

Transport of glucose and other sugar across membranes :
effect of insulin. En: Ciba Found Colloq Endocrinol. (Proc)
Eds. Wolstenholme, G.E.W. y O'Connor, C.M. 9: 240, 1956.

PASTAN, I., ROTH, J. y MACHIA, V.

Binding of hormone to tissue: the first step in poly-
peptide hormone action.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 56: 1802, 1966.

PILKIS, S. y PARK, P

Mechanism of action of insulin.

Ann.Rev.Pharmacol. 14: 365, 1974.

POLLET, R.J., STANDEERT, M.L. y HAASE, B.A.

Insulin binding to human lymphocyte receptor. Evaluation
of the negative cooperativity.

J.Biol.Chem. 252: 5828, 1977.

PORTEOUS, J.W. y CLARK, B.

The isolation and characterization of subcellular
components of the epithelial cells of rabbit small
intestine.

Biochem.J. 96: 159, 1965.

POSNER, B.I.

Insulin receptors in the human and animal placental tissue.

Diabetes 23: 209, 1974.

POSNER, B.I., RAQUIDAN, D., JOSEFSBERG, J. y BERGERON, J.M.

Different regulation of insulin receptors in intracellular
(Golgi) and plasma membranes from liver of obese and lean.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75: 3302, 1978.

PRIETO, J.C., ORTIZ, S., BEDOYA, F., HERRERA, M.T. y GOBERNA, R.

Effect of prolonged fasting upon insulin and glucagon secretion from isolated rat pancreatic islets.

Rev.Esp.Fisiol. 34: 291, 1978.

PRIETO, J.C., LABURTHE, M. y ROSSELIN, G.

Interaction of vasoactive intestinal peptide with isolated intestinal epithelial cells from rat. I. Characterization, quantitative aspects and structural requirements of binding sites.

Eur.J.Biochem. 96: 229, 1979.

RABINOWITZ, D. y ZIERLER, K.L.

Forearm metabolism in obesity and its response to intra-arterial insulin.

J.Clin.Invest. 41: 4173, 1962.

RANDLE, P.J.

Phosphorylation and dephosphorylation of enzymes in the regulation of enzyme activity: a discussion. En: Polipeptide Hormones: Molecular and cellular aspects.

Ciba Found.Symp. 41. Elsevier, Excerpta Medica, North Holland, Amsterdam, 353, 1976.

RAY, T.K., TOMASI, V. y MARINETTI, G.V.

Hormone action at the membrane level. I. Properties of adenylyl cyclase in isolated plasma membranes of rat liver.

Biochim.Biophys.Acta 211: 20, 1970.

RODBELL, M.

Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis.

J.Biol.Chem. 239: 375, 1964.

ROTH, J.

Peptide hormone binding to receptors. A review of direct studies in vitro.

Metabolism. 22: 1059, 1973.

ROTH, J., KAHN, C.R., LESNIAK, M.A., GORDEN, P. DE MEYTS, P., MAGYESI, K., NEVILLE, D.M.Jr., GAVIN, J.R., SOLL, A.H., FREYCHET, P., GOLDFINE, I.D., BAR, R.S. y ARCHER, J.A.
Receptors for insulin NSILA-s and growth hormone: applications to disease states in man.

Recent.Progr.Horm.Res. . 31: 95, 1975.

SCATCHARD, G.

The attractions of proteins for small molecules and ions.

Ann.N.Y.Acad.Sci.USA. 51: 660, 1949.

SCHWARTZ, R.H., BIANCO, A.R., HANDWERGER, B.S. y KAHN, C.R.
A demonstration that monocytes rather than lymphocytes are the insulin binding cells in human peripheral blood mononuclear leukocyte preparations: implications for studies of insulin-resistant states in man.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 72: 474, 1975.

SEALS, J.R., Mc DONALD, J.M. y JARETT, L.

The direct effect of insulin on the labeling of isolated plasma membranes X³² P ATP.

Biochem.Biophys.Res.Comm. 83: 1365, 1978.

SEGLEN, P.D. y SOLHEIN, A.E.

Protein degradation in isolated rat hepatocytes.

Acta Biol.Med.Germ. 36: 1789, 1977.

SHIU, R.P.C. y FRIESEN, H.G.

Solubilization and purification of a prolactin receptor from the mammary gland.

J.Biol.Chem. 249: 7902, 1974.

SIMON, J., FREYCHET, P., ROSSELIN, G. y DE MEYTS, P.

Enhanced binding affinity of chicken insulin in rat liver membranes and human lymphocytes: relationship to the kinetic properties of the hormone receptor interaction.

Endocrinology 100: 115, 1977.

SMITH, A.L., SATTERWAIT, H.R. y SOKOLOFF, L.

Induction of brain beta-hydroxy butyrate deshydrogenase activity by fasting.

Science 163: 79, 1969.

SODOYEZ, J.C., SODOYEZ-GOFFAUX, F., GOFF, M.M., ZIMMERMAN, A.E. y ARQUILA, A.E.

^{127}I or carrier free ^{125}I monoiodoinsulin. Preparation physical, immunological and biological properties and susceptibility to insulinase degradation.

J.Biol.Chem. 250: 4268, 1975.

SOLL, A.H., GOLDFINE, I.D., ROTH, J., KAHN, C.R. y NEVILLE, D.M.Jr.

Thymic lymphocytes in obese (ob/ob) mice: a mirror of the insulin receptor defect in liver and fat.

J.Biol.Chem. 249: 4127, 1974.

SOLL, A.H., KAHN, C.R. y NEVILLE, D.M.Jr.

Insulin receptor deficiency in genetic and acquired obesity.

J.Biol.Chem. 250: 7402, 1975.

SOLL, A.H.

Hormonal regulation of hormone receptor concentration:
a possible mechanism for altered sensitivity to hormones.
En: Biogenesis and turnover of Membrane Macromolecules.
Ed. John Scook, Raven Press, New York, 31:276, 1976.

SOMAN, V.R., KOIVISTO, V.A., GRANTHAM, P. y FELIG, P.
Increased insulin binding to monocytes after acute
exercise in normal man.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 47: 216, 1978.

STADIE, W.C., HANGAARD, N., MARSH, J.B. y HILLS, A.G.
The chemical combination of insulin with muscle from
normals rats.
Am.J.Med.Sci. 218: 265, 1949.

STADIE, W.C., HAUGAARD, N. y VAUGHAN, M.
The quantitative relationbetween insulin and its biologi-
cal activity.
J.Biol.Chem. 200: 745, 1953.

STADIE, W.C.
Current concepts of insulin action.
Physiol.Rev. 34: 52, 1954.

STEINER, D.F.
Insulin and the regulation of hepatic biosynthetic
activity.
Vitam.Horm. 24: 1, 1966.

STEINER, D.F.
Insulin today.
Diabetes 26: 322, 1977.

SUN, J.V., TEPPERMAN, H.M. y TEPPERMAN, J.

A comparison of insulin binding by liver plasma membranes of rats fed a high glucose or a high fat diet.

J.Lipid.Res. 18: 533, 1977.

SUTHERLAND, E.W., OYE, I. y BUTCHER, R.W.

The action of epinephrine and the role of the adenyl cyclase system in hormone action.

Rec.Progr.Horm.Res. 21: 623, 1965.

SUTHERLAND, E.W. y ROBISON, G.A.

The role of cyclic AMP in the control of carbohydrate metabolism.

Diabetes 18: 797, 1969.

TATE, R.L., HOLMES, J.M., KHON, L.D. y WINAND, R.J.

Characteristic of a solubilized Thyrotropin receptor from bovine thyroid plasma membranes.

J.Biol.Chem. 250: 6527, 1975.

TEPPERMAN, H.M., HOLOHAN, P. y TEPPERMAN, J.

Insulin binding and insulin response of adipocytes from rats adapted to fat feeding.

J.Lipid.Res. 17: 588, 1976.

TEPPERMAN, H.M., DE WITT, J. y TEPPERMAN, J.

Hormone effects on glycogenolysis, gluconeogenesis and cyclic AMP production by liver cells from rats fed diets high in glucose or lard.

J.Nutr. 108: 1924, 1978.

TERRIS, S y STEINER, D.F.

Binding and degradation of ^{125}I -insulin by rat hepatocytes.
J.Biol.Chem. 250: 8389, 1975.

TERRIS, S. y STEINER, D.F.

Retention and degradation of ^{125}I -insulin by perfused rat livers.

J.Clin.Invest. 57: 885, 1976.

THOMPSON, W.J., LITTLE, S.A. y WILLIAMS, R.H.

Effect of insulin and growth hormone on rat liver cyclic nucleotide phosphodiesterase.

Biochemistry 10: 311, 1971.

TOMIZAWA, H.M.

Properties of glutathione insulin transhydrogenase from beef liver.

J.Biol.Chem. 237: 3393, 1962.

VARANDANI, P.T.

Insulin degradation and identification of insulin degrading activity of rat liver plasma membrane as glutathione-insulin transhydrogenase.

Biochem.Biophys.Res.Comm. 55: 689, 1973.

VIGNERI, R., GOLDFINE, I.D., WONG, K.Y., SMITH, G.J.

y PEZZINO, V.

The nuclear envelope: the major site of insulin binding in rat liver nuclei.

J.Biol.Chem. 253: 2098, 1978.

WARD, W.F. y MARTIMORE, G.E.

Evidence for a role of lysosomes in insulin degradation.
Diabetes 27: 450, 1978.

WICKS, W.D.

Induction of hepatic enzymes by adenosine 3',5'-monophosphate in organ culture.

J.Biol.Chem. 244: 3941, 1969.

WIERINGA, T. y KRANS, H.M.J.

Reduced glucose transport and increased binding of insulin in adipocytes from diabetic and fasted rats.

Biochim.Biophys.Acta. 538: 563, 1978.

WOHLTMANN, H.J. y NARAHARA, H.T.

Binding of insulin ¹³¹I by isolated frog sartorius muscles: relationship to changes in permeability to sugar caused by insulin.

J.Biol.Chem. 241, 4931, 1966.

YOUNG, V.R. y SCRIMSHAW, N.S.

The physiology of starvation.

Scientific American 225: 14, 1971

FACULTAD DE FARMACIA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
MA. Teresa HERRERA DEL REY
titulada **Modificaciones de los receptores hepá-
ticos de insulina durante el ayuno.**

acordó otorgarle la calificación de **Sobresaliente**
"cum laude"

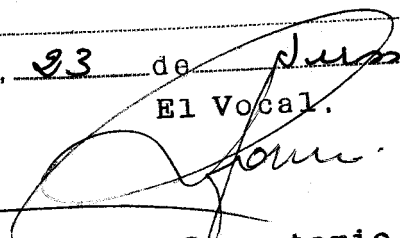
Sevilla, **23** de **Junio** de 1.9**80**

El Vocal.

El Vocal.

El Vocal.


El Presidente.


El Secretario.


El Doctorado.

