

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Propiedades biológicas e inmunológicas del glucagón
extrapancreático : factores que regulan su síntesis y
secrección**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ana María Pérez Castillo

Madrid, 2015



PROPIEDADES BIOLÓGICAS E INMUNOLÓGICAS DEL GLUCAGÓN
EXTRAPANCREÁTICO. FACTORES QUE REGULAN SU SÍNTESIS
Y SECRECIÓN.

VºBº
EL PONENTE

FDO: Dr. ANGEL MARTIN MUNICIO

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR
AL GRADO DE DOCTOR EN CIEN-
CIAS BIOLÓGICAS

POR

ANA MARIA PEREZ CASTILLO

MADRID, MAYO DE 1980



R. 23,160

A ANGEL

VºBº

Esta tesis ha sido realizada en el Instituto Gregorio Marañón - del Consejo Superior de Investigaciones Científicas bajo la - dirección del Dr. Enrique Blázquez Fernandez.

En primer lugar deseo vivamente expresar mi profundo agradecimiento al Dr. Enrique Blázquez Fernandez por su dirección, apoyo y constante estímulo y enseñanza durante la realización del presente trabajo.

Quiero asimismo manifestar mi agradecimiento a mis compañeros de trabajo María y Beatriz y la colaboración de los Drs. Alonso y Granados.

Asimismo de una forma muy especial la amistad y colaboración de los Dres. Rosa de Andrés y Francisco Díaz-Gonzalez.

También deseo mostrar mi agradecimiento al Dr. Angel Martín Municio por aceptar presentar este trabajo y por su revisión del manuscrito.

INDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCION	
1.- ANTECEDENTES HISTORICOS	2
2.- ASPECTOS FILOGENETICOS Y ONTOGENICOS DE LAS CELULAS A, B Y D.	4
2.1.- Características morfológicas de las células en- docrinas del páncreas. Interrelaciones morfo- funcionales.	9
2.2.- Aspectos citológicos de los procesos de síntesis y secreción de glucagón.	13
2.3.- Bases citológicas del glucagón extrapancreático.	14
3.- BIOSINTESIS DE GLUCAGON	16
3.1.- Características del GLI.	18
4.- MECANISMOS DE CONTROL PARA LA SECRECION DE GLUCAGON	22
5.- MECANISMO DE ACCION DEL GLUCAGON	26
6.- EFECTOS METABOLICOS Y PAPEL FISIOLÓGICO DEL GLUCAGON	32
OBJETIVOS	39
MATERIAL Y METODOS	
1.- REACTIVOS	42
2.- ESTUDIOS EN HUMANOS	43

3.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION	43
3.1.- Tratamiento de los animales y toma de muestras sanguíneas.	44
4.- EXTRACCION DE GLUCAGON, GLI E INSULINA DE TEJIDOS HUMANOS Y DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION.	45
5.- DETERMINACION DE GLUCOSA EN PLASMA	46
6.- DETERMINACIONES HORMONALES EN PLASMA Y EXTRACTOS TISULARES.	48
6.1.- Fundamentos y validez del radioinmunoensayo para la valoración de hormonas polipeptídicas.	48
6.2.- Radioinmunoensayo de glucagón.	49
6.2.1.- Marcaje y aislamiento del glucagón mono- ¹²⁵ _I .	51
6.2.2.- Especificidad de los antisueros.	54
6.2.3.- Método.	56
6.2.4.- Cálculos.	58
6.3.- Radioinmunoensayo de GLI.	59
6.3.1.- Características del antisuero.	60
6.3.2.- Método y cálculos.	60

6.4.- Radioinmunoensayo de insulina.	61
6.4.1.- Marcaje y aislamiento de insulina mono - 125 I.	62
6.4.2.- Características del antisuero.	65
6.4.3.- Método y cálculos.	65
7.- IDENTIFICACION DE LOS COMPONENTES INMUNOREACTIVOS PARA GLUCAGON, GLI E INSULINA EN EXTRACTOS EXTRA- PANCREATICOS.	67
7.1.- Caracterización tras filtración con Bio-Gel - P-30.	67
7.1.1.- Elución con tampón de glicocola.	67
7.1.2.- Elución con ácido acético.	67
7.2.- Caracterización tras electroforesis en gel de poliacrilamida.	68
8.- ACTIVIDAD BIOLOGICA DEL GLUCAGON INMUNOREACTIVO PRE- SENTE EN EXTRACTOS EXTRAPANCREATICOS.	73
8.1.- Aislamiento de membranas hepáticas de rata.	73
8.1.1.- Grados de pureza de las membranas hepáticas de rata : actividad de la 5' nucleotidasa y unión de glucagón mono - 125 I a su receptor durante las distintas etapas del proceso de purificación.	74

8.1.2.- Conservación de las membranas hepáticas.	76
8.2.- Desplazamiento del glucagón - mono - ^{125}I unido a sus receptores hepáticos por alícuotas de extractos pancreáticos y extrapancreáticos y - glucagón pancreático cristalino.	77
8.2.1.- Características del ensayo biológico.	77
8.2.2.- Separación de la hormona unida al receptor de la hormona libre.	78
9.- BIOSINTESIS DE GLUCAGON.	79
9.1.- Estudios en ratas.	79
9.1.1.- Obtención de células aisladas de glándulas submaxilares y timo .	79
9.1.2.- Aislamiento de hepatocitos.	80
9.1.3.- Procedimiento seguido en las incubaciones de células aisladas o trozos de tejido - con triptófano - ^3H .	81
9.1.4.- Purificación parcial de las formas inmuno- reactivas de glucagón extrapancreático.	82
9.1.5.- Detección de polipéptidos - ^3H inmunoreactivos con el anticuerpo 30K.	83
9.2.- Biosíntesis de glucagón por las glándulas salivares humanas.	84

10.- FACTORES QUE MODULAN LA SECRECION DE GLUCAGON EXTRA- PANCREATICO.	84
10.1.- Estudios " in vivo ".	84
10.1.1.- Secreción de glucagón extrapancreático en condiciones basales y tras la sobre- carga intravenosa de arginina en perros.	84
10.2.- Estudios " in vitro ".	85
10.2.1.- Control de la secreción de glucagón en células aisladas y trozos de tejido de la rata o células aisladas de glándulas salivares humanas.	85
RESULTADOS	
1.- CONCENTRACIONES DE GLUCOSA, GLUCAGON, GLI E INSULINA EN EL PLASMA DE RATAS CONTROLES Y DIABETICAS.	86
2.- DISTRIBUCION TISULAR DE GLUCAGON, GLI E INSULINA.	86
2.1.- Ratas controles.	86
2.2.- Ratas diabéticas.	90
3.- CARACTERES DISTINTIVOS INTERESPECIES EN LA DISTRI- BUCION TISULAR DEL GLUCAGON EXTRAPANCREATICO.	94
4.- CARACTERIZACION DE LAS FORMAS INMUNOREACTIVAS DE GLUCAGON, GLI E INSULINA DE ORIGEN PANCREATICO Y EXTRAPANCREATICO.	96

4.1.- Fraccionamiento cromatográfico.	96	
4.1.1.- Fraccionamiento cromatográfico de las formas inmunoreactivas de glucagón.	96	3
4.1.2.- Fraccionamiento cromatográfico de las formas inmunoreactivas de GLI.	101	
4.1.3.- Fraccionamiento cromatográfico de las formas inmunoreactivas de insulina.	105	7
4.2.- Movilidad electroforética.	105	1
4.2.1.- Movilidad electroforética de las formas inmunoreactivas de glucagón.	105	
4.2.2.- Movilidad electroforética de las formas inmunoreactivas de GLI.	107	5
4.2.3.- Movilidad electroforética de las formas inmunoreactivas de insulina.	111	
4.3.- Caracterización inmunológica : curvas de dilución.	111	7
4.3.1.- Caracterización inmunológica de las formas inmunoreactivas de glucagón.	111	0
4.3.2.- Caracterización inmunológica de las formas inmunoreactivas de insulina.	113	4
5.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL GLUCAGON INMUNOREACTIVO PRESENTE EN EXTRACTOS PANCREÁTICOS Y EXTRAPANCREÁTICOS	113	7

7.1.- Estudios " in vivo ".	137
7.1.1.- Secreción de glucagón pancreático y extrapancreático en condiciones basales y tras la sobrecarga intravenosa de arginina en perros normales.	137
7.1.2.- Modificaciones de la secreción de glucagón pancreático y extrapancreático en perros diabéticos.	137
7.2.- Estudios " in vitro "	139
7.2.1.- Efecto de diferentes metabolitos y hormonas sobre la secreción de glucagón por células aisladas de glándulas salivares de rata y humanos.	139
7.2.2.- Efecto de diferentes metabolitos y hormonas sobre la secreción de glucagón por células aisladas y trozos de tejido de rata.	142
DISCUSION	145
CONCLUSIONES	167
BIBLIOGRAFIA	170

ABREVIATURAS



AMP : adenosina 3'5'monofosfato.

BSA : Albúmina bovina.

EDTA : Acido etilendiamino tetraacético

GIP : Péptido inhibidor gástrico.

GLI : Inmunoreactividad semejante al glucagón.

IRG : Glucagón inmunoreactivo.

POPOP : 1,4 bis 2-(5-feniloxazolil)-benceno

PPO : 2,5 difenil oxazol.

TCA : Acido tricloroacético.

TRIS : Tris - (hidroximetil) - aminometano.

VIP : Péptido intestinal vasoactivo.

INTRODUCCIÓN

1.- ANTECEDENTES HISTORICOS

Durante mucho tiempo los anatomistas reconocieron al páncreas como uno de los órganos principales, pero los comparativamente diminutos "islotos" endocrinos no fueron descubiertos hasta 1869 por Langerhans. El primer estudio importante sobre la génesis embriológica de los tejidos pancreáticos endocrino y exocrino fue realizado en 1893 por Laguesse (LAGUESSE, 1893), el cual concluyó que los dos tejidos tienen un origen epitelial común en lugar del origen mesenquimatoso propuesto por Hansemann en 1894. Numerosos estudios descriptivos realizados posteriormente han conducido al descubrimiento de los tipos celulares presentes en los islotes y de las hormonas segregadas por ellos.

Los esfuerzos realizados para purificar y caracterizar la insulina condujeron a la observación de que los extractos pancreáticos producían, en perros pancreatectomizados, una respuesta hiperglucémica inicial. Un año después Kimbal y Murlin (KIMBAL y MURLIN, 1924) llamaron "glucagón", o movilizador de glucosa, a este factor hiperglucémico.

A partir de entonces, otros investigadores aportaron nuevas evidencias de la acción glucogenolítica del glucagón y realizaron los primeros intentos para purificar e identificar este componente.

En 1953 Staub y col (STAUB y col., 1953) obtuvieron - glucagón porcino cristalino a partir de una fracción pancreática. El glucagón bovino fue aislado por un método similar. En 1956 Bromer y col. (BROMER y col., 1956) publicaron los resultados de sus investigaciones relativas a la elucidación de la estructura primaria del glucagón y propusieron que era un oligopéptido lineal de - 29 residuos aminoácidos con la siguiente secuencia :

H₂N - His - Ser - Gln - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Tyr -
 Ser - Lys - Tyr - Leu - Asp - Ser - Arg - Arg - Ala - Gln - Asp -
 Phe - Val - Gln - Trp - Leu - Met - Asn - Thr - COOH

En 1967 Wunsh y col (WUNSH y col., 1967) describieron la síntesis química completa del glucagón y mostraron que este material sintético poseía la misma composición de aminoácidos y unas características fisiológicas e inmunológicas semejantes a la hormona humana y porcina.

El glucagón porcino, al igual que el humano y bovino, es un polipéptido de cadena única con 29 residuos aminoácidos y con un peso molecular de 3485. La composición de aminoácidos, forma de cristalizar y comportamiento electroforético del glucagón de conejo, camello y rata indican su identidad con la hormona porcina. Se ha podido también aislar glucagón a partir de aves (pato, pavo y pollo) y de peces (rape y tiburón), poseyendo la hormona de todos ellos el mismo número de aminoácidos que el glucagón porcino y siendo la hormona del rape la que más difiere en su estructura primaria del glucagón porcino, seguido por la del tiburón y por último la de aves cuya secuencia es muy similar a la secuencia del glucagón porcino.

Los cristales de glucagón pertenecen al sistema cúbico, - teniendo tres ejes de igual longitud con intersecciones en ángulos - rectos.

En soluciones acuosas ácidas el glucagón forma fibrillas y geles que se redisuelven a pH 11. La limitada solubilidad acuosa del glucagón y la facilidad de formación de fibrillas y cristales son evidencias de que las moléculas de la hormona tienden a agregarse mucho en solución.

En soluciones acuosas diluidas ($< 1\text{mg/ml}$) el glucagón exhibe muy poca, o ninguna, estructura ordenada. A altas concentraciones de la hormona en solución alcalina (BLANCHARD y KING, 1966) o en 2-cloroetanol, el contenido en α -hélice parece superar el 50%. El glucagón es capaz de dramáticos cambios conformacionales desde una estructura β -laminar en soluciones acuosas diluidas a otra β -estructura en geles ácidos o α -hélice en los cristales. Bajo condiciones fisiológicas, probablemente predomine la estructura β -laminar, pero no puede ser excluida la posibilidad de que ocurran cambios conformacionales tras la unión con su receptor en las células diana.

2.- ASPECTOS FILOGENÉTICOS Y ONTOGENÉTICOS DE LAS CELULAS A, B Y D.

En invertebrados, los elementos funcionales del páncreas exocrino y el hígado están combinados. La existencia en ellos de insulina no fue conocida hasta hace unos pocos años (TOMBES, 1970); sin embargo, estudios más recientes han demostrado que la insulina, o una molécula mayor conteniendo insulina, está presente en tejidos gastrointestinales de una serie de especies de Protóstomos y Deuteróstomos. Por otro lado, células que se parecían a las células B de vertebrados fueron identificadas en la mucosa intestinal del caracol "Buccinum undatum" (BOQUIST y col., 1971). Assan y col. (ASSAN y col., 1969) pudieron también detectar glucagón inmunoreactivo en el hepatopáncreas, pero no en el intestino del camarón "Cancer pagurus", y en extractos de animales del Tunicado "Cynthia papillosa" y el Cefalocordado "Branchiostoma lanceolatum".

En la mayoría de los vertebrados inferiores, el páncreas exocrino se encuentra parcialmente incluido en el hígado, mientras que la mayoría del tejido endocrino forma una masa separada conectada al

conducto biliar del que, aparentemente, se origina. La porción endocrina del páncreas contiene células B con sus típicas características ultraestructurales. No se han podido observar células A ni D, y las determinaciones radioinmunológicas de glucagón han sido negativas (FALKMER, 1966) ; incluso altas dosis de glucagón de mamíferos administradas a la lamprea (BENTLEY y FOLLET, 1965) no han producido efecto hiperglucemiante.

En Elasmobranquios y Holocéfalos, las células endocrinas están dispuestas en monocapa como una cubierta periférica alrededor del conducto pancreático, encontrándose el páncreas exocrino - separado del hígado y entremezclado con elementos endocrinos (EPPLE, 1967). Observaciones hechas al microscopio óptico demuestran la presencia de células A, B y D y, también, de células "agranuladas". Experimentos recientes indican que los Elasmobranquios poseen mecanismos endocrinos capaces de regular los niveles de glucosa en sangre, aunque estos parecen ser muy distintos de los que poseen otros - vertebrados inferiores y los mamíferos.

En los Teleósteos, la distribución histológica se modifica sensiblemente. En la mayoría de ellos, el páncreas exocrino se distribuye difusamente en el mesenterio y el páncreas endocrino forma un órgano aislado de él (KENT, 1969). En otros Teleósteos, el páncreas exocrino se distribuye a través del hígado y las células endocrinas forman islotes que, aparentemente, derivan de digitaciones celulares pancreáticas no diferenciadas. En todas las especies investigadas se han encontrado tres tipos de células granuladas, A, B y D, tanto como elementos "agranulados". En los restantes vertebrados superiores la mayoría de las células endocrinas se encuentran en grupos vascularizados incluidos en la glándula exocrina (MILLER, 1960).

El páncreas exocrino, páncreas endocrino, duodeno e hígado están relacionados fisiológica, funcional y evolutivamente. Las células endocrinas presentes en el intestino y páncreas forman lo que se ha llamado sistema endocrino "gastro-entero-pancreático" - (GEP) (WADDELL y col., 1968 y FUJITA, 1974). Varias hormonas de la región gastro-duodenal-pancreática tienen una doble distribución, encontrándose tanto en el intestino como en el páncreas.

El reconocimiento de unas características funcionales y citoquímicas comunes de las células endocrinas del sistema gastro-entero-pancreático y de otros órganos, condujo a Pearse al desarrollo del concepto APUD (PEARSE, 1966b y PEARSE, 1969). Las células pertenecientes al sistema APUD tienen la propiedad común de tomar y descarboxilar sustancias precursoras de aminas (en el páncreas endocrino se ha mostrado que monoaminas biógenas pueden influir - en la secreción de sus productos hormonales) (PEARSE, 1971 y - HELLER y LEDERIS, 1971). Según Pearse, estas células comparten además una serie de características citoquímicas comunes : alta actividad esterásica o colinesterásica no específicas, alto contenido en α -glicerofosfato menadión reductasa e inmunofluorescencia específica y ultraestructurales : membranas rodeando vesículas - de secreción, escaso retículo endoplásmico rugoso (RER), abundante retículo endoplásmico liso (REL), alto contenido en ribosomas libres y unos microtúbulos prominentes incluyendo centrosomas.

Pearse sugirió también (PEARSE y col., 1973) que las células APUD pueden compartir todas estas características porque:

- 1) A pesar de poseer una distinta localización han desarrollado - mecanismos bioquímicos similares para la producción de materiales semejantes (polipéptidos).

- 2) Siendo de distintos orígenes han desarrollado unos mecanismos - bioquímicos similares en respuesta a estímulos secretorés semejantes (aminérgicos o colinérgicos).
- 3) Tienen un origen embriológico común (la cresta neural) y han retenido un patrón común y distintivo de funciones ancestrales.

Mientras es generalmente aceptado que las células acinares pancreáticas migran al páncreas desde el intestino anterior embrionario, Pearse, con su teoría de la cresta neural, planteó una controversia en cuanto al origen de las células de los islotes.

Recientemente, Le Douarin (LE DOUARIN y TEILLET, 1973) y Dieterlen-Lièvre (DIETERLEN-LIÈVRE y BEAUPAIN, 1976) utilizando embriones de pollo, han demostrado que tanto las células cromafines del epitelio digestivo como las células de los islotes pancreáticos derivan del endodermo y no se desarrollan de la cresta neural, aunque pueden compartir todas las características químicas de las células APUD, algunas de las cuales pueden incluso originarse de la cresta neural. Sin embargo, a pesar de estas y otras observaciones el tema del origen de estos tipos celulares está aún en controversia.

En mamíferos, observaciones hechas al microscopio óptico, con los métodos de tinción estandar para los islotes, han revelado que células B conteniendo gránulos pueden distinguirse en el 14º día de desarrollo en el ratón (VON DENFFER, 1970), 16º-17º día - en la rata, 11º día en el hamster y 30º día en el conejo (GRILLO, 1964). Sin embargo, estudios más recientes con el microscopio - electrónico han mostrado la presencia de células granuladas de los islotes en el embrión de rata coincidiendo con el momento de formación del divertículo pancreático, en el 11º día de desarrollo.

Utilizando técnicas inmunohistoquímicas (BEAUPAIN y DIETERLEN-LIEVRE,1974) se ha podido demostrar que en el tercer día de incubación de embriones de pollo el rudimento pancreático dorsal - contiene glucagón. Sin embargo otros autores (TANIZAWA y FUJITA,1966) no pudieron encontrar células A granuladas en el pán - creas embrionario de pollo antes del 6º día de desarrollo. Célu - las A y D han sido observadas en el páncreas embrionario de co - bayas, diferenciándose antes (en el 26º día) las células A que las células D.

Lin (LIN-HSIANG y POTTER,1962) ha sugerido que duran - te el desarrollo embrionario humano aparecen dos generaciones de islotes. Durante la 8ª semana de gestación surgen unos islotes - primarios los cuales alcanzan la madurez durante el 5º mes, des - pués del cual degeneran. Los islotes secundarios se desarrollan de las células de los conductos terminales en el tercer mes de - gestación y constituyen los islotes permanentes de la vida adul - ta. Estos autores piensan que las células A y B se desarrollan - directamente de las células de los conductos. Sin embargo, no se debe ignorar la posibilidad de una transformación del tejido - acinar en células de los islotes, no solo en el adulto sino tam - bién en el embrión. Dieterlen-Lievre (DIETERLEN-LIEVRE,1965) - ha observado células acinares-islotes en embriones de pollo de - 21 días, las cuales contenían gránulos A, B y gránulos de zimógeno.

Ya que la insulina y el glucagón se encuentran en el - páncreas embrionario en estados muy tempranos, es lógico que ejer - zan efectos metabólicos en el embrión en desarrollo. La insuli - na incrementa la asimilación de glucosa del corazón de embrión - de pollo desde el 7º día de incubación, pero no antes, indicando - el desarrollo en el corazón embrionario de un sistema de trans -

porte de glucosa sensible a la insulina (GUIDOTTI y col.,1961). Por otro lado el glucagón provoca una marcada glucogenolisis hepática en embriones de pollo de 9 días (GRILLO,1965).

2.1.- Características morfológicas de las células endocrinas del páncreas. Interrelaciones morfofuncionales.

Estudios realizados con la ayuda del microscopio electrónico han establecido las principales características morfológicas de las células A y B, los cuales, junto a otros estudios realizados con técnicas histoquímicas y de inmunofluorescencia, indican que estas células son el lugar de almacenamiento del glucagón y la insulina. Posteriormente, un tercer tipo de célula, denominada célula D, fue identificada en islotes de humanos y de varias especies de vertebrados considerándola como un tipo celular independiente (FUJITA,1968 y CAVALLERO y SOLCIA,1968) cuyas características ultraestructurales han sido bien establecidas (SHIBASAKI e ITO, 1969 y WELLMANN y col.,1971).

Recientes estudios al microscopio electrónico han indicado que los islotes pancreáticos pueden contener, además de células A, B y D, un cierto número de otros tipos celulares. En el páncreas endocrino de fetos humanos (LIKE y ORCI,1971) se han identificado unas células que podrían ser productoras de serotonina, gastrina y catecolaminas. En islotes de niños con hipoglucemia grave (MITSUGI y col.,1970) se ha observado un cuarto tipo celular con pequeños gránulos secretores. Cuatro tipos celulares han sido también encontrados en islotes de recién nacidos (DECONINCK y col., 1972) y cinco tipos celulares en islotes de adultos.

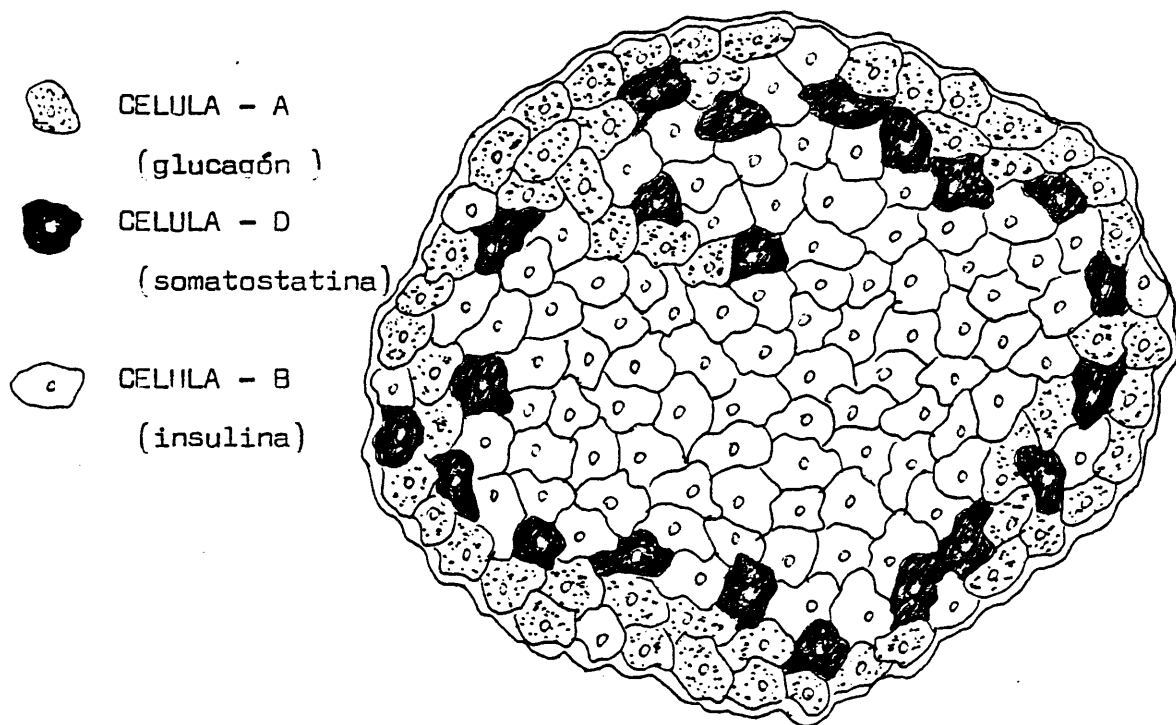
- Célula B. Cada gránulo beta está compuesto de una porción central moderadamente densa rodeada por un saco membranoso esférico. El núcleo es bastante polimorfo pudiendo tomar la forma de barra, rectángulo, esfera o aguja. Entre el núcleo y la membrana hay un amplio espacio vacío característico de este tipo celular.

- Célula A. Los gránulos son redondos, densos y de tamaño medio y están compuestos de una porción central densa rodeada de un halo periférico menos denso. Teniendo en cuenta que con la tinción de plata de Grimelius el centro del gránulo no es reactivo, mientras que los granos de plata se depositan selectivamente en la parte exterior del gránulo y que, por el contrario, estos núcleos reaccionan con anticuerpos antiglucagón (BUSSOLATI y col., 1971), es razonable pensar que en los gránulos alfa, aparte del glucagón, está presente algún otro componente que reacciona positivamente con el método de plata de Grimelius.

- Célula D. En microfotografías electrónicas de islotes humanos, las células D aparecen con una forma ovoide o alargada. Los gránulos son grandes, numerosos y se encuentran empaquetados muy juntos. Estos gránulos están rodeados de una membrana estrechamente aplicada sin ningún tipo de espacio claro entre el saco membranoso y el núcleo esférico. Células D similares a las de los islotes se han localizado en la mucosa gastroduodenal de humanos (KOBAYASHI y col., 1971 y VASSALLO y col., 1971) y varias especies de mamíferos (SOLCIA y col., 1970 y CAPELLA y SOLCIA, 1972). Se ha sugerido que estas células D pueden ser el sitio de producción de la gastrina localizada en el páncreas, pero de una forma inequívoca se sabe que las células D tanto pancreáticas como gastrointestinales, producen somatostatina (ORCI y col., 1976).

Aparte de estos tres tipos celulares descritos se han localizado también otros tipos celulares : 1) pequeñas células granu-
ladas, localizadas fundamentalmente en la periferia de los islotes y
en el estómago (KOBAYASHI y col., 1971) y duodeno humanos (KOBAYA-
SHI y col., 1970) y 2) células mostrando las propiedades de tinción
y la ultraestructura de las células enterocromafines del intestino
(PARRILLA y col., 1969 y LIKE y ORCI, 1976).

Estudios de inmunofluorescencia con sueros antiglucagón, -
antiinsulina y antisomatostatina en secciones seriadas de islotes -
de rata, indican que las células conteniendo glucagón ocupan la par-
te más periférica del islote, mientras que las células conteniendo -
somatostatina forman una capa dispersa de células y poco delimitada
en proximidad a la capa más externa de células conteniendo glucagón.
Las células B ocupan el interior del islote y representan aproxima-
damente el 60% de toda la población celular:



Dada la acción supresora de la somatostatina sobre la liberación de glucagón e insulina y, debido a la localización de las células D entre las células A y B, se ha sugerido que aquellas células podrían ser importantes en el funcionamiento normal del islote bloqueando la liberación de glucagón e insulina.

Análisis al microscopio electrónico junto con técnicas de criocorrosión han revelado la presencia de complejos de unión entre las células de los islotes (ORCI y col., 1975, ORCI y col., 1975 y ORCI y col., 1973). Se han descrito dos tipos de especializaciones de membrana : uniones íntimas y nexos de unión. Las primeras se caracterizan por una oclusión del espacio intercelular debido a la fusión de las capas más externas de membranas plasmáticas adyacentes, siendo más abundantes en áreas donde es necesaria una compartimentalización física del espacio intercelular. Los nexos de unión se piensa que pueden representar rutas de baja resistencia a través de las cuales pueden tener lugar comunicaciones eléctricas y metabólicas de una célula a otra. El papel de estas especializaciones de membrana en el islote no está aún claro, pero su presencia podría explicar ciertos fenómenos observados de la función de los islotes no totalmente explicados en términos exclusivamente de respuestas hormonales a estímulos externos.

La estrecha asociación morfológica entre las células de los islotes, junto con la existencia de especializaciones de membrana, hacen sugerir la existencia de un mecanismo de regulación local intra-islote sobre la liberación de las hormonas producidas por estas células.

2.2.- Aspectos citológicos de los procesos de síntesis y secreción de glucagón.

Se admite actualmente que la síntesis de glucagón comienza con la formación de proglucagón, seguido por su conversión en glucagón y posterior almacenamiento en los gránulos alfa. Aunque la existencia de este precursor está firmemente establecida (HELLERSTROM y col., 1974, NOE y BAUER, 1973, NOE y BAUER, 1975 y O'CONNOR y LAZARUS, 1973), los pasos involucrados en la síntesis de proglucagón y su conversión en la hormona genuina son peor comprendidos que las del par proinsulina-insulina. Sin embargo, por estudios recientes (HOWELL y HLLERSTROM, 1974, NOE y BAUER, 1971 y NOE y col., 1977) se sabe que el proglucagón es inicialmente sintetizado en el retículo endoplásmico rugoso y transportado subsecuentemente a los gránulos de secreción. Este transporte es muy rápido, si se compara con la acumulación de precursores en dicho retículo endoplásmico. La conversión de proglucagón a glucagón ocurre en los gránulos secretores; en ellos, el ritmo de acumulación de péptidos de tamaño igual al glucagón es relativamente bajo lo cual, aunque en parte puede ser atribuido a los procesos de secreción, parece ser debido principalmente a la existencia de un mecanismo lento de conversión de proglucagón a glucagón.

Una vez sintetizado el glucagón, este es liberado al espacio extracelular. Las bases estructurales de esta liberación no están claras. Varios autores han sugerido que esta liberación ocurre a través de una disolución intracitoplasmática del gránulo secretor (MUNGER, 1962, AHOTEN, 1973 y SMITH, 1975), mientras otros han propuesto que el contenido del gránulo es liberado por un me-

canismo de exocitosis (ESTERHUIZEN y HOWELL, 1970, LECLERCQ-MEYER y col. 1976 y UNGER, 1976). Recientemente Carpentier (CARPENTIER y col., 1976) ha estudiado los acontecimientos funcionales y morfológicos involucrados en la secreción de glucagón y observó que la exocitosis es el principal mecanismo responsable de la liberación de glucagón durante la estimulación con arginina, siendo el calcio indispensable para que esto ocurra. Al igual que otras hormonas polipéptidicas, el glucagón se libera fundamentalmente por exocitosis, aunque la existencia de otros mecanismos de secreción no debe ser excluida.

2.3.- Bases citológicas del glucagón extrapancreático.

A partir del descubrimiento de una familia de polipéptidos de origen entérico con inmunoreactividad semejante a la que posee el glucagón pancreático (GLI), se han realizado numerosos estudios inmunocitoquímicos con objeto de localizar las células productoras de GLI. Estas investigaciones se han basado en la utilización de dos tipos de sueros antiglucagón llamados específicos y no específicos o C-terminales y N-terminales, respectivamente.

Con el suero antiglucagón no específico se pudo identificar una población de células inmunoreactivas en la mucosa intestinal post-duodenal (GRIMELIUS y col., 1976, ITO y KOBAYASHI, 1976 y LARRSON y col., 1975). Gracias a la aplicación de técnicas de microscopía electrónica e inmunocitoquímica (POLAK y col., 1971b) sabemos que las células L (CAVALLERO y col., 1972) intestinales sintetizan GLI y poseen características diferenciales con las células A pancreáticas. Sus gránulos son grandes y, en general, redon-

dos con una membrana limitante estrechamente aplicada a la porción más densa a los electrones que representa el acúmulo de GLI. Este GLI posee una reactividad inmunológica semejante a la región 2-23 de la secuencia de aminoácidos del glucagón.

Más recientemente, y con la ayuda de sueros antiglucagón específicos (C-terminales), se han encontrado células conteniendo glucagón en la mucosa oxíntica gástrica de perros (BAETENS y col. 1976 y SUNDLER y col., 1976) y de otros mamíferos (LARRSON y col 1975b) las cuales son indistinguibles de las células A del páncreas poseyendo, al igual que estas, un halo distintivo entre la porción más densa y la membrana del gránulo secretor. Células A han sido también identificadas en un fundus gástrico humano por medio de tinción con inmunoperoxidasas (MUÑOZ-BARRAGAN y col., 1977), pero otros intentos para demostrarlas en mucosa gástrica humana no han dado resultados positivos. En estudios al microscopio electrónico se han observado células A en el estómago de fetos humanos y en el duodeno de humanos adultos y Knudsen (KNUDSEN y col., 1975) ha identificado inmunoreactividad para el glucagón de tipo pancreático en el colon humano. Recientemente también Lawrence (LAWRENCE y col., 1976) ha encontrado en las glándulas salivares de varias especies de animales células con reacciones positivas con sueros antiglucagón.

En 1979 Ravazzola (RAVAZZOLA y col., 1979) utilizando un antisuero específicamente dirigido hacia un GLI intestinal recientemente purificado (glicentina) y que no tiene reacción cruzada con el glucagón, han observado :

1) Que las células L intestinales contienen inmunoreactividad para la glicentina y que este material está localizado en los grá-

nulos secretores y

2) Que la célula A pancreática de rata, cerdo, perro y humanos y la célula A gástrica de perro contienen, en adición al glucagón, una sustancia inmunoreactiva igual que la glicentina.

Estos autores sugieren que la presencia de glicentina en las células A y L apoya fuertemente la idea de que estos dos tipos celulares estén ontogénicamente relacionados.

3.- BIOSINTESIS DE GLUCAGON

Por estudios previos realizados con otras hormonas polipeptídicas o con proteínas sin propiedades hormonales se sabe que estas son sintetizadas como péptidos mayores que la forma circulante biológicamente activa. Parece ser que estos precursores biosintéticos se encuentran al menos divididos en dos clases que han sido denominadas preprohormonas y prohormonas. Estudios encaminados hacia la elucidación del mecanismo de biosíntesis de estas formas parecen indicar que la preprohormona es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso en el cual es rápidamente rota a la forma de prohormona; esta prohormona sería entonces trasladada al complejo de Golgi y condensada en gránulos rodeados de una membrana en los cuales se encontrarían las enzimas responsables de la transformación a la forma activa de la hormona.

El mecanismo de biosíntesis de glucagón es menos conocido que el de la insulina, habiendo sido estudiado en varios sistemas experimentales tales como islotes aislados de paloma (O'CONNOR y LAZARUS, 1976, TUNG, 1973 y TUNG, 1974), islotes de cobayas (HELLERSTROM

y col.,1972,HELLERSTROM y col.,1973 y HOWELL y col.,1974) páncreas de rata aislado y perfundido (O'CONNOR y col.,1973) e islotes pancreáticos humanos (NOE y col.,1975) . En todos ellos se ha podido incorporar triptófano marcado radiactivamente (un componente de la molécula de glucagón que no está presente en ninguna proinsulina caracterizada hasta ahora) en péptidos de un peso molecular de 9000 o mayores. Estudios recientes indican que,al igual que para la mayoría de las hormonas peptídicas, en la biosíntesis del glucagón está involucrado un precursor biosintético (O'CONNOR y col.,1973 , NOE y BAUER,1975,NOE,1977,NOE y col.,1977 y NOE y BAUER,1973). Noe (NOE y BAUER,1977) utilizando islotes aislados de rafe,han caracterizado un precursor de un peso molecular de 11400 ± 400 dalton el cual puede ser hidrolizado por tratamiento con tripsina y quimotripsina dando un péptido de tamaño igual al glucagón. Helderstrom y col. (HELLERSTROM y col.,1974) mostraron incorporación de triptófano- H^3 en un material de 18000 dalton . Trakattellis y col. (TRAKATELLIS y col.,1975) consiguieron también aislar un péptido de un peso molecular de 9000 dalton . Noe y col. (NOE y col.,1975) aportaron por otro lado evidencia de un péptido intermedio de 4900 ± 400 dalton el cual, en muchos aspectos, parece ser similar al fragmento de proglucagón aislado y caracterizado por Tager y Steiner (TAGER y STEINER,1973).

Sin embargo,la mayoría de las investigaciones encaminadas a demostrar la transformación de precursores de alto peso molecular en la molécula de glucagón,o péptidos relacionados con él,no han dado resultados positivos. O'Connor y Lázarus (O'CONNOR y LAZARUS, 1976) estudiando islotes aislados de paloma concluyeron que no existía ningún tipo de relación precursor-producto entre un "macro-

glucagón " de 8500 dalton y el glucagón de 3500. Estos resultados difieren de los encontrados por otros autores (NOE y BAUER,1975) quienes encontraron una transformación de péptidos de un peso molecular entre 9000-12000 dalton a un péptido con un peso molecular aproximado al del glucagón. Análisis posteriores de esta transformación indicaron que esta puede ocurrir en varios pasos en los que estarían implicados uno o más productos intermedios.

3.1.- Características del GLI

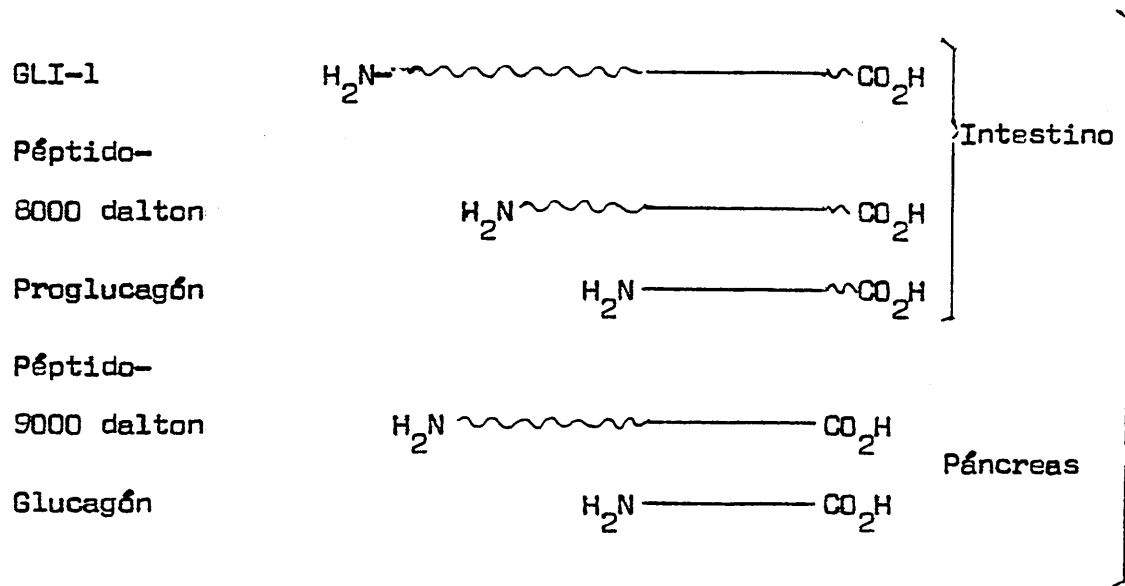
Sutherland y De Duve (SUTHERLAND y De DUVE,1948) demostraron actividad glucogenolítica en extractos alcohol-ácido del tracto gastrointestinal de perros. Posteriormente Makmann y Sutherland (MAKMANN y SUTHERLAND,1964) encontraron que los extractos de la mucosa gastrointestinal de perros y humanos eran capaces de activar la adenilato ciclasa de membranas plasmáticas hepáticas. Posteriormente otros autores (SAMOLS y col.,1965) encontraron que la administración oral de glucosa provocaba un incremento en los niveles de glucagón inmunoreactivo (medidos con antisueros no específicos) circulante y posteriores estudios sugirieron que este componente era de origen intestinal más que pancreático (SAMOLS y col.,1966), relacionado con lo que hoy conocemos como GLI. Unger y col. (UNGER y col.,1966) han confirmado la presencia de GLI en el intestino, encontrando que está presente en grandes cantidades en el yeyuno, íleon y colon y, en pequeñas cantidades, en el estómago y duodeno. Este material intestinal difiere del glucagón pancreático en varios aspectos: mayor peso molecular, reducida actividad glucogenolítica y diferente reactividad inmunológica frente a antisueros contra glucagón. El -

término GLI ha sido propuesto por Unger para denominar a esta serie de polipéptidos sintetizados en las células L intestinales y con una inmunoreactividad semejante a la de la región 2-23 de la molécula de glucagón.

Por otro lado, utilizando anticuerpos específicos (C-terminales) para el glucagón pancreático, dirigidos contra la región 27-29 de su molécula, tres grupos de autores (VRANIC y col., 1974, MATSUYAMA y FOA, 1974 y MASHITER y col., 1975) han mostrado la presencia de niveles normales o incrementados de glucagón en el plasma de perros totalmente pancreatectomizados. Se piensa que este material es semejante al detectado en extractos de la mucosa gastrointestinal (SASAKI y col., 1975 y PENHOS y col., 1975) el cual parece ser sintetizado por las células A localizadas en el estómago y duodeno fundamentalmente . Este glucagón gastrointestinal, en contraste con el GLI de localización post-duodenal, es biológica, inmunológica y fisicoquímicamente indistinguible del glucagón pancreático (SASAKI y col., 1975) y es liberado a la circulación sanguínea en grandes cantidades, especialmente en animales diabéticos (MUÑOZ-BARRAGAN y col., 1976, BLAZQUEZ y col., 1976 y BLAZQUEZ y col., 1977). La existencia de un material semejante al glucagón pancreático en la circulación sanguínea de ratas pancreatectomizadas y completamente evisceradas (PENHOS y col., 1975) han conducido a la búsqueda de otras fuentes de glucagón extrapancreático encontrándose un material inmunoreactivo para glucagón con un peso molecular de aproximadamente 70000 en las glándulas salivares de animales de experimentación y humanos (LAWRENCE y col., 1975, LAWRENCE y col., 1977 y LAWRENCE y col., 1976).

La gran heterogeneidad de péptidos de procedencia intestinal (VALVERDE y col.,1970,UNGER,1973 y MARKUSSEN y SUNDBY,1970) o pancreática (NOE y BAUER,1975,TAGER y STEINER,1973,NOE y col., 1977 y TAGER y STEINER,1974) que reaccionan con antisueros específicos o inespecíficos para glucagón,ha obstaculizado su estudio estructural y las posibles relaciones existentes entre ellos. No obstante,Sundby y col (SUNDBY y col.,1976) han conseguido aislar un péptido de 100 aminoácidos y con un peso molecular de aproximadamente 12000 (GLI-1 o glicentina) a partir de 200 Kg de intestino porcino. Su caracterización parcial ha mostrado que posee las secuencias 7-13 y 27-29 de la molécula de glucagón y que su decapeptido C-terminal es análogo,si no idéntico,al decapeptido C-terminal de un fragmento de proglucagón aislado por Tager y Steiner (TAGER y STEINER,1973) hace unos años. Datos más recientes indican que los últimos 37 residuos aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la glicentina forman la secuencia completa de aminoácidos del glucagón más el octapeptido C-terminal común a la glicentina y al fragmento de proglucagón. Se ha conseguido también caracterizar (TAGER y MARKESE,1979) parcialmente dos péptidos intestinales de 8000 y 12000 dalton: que reaccionan solo con sueros antiglucagón N-terminales y un péptido pancreático con un peso molecular aproximado de 9000 dalton, que no posee ningún resto añadido al extremo carboxilo terminal de la molécula de glucagón.

En el siguiente esquema se resume la información obtenida hasta ahora sobre las secuencias homólogas de los péptidos de procedencia intestinal o pancreática relacionados de alguna forma con el glucagón:



La baja, o nula, inmunoreactividad de la glicentina, y en general de los GLIs intestinales, con sueros específicos para glucagón podría deberse a un enmascaramiento estructural de la secuencia carboxilo terminal de la molécula de glucagón presente en este grupo de péptidos.

Todos los datos químicos e inmunológicos que se poseen hasta ahora, junto con el descubrimiento (RAVAZZOLA y col., 1979) de que un material inmunoreactivo igual que la glicentina está presente en las células A pancreáticas y L intestinales, han conducido a la hipótesis de que 1) los GLIs intestinales de distintas especies contienen la secuencia total homóloga del glucagón, 2) que los precursores del glucagón encontrados en las células A pancreáticas (O'CONNOR y col., 1973, NOE y col., 1975 y NOE y BAUER, 1975) están inmunoquímicamente relacionados con estos polipéptidos y 3) que las células A y L sintetizan sus productos de secreción vía la glicentina o un precursor semejante a la glicentina. La diferencia esencial entre las células gastrointestinales que sintetizan y liberan GLIs y las células A pancreáticas (que sinteti-

zarían glucagón vía "GLIs intestinales") estribaría en la presencia o no de una maquinaria enzimática responsable de la ruptura de los productos primarios hasta la molécula de 3500 dalton o glucagón genuino.

4.- MECANISMOS DE CONTROL PARA LA SECRECIÓN DE GLUCAGÓN

La secreción de glucagón está regulada por factores nerviosos, endocrinos y metabólicos. Asimismo distintas drogas pueden modificar la liberación de esta hormona.

Teniendo en cuenta la importancia del glucagón en la regulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, es lógico pensar que estos combustibles y, especialmente la glucosa, sean determinantes principales de la función secretora de las células A. La glucosa provoca una clara inhibición de la secreción de glucagón (GERICH y col., 1974). In vitro, la respuesta 1/2 máxima y máxima de las células A a la glucosa tiene lugar a una concentración de esta de 5 y 10mM. Una rápida disminución en la concentración de glucosa (< 3mM) provoca una liberación rápida y multifásica de glucagón. El mecanismo por el cual la glucosa suprime la secreción de glucagón es desconocido, pero podría resultar en parte de las posibles interrelaciones entre las células A y B y de la dependencia de la célula A de la secreción de insulina. La glucosa puede, sin embargo, actuar directamente a través de un glucoreceptor. El efecto de la concentración de glucosa en las respuestas de las células A y B puede ser un factor importante en el mantenimiento del estrecho intervalo de glucemia presente en sujetos normales. En ausencia de situaciones de estrés o diabetes, concentra-

ciones elevadas de glucosa son el más potente supresor fisiológico de la secreción de glucagón, y una hipoglucemia acentuada es su más potente estimulante.

Los aminoácidos estimulan la liberación de glucagón de una forma mucho más efectiva que la de insulina. En el perro, asparagina, glicocola y fenilalanina son los más efectivos, mientras que en el hombre es la arginina.

Aunque la elevación experimental de ácidos grasos provoca una disminución en la secreción de glucagón in vivo (EDWARDS y col., 1969) e in vitro (EDWARDS y col., 1970), parece ser que este efecto no es de gran importancia fisiológica. También el β -hidroxibutirato, acetacetato y glicerol afectan la liberación de glucagón (LUYCKX y LEFEBVRE, 1970 y GROSS y MIALHE, 1974) aunque sus efectos varían en las distintas especies y condiciones experimentales utilizadas.

Las hormonas pueden afectar la secreción de las células A de una forma directa o indirecta. Altas concentraciones de glucagón circulante han sido encontradas en pacientes diabéticos juveniles y adultos y en animales hechos diabéticos con estreptozotocina o alloxana, lo cual puede ser corregido por la administración de insulina. Estas observaciones han hecho pensar en un efecto directo de la insulina sobre las células A, aunque el mecanismo involucrado no es bien conocido. Ostenson y col. (OSTENSON y col. 1977) empleando islotes aislados de cobayas observaron que la adición de insulina al medio de incubación provocaba un significativo incremento en el contenido de ATP de la célula A y también un aumento de la utilización de glucosa por estas células, sugiriendo esto que el efecto supresor de la insulina sobre la liberación de

glucagón puede estar mediado a través de una metabolización acelerada de la glucosa por la célula A. Sin embargo, los mecanismos moleculares precisos implicados en la acción de la insulina sobre la célula A y la razón por la cual estas células llegan a ser funcionalmente estimuladas por un decaimiento en los combustibles ricos en energía debe aún ser clarificado.

De las hormonas hipotalámicas, solo la somatostatina se ha mostrado que afecta directamente la liberación de glucagón (FUJIMOTO y PENSINCK, 1976). Este agente inhibe el efecto de todos los estimulantes estudiados para el glucagón. Sin embargo, se ha podido también observar que la administración sistemática de dos péptidos hipotalámicos: Sustancia P y neurotensina (BROWN y VALE, 1976 y CARRAWAY y LEEMAN, 1973) incrementa la concentración plasmática de glucosa y glucagón en la rata.

Las hormonas gastrointestinales pueden también afectar la liberación de glucagón. Se ha observado que la gastrina (UNGER y col., 1967), pancreozimina-colecistoquinina (UNGER y col., 1967) y el péptido inhibidor gástrico (GIP) (BATAILLE y col., 1977) estimulan la liberación de glucagón. El péptido intestinal vasoactivo (VIP), al igual que el GIP, es liberado después de la ingestión de nutrientes y, a través de un mecanismo hormonal clásico, induce la secreción de insulina y glucagón. El VIP, al igual que la somatostatina, al ser producido también por células específicas del páncreas puede modificar la actividad secretora de las células A y B vecinas sin necesidad de ser liberado a la circulación sanguínea.

Por estudios realizados con la ayuda del microscopio óptico y electrónico, se conoce la existencia de terminaciones del

sistema nervioso autónomo próximas a las células A y B (KOBAYASHI y FUJITA,1969). De esta forma se sabe,que las células A y B están en estrecho contacto con terminaciones nerviosas colinérgicas y adrenérgicas (RENOLD,1971). El sistema nervioso central,- críticamente dependiente de glucosa para su metabolismo,contiene uno o más centros nerviosos sensibles a la concentración de glucosa en sangre,los cuales ponen en marcha una serie de mecanismos - como respuesta a la hipoglucemia (SAKATA y col.,1963). Esta respuesta incluye estimulación de la secreción de glucagón y adrenalina.vía rutas simpáticas y una acción directa neural sobre la - glucogenolisis hepática (SHIMAZU y AMAKAWA,1968). El papel de - los mecanismos neurales en la regulación fisiológica de la secreción de glucagón no está totalmente esclarecido. El sistema nervioso autónomo tiene un papel importante en la respuesta de los - islotes al estres mediante el sistema simpático,el cual estimula la secreción de glucagón e inhibe la de insulina y a través del - sistema nervioso parasimpático,que facilita la liberación de ambas hormonas.

Aparte de los agentes estudiados hasta ahora,existen - otra serie de factores tales como hormona del crecimiento,ACTH, - TSH,catecolaminas y Ca^{2+} que pueden afectar la secreción normal de los islotes,aunque los efectos parecen ser mediados de una forma indirecta.

En pacientes con diabetes mellitus (FOA,1972 y UNGER,- 1972) han sido descritas numerosas anormalidades de la secreción de glucagón. En la cetoacidosis (MULLER,1973),coma hiperosmolar no cetónico (LINDSEY y col,1974) y diabetes mal controlada (MATSUYAMA y col.,1975),los niveles plasmáticos de glucagón se encuen-

tran marcadamente elevados. En pacientes con una hiperglucemia moderada, los valores de glucagón están a menudo dentro del intervalo normal, pero estos valores son mayores que los encontrados en individuos no diabéticos a los cuales se les ha producido una hiperglucemia semejante. La respuesta secretora anormal de la célula A en la diabetes mellitus se caracteriza por dos aspectos fundamentales:

- 1) Respuestas disminuidas a la glucosa (falta de inhibición de la secreción de glucagón por la hiperglucemia y falta de estimulación por la hipoglucemia) y
- 2) Respuestas excesivas a varios estímulos, quizá como resultado de un glucoreceptor anormal, lo cual podría explicar la incapacidad de la insulina para normalizar totalmente estas respuestas inapropiadas del glucagón a la glucosa.

Existen también otra serie de anomalías en las cuales la función de las células A y/B está alterada. En una gran variedad de enfermedades con un balance negativo de nitrógeno y con una pérdida importante de peso, la concentración molar relativa de insulina a glucagón está reducida. Parece ser que cuando el cociente - insulina/glucagón es menor de 2 o 3, existe una tendencia a una pérdida excesiva de nitrógeno. En general, los desórdenes caracterizados por un catabolismo aumentado, como cirrosis avanzada ; insuficiencia renal y enfermedad de Cushing, van acompañados de una hiperglucagonemia.

5. MECANISMO DE ACCION DEL GLUCAGON

Las hormonas se han clasificado a menudo en dos grandes

grupos de acuerdo a su cinética de acción y a los mecanismos por los cuales ejercen sus efectos intracelulares en los tejidos diana. El primer grupo está compuesto por las hormonas esteroideas y tiroideas que atraviesan libremente la membrana plasmática celular e interaccionan con receptores intracelulares. Estas hormonas se unen a un receptor citoplásmico soluble, produciéndose a continuación una migración del complejo receptor-hormona al núcleo celular donde controla la síntesis de RNAs mensajeros específicos (YAMAMOTO y ALBERTS, 1976, SAMUELS y col., 1973 y OPPENHEIMER y col., 1973).

El segundo grupo está constituido por las hormonas polipeptídicas y las catecolaminas que interaccionan con receptores localizados en la membrana plasmática de las células diana. Como consecuencia de la unión hormona-receptor se inicia la síntesis de factores intracelulares que sirven como segundos mensajeros y que son responsables de la expresión celular de la acción hormonal. El mejor definido de estos segundos mensajeros es la adenosina 3'-5'-monofosfato (AMP cíclico).

El glucagón, lleva a cabo su acción biológica interaccionando con receptores específicos situados en la membrana plasmática de las células diana, lo cual conduce a la activación de un componente efector o adenilato ciclase también presente en la membrana plasmática, que cataliza la conversión de ATP a AMP cíclico. El reconocimiento de la hormona por el receptor es altamente específico, ya que la eliminación del primer aminoácido de la molécula de glucagón (histidina) lleva consigo una significativa reducción en la unión de la hormona por sus receptores hepáticos (RODBELL y col., 1971d y LIN y col., 1975a). Esto indica que determinados fragmentos del polipéptido son indispensables para su reconocimiento por el -

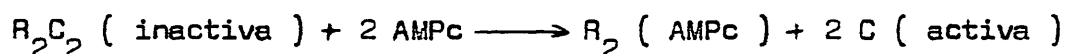
receptor.

En los últimos años se ha hecho evidente que la activación de la adenilato ciclasa por hormonas está regulada por nucleótidos y nucleósidos. Estos ejercen su función afectando no solo el grado de estimulación producido por la hormona sino que también actúan sobre la actividad basal y las interacciones hormona-receptor. De acuerdo con esto, se ha encontrado que para que la unión de glucagón a membranas plasmáticas hepáticas sea reversible se requiere la presencia de concentraciones micromolares de GTP o milimolares de ATP (RODBELL y col., 1971a).

En eucariotas, los efectos intracelulares del AMP cíclico (y por tanto de las hormonas que como el glucagón actúan a través de él) parece que están mediados por una proteína quinasa dependiente de AMP cíclico. El AMP cíclico se asocia con una proteína receptora específica la cual parece servir como subunidad reguladora de estas proteínas quinasas (KUO y GREENGARD, 1969). La distribución intracelular de estas proteínas quinasas dependientes de AMP cíclico varía no solo entre tejidos sino también en el mismo tejido durante el desarrollo tisular y el ciclo celular. La enzima ha sido encontrada fundamentalmente en el citoplasma de las fibras musculares (RUBIN y col., 1972), en membranas sinápticas y microsomas del cerebro (MAENO y col., 1971), membranas microsomales y gránulos secretorios de la hipófisis (LEMAIRE y col., 1971), en la membrana celular de eritrocitos (RUBIN y col., 1975) y en el citoplasma y retículo endoplásmico liso y rugoso de la corteza adrenal (WILTON y GILL, 1973).

Existen al menos dos formas de proteínas quinasas dependientes de AMP cíclico normalmente conocidas como tipo I y tipo II. -

El holoenzima (R_2C_2) posee un peso molecular de 165000 y consta de un dímero de la subunidad reguladora que une AMP cíclico combinado con dos subunidades catalíticas en las que se encuentra el centro activo. Las formas I y II parecen diferir principalmente en la subunidad reguladora y normalmente se considera que tienen una subunidad catalítica idéntica, aunque esto no ha sido rigurosamente establecido. El holoenzima (R_2C_2) es inactivo ya que el dímero regulador ejerce un efecto inhibitorio sobre las subunidades catalíticas. En presencia de niveles saturantes de AMP cíclico el holoenzima une dos moléculas de AMP cíclico y se disocia para dar dímeros de la subunidad reguladora y monómeros de la subunidad catalítica :



El complejo R_2C_2 se forma de nuevo rápidamente cuando disminuyen los niveles intracelulares de AMP cíclico.

El incremento en las subunidades catalíticas activas provoca una fosforilación de un cierto número de enzimas y proteínas celulares utilizando el ATP como donador del grupo fosfato.

La proteína quinasa dependiente de AMP cíclico fue originalmente descubierta por su habilidad para fosforilar y activar la fosforilasa quinasa de músculo e hígado (WALSH y col., 1968). Esta última enzima se ha encontrado en tres formas b, a' y a, las tres dependientes de Ca^{2+} . Parece ser que la forma más activa es la a. Por estudios realizados con electroforesis en gel de poliacrilamida se han podido aislar cuatro componentes proteicos a los cuales se les ha denominado α (peso molecular 145000), α' (peso molecular 140000),

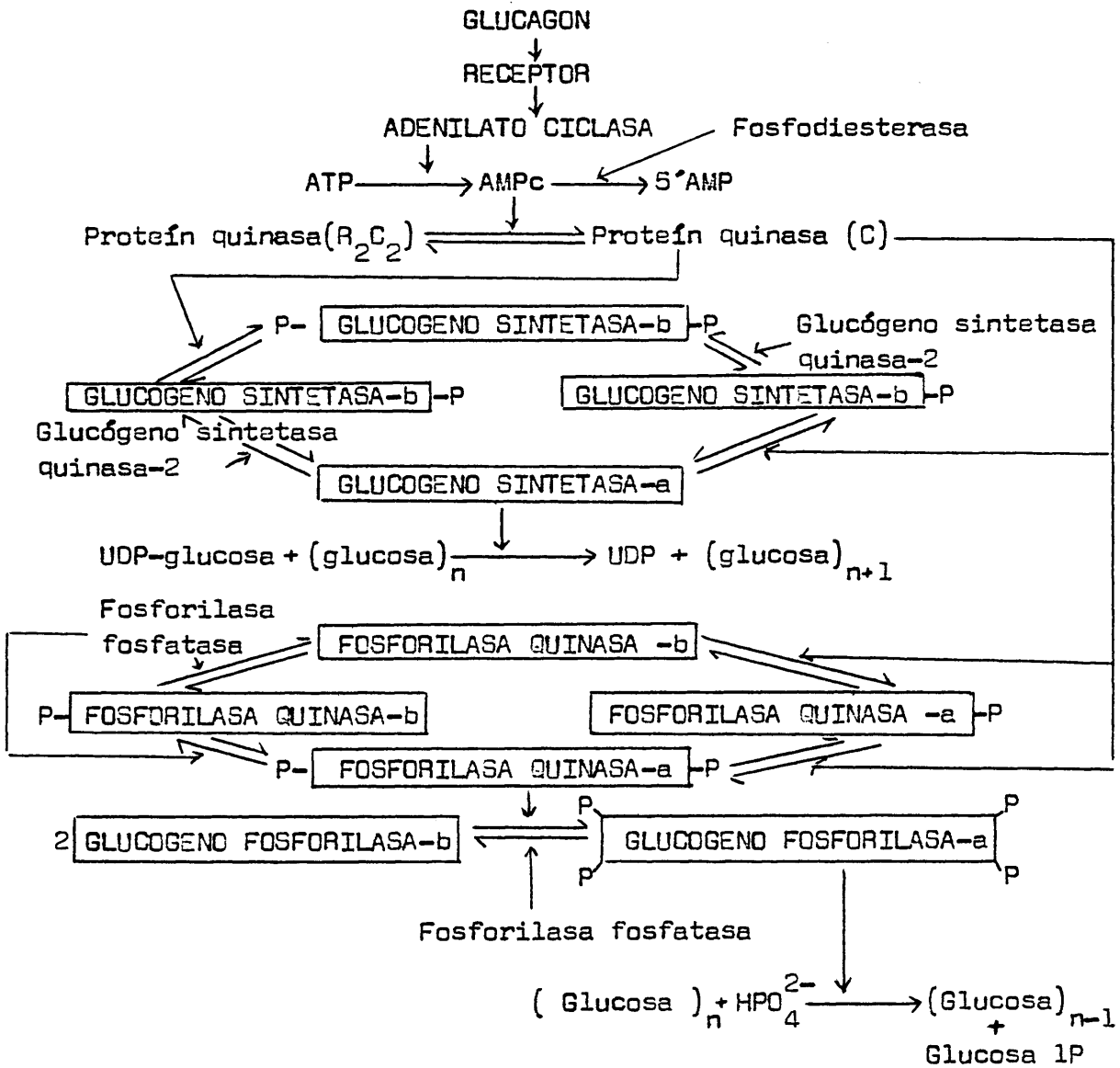
β (peso molecular 128000) y γ (peso molecular 45000). Parece ser que estos cuatro componentes son derivados de dos isoenzimas con las estructuras $(\alpha'\beta\gamma)_4$ y $(\alpha\beta\delta)_4$. La proteína quinasa dependiente de AMP cíclico activa la fosforilasa quinasa a través de la fosforilación de las subunidades α y β para dar la forma a activa del enzima. La fosforilasa quinasa se encuentra también regulada por otras dos enzimas : α y β fosforilasa:quinasa fosfatasa que desfosforilan las subunidades α y β del enzima dando la forma b inactiva.

La forma a activa de la fosforilasa quinasa cataliza la transformación de la forma a (activa) de la glucógeno fosforilasa a través de la fosforilación de dos moléculas de fosforilasa b. La interconversión entre las formas activa o fosforilada e inactiva o desfosforilada está también regulada por la fosforilasa fosfatasa que provoca la pérdida de los grupos fosfato de la forma a conduciendo a la disociación de esta en dos moléculas de fosforilasa b.

La glucógeno sintetasa, igual que la glucógeno fosforilasa, se encuentra también sometida a regulación por el AMP cíclico. Se encuentra en dos formas : fosforilada (forma b, inactiva), dependiente de la presencia de glucosa-6 fosfato, y desfosforilada (forma a, activa), totalmente activa en ausencia de glucosa-6 fosfato. La glucógeno sintetasa está controlada por dos diferentes quinetas : proteína quinasa dependiente de AMP cíclico y glucógeno sintetasa quinasa-2, que fosforilan sitios distintos del enzima. Los grupos fosfato de la forma b del enzima son extraídos por una proteína fosfatasa conduciendo a la forma desfosforilada o activa del enzima.

Sobre ambos sistemas enzimáticos actúa el glucagón con objeto de llevar a cabo parte de sus efectos biológicos.

En el siguiente esquema se resume la información obtenida hasta ahora sobre la regulación del metabolismo del glucógeno y su relación con los efectos del glucagón :



Cuando la señal del glucagón cesa, el sistema de las fosforilasas vuelve a su estado inactivo a través de la acción de las fosforilasas fosfatasas.

Resumiendo, se puede decir que el glucagón estimula la adenilato ciclasa incrementando por tanto el nivel de AMP cíclico. Esto produce una amplia variedad de efectos. La activación de la fosforilasa e inhibición de la actividad de la glucógeno sintetasa combinadas provoca una neta rotura del glucógeno y esto, junto con la estimulación de la gluconeogénesis, conduce a un incremento en la producción de glucosa. La gluconeogénesis a partir de una amplia variedad de sustratos (lactato, piruvato y aminoácidos) - puede también ser estimulada parcialmente por el AMP cíclico debido probablemente a un ritmo incrementado de la conversión de piruvato a fosfoenol piruvato.

Asociados con estos efectos se ha observado una posible regulación por el AMP cíclico en la activación de enzimas involucradas en la lipólisis como la triglicérido lipasa, transporte de aminoácidos, proteólisis de proteínas endógenas, producción de urea y también del ritmo de síntesis de varias enzimas hepáticas como la glucosa-6 fosfatasa, serina deshidratasa, fosfopiruvato carboxilasa y tirosina transaminasa.

6.- EFFECTOS METABOLICOS Y PAPEL FISIOLÓGICO DEL GLUCAGON

Ya que el glucagón y la insulina ejercen acciones biológicamente opuestas sobre los tejidos diana en los que actúan, principalmente el hígado, sus concentraciones relativas pueden determinar la dirección y magnitud del metabolismo de los nutrientes clave bajo una amplia serie de circunstancias. Park y Exton (PARK y EXTON, 1972) fueron los primeros que apuntaron la idea de que un



cociente insulina/glucagón elevado estimula el metabolismo de los nutrientes exógenos a través de una glucogénesis, lipogénesis y biosíntesis de proteínas elevadas, mientras que un cociente insulina/glucagón bajo favorece los procesos catabólicos como la glucogenolisis, gluconeogénesis y cetogénesis. En situaciones como el ayuno y/o durante un período en el que exista una necesidad elevada de combustibles, un cociente insulina/glucagón bajo puede mantener el ritmo requerido de producción de glucosa y prevenir la hipoglucemia a través de una glucogenolisis y gluconeogénesis incrementadas.

En 1974 Unger (UNGER, 1974) propuso que los islotes de Langerhans, mediante variaciones en las concentraciones relativas de insulina y glucagón, poseen la capacidad de controlar la disponibilidad de los nutrientes y sustratos endógenos de una forma adecuada para el aporte necesario de combustibles exógenos y los requerimientos energéticos. El descubrimiento de acoplamientos estructurales entre las células A y B ha hecho sugerir a varios autores que el control ejercido por ellas sobre el metabolismo lo ejercerían actuando como una auténtica unidad funcional.

La estimulación de la producción de glucosa por el hígado es, probablemente, la acción del glucagón de más importancia fisiológica en la mayoría de las especies de mamíferos incluido el hombre. La estimulación por el glucagón de la producción de glucosa es el resultado de tres procesos : estimulación de la glucogenolisis, inhibición de la síntesis de glucógeno y estimulación de la gluconeogénesis. La acción glucogenolítica del glucagón, junto con la inhibición de la síntesis de glucógeno, en el hígado, ha sido ampliamente demostrada "in vivo" e "in vitro" (FOA, 1968); ambos efectos son el resultado de la activación de proteín quinasas por -

el AMP cíclico cuyos niveles aumentan debido a la estimulación de la adenilato ciclasa por el glucagón. El efecto glucogenolítico - del glucagón se ha podido observar cerca de 30 segundos después - de que la concentración de AMP cíclico en el hígado aumenta y no se observa con concentraciones de glucagón demasiado bajas para - activar la adenilato ciclasa.

El efecto gluconeogénico del glucagón se puede observar con concentraciones solo ligeramente superiores a las requeridas para estimular la rotura del glucógeno. La acción gluconeogénica es también muy rápida, siendo perceptible dentro del primer minuto de exposición del hígado al glucagón (EXTON y PARK, 1968). Sin embargo, el mecanismo por el cual el glucagón activa la gluconeogénesis no está muy claro. Por estudios recientes parece ser que la regulación se ejerce principalmente en dos sitios : 1) entre - piruvato y fosfoenol piruvato y 2) al nivel de las reacciones catalizadas por la fosfofructoquinasa y fructosa difosfatasa (WILLIAMSON y col., 1969). Parece ser también que el papel del glucagón es incrementar el ritmo de producción de glucosa por el hígado de una forma temporal, no manteniendo una elevada producción de glucosa durante períodos prolongados (FELIG y col., 1976). Este efecto podría proteger al hígado contra una repentina disminución de sus reservas de glucógeno y proporcionaría un mecanismo eficiente cuando se necesitaran cambios rápidos en la producción de glucosa. El glucagón extrapancreático parece también tener un efecto importante en la producción de glucosa " in vivo " (VRANIC y col. 1977).

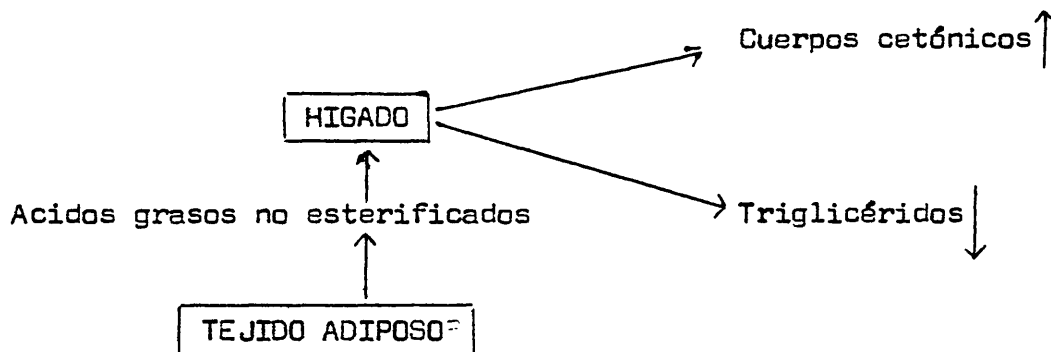
Se sabe ya desde hace mucho tiempo que el glucagón estimula la producción de urea por el hígado de rata aislado y perfun-

dido (MALETTE y col.,1969 y PENHOS y col.,1966) y que este efecto puede ser imitado por el AMP cíclico o por su dibutiril derivado (MALETTE y col.,1969). Sin embargo,este efecto ureogénico es menor que la acción glucogenolítica de la hormona y no se observa con concentraciones de glucagón menores de 1×10^{-9} M. La acción ureogénica del glucagón aparentemente envuelve varios mecanismos: estimulación de la utilización de aminoácidos exógenos a través de una activación del transporte de aminoácidos,movilización de aminoácidos a partir de proteínas endógenas como consecuencia de un aumento de la proteólisis y también por un aumento de la síntesis de transaminasas hepáticas y de las tres enzimas principales del ciclo de la urea (Mc LEAN y NOVELLO,1965).

El glucagón ha sido tradicionalmente considerado una hormona glucogénica,sin embargo investigaciones recientes han resaltado el hecho de que el glucagón también modula el metabolismo de lípidos y tiene importantes efectos metabólicos en los tres principales sustratos lipídicos que circulan en la sangre : ácidos grasos no esterificados,cuerpos cetónicos y triglicéridos. La secreción de glucagón durante períodos de estres tiene al menos dos funciones : proporcionar suficiente glucosa en sangre para el metabolismo del sistema nervioso central y proporcionar suficientes metabolitos lipídicos para mantener el metabolismo del músculo. Numerosos estudios in vitro han demostrado que el glucagón tiene un efecto lipolítico en el adipocito (LEFEBVRE,1972 y VAUGHAN y STEINBERG,1963). Aunque el mecanismo de su actividad lipolítica in vitro no está totalmente resuelto,las evidencias obtenidas hasta ahora sugieren que el AMP cíclico,producido por la estimulación de la adenilato ciclasa por el glucagón,induce

una activación de una proteína quinasa que cataliza la conversión de un triglicérido lipasa inactiva a una forma activa (SAGGERSON y col., 1977). El glucagón es capaz también de activar la cetogénesis hepática en la cual se han sugerido dos sitios posibles de regulación (Mc GARRY y FOSTER, 1976 y WILLIAMSON, 1974): control de la esterificación y oxidación de los ácidos grasos y control de las enzimas implicadas en las rutas de conversión de acetil-coenzima-A a cuerpos cetónicos.

Estudios utilizando infusiones fisiológicas de glucagón en sujetos normales y diabéticos han mostrado que, bajo condiciones apropiadas, el glucagón puede inducir una respuesta hipolipídica. El glucagón suprime la síntesis hepática de triglicéridos por una estimulación de la oxidación de ácidos grasos a cetonas y adicionalmente por una disminución de la síntesis de ácidos grasos a partir de acetil coenzima-A. En el siguiente esquema se resume la modulación del metabolismo de los lípidos por el glucagón:



En adición a la importancia de la deficiencia de insulina, estudios recientes indican que, bajo ciertas circunstancias, la respuesta alterada de ciertos tejidos al glucagón puede contribuir al efecto diabetogénico de esta hormona. En pacientes urémicos se

ha podido observar una sensibilidad tisular aumentada hacia el glucagón. Otros estudios utilizando ratas urémicas han mostrado que los cambios observados en la sensibilidad del glucagón son mediados por una mayor unión de esta hormona a las células diana (SOMAN y FELIG, 1975).

Por estudios realizados durante los últimos años se ha podido observar que 1) el glucagón posee unas propiedades " in vitro " e " in vivo " que lo cualifican como una hormona potencialmente diabetogénica y 2) que circula en exceso en los pacientes diabéticos. Sin embargo, el posible papel del glucagón en la regulación de algunas de las anomalías metabólicas de la diabetes está aún en controversia. Los niveles de glucagón plasmático se han encontrado marcadamente elevados en la cetoacidosis - (MULLER y col., 1973), coma no cetónico hiperosmolar y diabetes mellitus pobremente controlada (GERICH, 1977). Otras anomalías de su secreción encontradas en individuos diabéticos incluyen: reducida inhibición de los niveles de glucagón plasmático por la administración de glucosa oral o intravenosa, e incluso a veces un paradójico aumento de los niveles de glucagón después de la administración oral de glucosa, y exagerados niveles de glucagón circulante en respuesta a la infusión de arginina intravenosa o después de una comida rica en proteínas. Barnes y col (BARNES y col. 1977), estudiando pacientes con diabetes juvenil y sujetos pancreatectomizados, llegaron a la conclusión de que el glucagón no es " esencial " para el desarrollo de la hiperglucemia y cetoacidosis diabéticas, pero que la presencia de glucagón aumenta y acelera la hiperglucemia y cetoacidosis.

En experimentos realizados con perros pancreatectomizados

(DOBBS y col.,1975) se ha podido observar que, cuando la hiper-glucagonemia que presentaban era inhibida por la somatostatina, se producía un descenso acentuado de la glucosa plasmática, paralelo a la disminución de los niveles circulantes de glucagón extrapancreático circulante, lo cual parece demostrar que el glucagón extrapancreático contribuye a la hiperglucemia del perro - pancreatetectomizado. Recientemente Nonaka y col (NONAKA y col., 1977) han sugerido que en los animales diabéticos 1) la deficiencia de insulina conduce a una hipersecreción secundaria de glucagón extrapancreático, 2) la hiperglucagonemia diabética envuelve principalmente glucagón extrapancreático y, en menor grado, glucagón pancreático y 3) el glucagón inmunoreactivo liberado en respuesta a la hipoglucemia inducida por la insulina es fundamentalmente glucagón pancreático.

OBJETIVOS

Tradicionalmente se ha considerado que las células A del páncreas endocrino son las responsables de la síntesis y secreción de glucagón, mientras que las células L de la mucosa intestinal son las productoras de una familia de péptidos denominados globalmente como GLI. Este grupo de péptidos posee una serie de características que le diferencian del glucagón pancreático, pero posee una actividad biológica semejante al glucagón, aunque con una potencialidad del 20% respecto a la de la hormona originariamente pancreática. En adición al GLI, en el tracto gastrointestinal de perros y fundamentalmente en el estómago, se ha encontrado un péptido indistinguible del glucagón pancreático (BAETENS y col., 1976 y SUNDLER y col., 1976) que, bajo ciertas circunstancias, contribuye significativamente a los niveles circulantes de esta hormona (BLAZQUEZ y col., 1976 y BLAZQUEZ y col., 1977). La existencia de una fuente extrapancreática de glucagón en el hombre permanece en disputa. Las valoraciones de glucagón en plasma de humanos pancreatectomizados han conducido a resultados conflictivos : Barnes y col (BARNES y BLOOM, 1976) no han encontrado concentraciones circulantes de glucagón en estos pacientes, mientras que otros autores han descrito niveles significativos de glucagón e, incluso, una respuesta del glucagón a la infusión de arginina (WERNER y PALMER, 1978).

El análisis de la inmunoreactividad para glucagón del plasma sanguíneo junto con los estudios biosintéticos han proporcionado evidencia de la existencia de moléculas de alto peso molecular relacionadas con el glucagón, y se ha especulado con la posibilidad de que sean moléculas de proglucagón o sustancias intermedias en la biosíntesis de la hormona. Sin embargo, teniendo en cuenta la dificultad de conseguir incorporación de triptófano radiacti-

vo por las células A de los islotes pancreáticos, los intentos para conseguir una transferencia de radiactividad de los péptidos de mayor peso molecular a la molécula hormonal han dado resultados poco claros y conflictivos.

Por otra parte, recientemente se ha encontrado que el tracto gastrointestinal no es la única fuente de los péptidos conocidos como GLI, de la misma forma que otras hormonas gastrointestinales han sido identificadas en distintos tejidos de nuestra economía. Todo ello incrementa el interés por conocer la distribución de hormonas pertenecientes al eje entero-insular, tales como insulina, glucagón y GLI. Asimismo ello obliga a su caracterización fisicoquímica, biológica e inmunológica y al estudio de la dinámica biosintética y secretora. Este trabajo, realizado fundamentalmente en la rata, se ha visto enriquecido por los estudios comparativos con el perro y humanos. Todo ello se puede resumir en los siguientes objetivos de esta tesis doctoral :

- 1) Distribución tisular de glucagón, GLI e insulina.
- 2) Caracterización inmunológica y fisicoquímica del glucagón, GLI e insulina de origen extrapancreático.
- 3) Caracterización biológica del glucagón extrapancreático. Identidad con el glucagón pancreático.
- 4) Evaluación de la capacidad secretora de las células A extrapancreáticas en condiciones basales o bajo el efecto de estímulos fisiológicos.
- 5) Estudio de la capacidad biosintética de las células A extrapancreáticas con especial atención a la existencia de posibles pép-

tidos inmunoreactivos de alto peso molecular y su posible relación con la hormona genuina.

- 6) Estudio del glucagón extrapancreático en diferentes especies incluida la humana. Diferencias en la distribución tisular y - características secretoras y biosintéticas.

MATERIAL Y METODOS

1. REACTIVOS

Todos los compuestos orgánicos e inorgánicos utilizados para este estudio fueron adquiridos de E. Merck (Darmstadt, Alemania) y de Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri, USA). Na ^{125}I (actividad específica : 11-17 mCi/ μg I; 100mCi/ml), triptófano - ^3H (actividad específica 6 Ci/mmcl; 1 mCi/ml) y 5'AMP- ^3H (actividad específica: 17 Ci/mmol) fueron obtenidos de Radiochemical Centre (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra).

Todas las hormonas utilizadas fueron un obsequio de Novo Research Institute (Copenhagen, Dinamarca). El glucagón porcino altamente purificado (lote nº G-425043) poseía un contenido en nitrógeno del 16,39% y de insulina del 0,004%. La insulina porcina monocomponente (lote nº 5836175) tenía una riqueza de: nitrógeno 14,51%, agua 6,4%, Zn 0,38%, proinsulina < 1 ppm y glucagón < 0,1 ppm, y una potencia biológica de 25,3 UI/mg. La insulina de rata (lote nº R-171) poseía un contenido en nitrógeno del 14,12% y una potencia biológica de 20,7 UI/mg .

La estreptozotocina fue un obsequio de Upjohn Laboratories (Kalamazoo, USA), el trasylol de Laboratorios Bayer y el Nembutal sódico de Laboratorios Abbot.

Para las determinaciones radioinmunológicas de glucagón, GLI e insulina, fueron utilizados los antisueros 30K (obtenido en el conejo con glucagón porcino), AG-10 (obtenido en el conejo con glucagón porcino) y 607/9 (obtenido en cobayas con insulina - porcina), respectivamente. El antisuero 30K, generosamente donado por el Dr. R.H. Unger, es altamente específico para las valoraciones

de glucagón pancreático y posee la propiedad de reaccionar con la porción C-terminal de la molécula de esta hormona. En contraposición a esto, el antisuero AG-10, generosamente donado por el Dr. P.P.Foà, reacciona con los fragmentos N-terminal y central de la molécula de glucagón y da reacciones cruzadas con polipéptidos de origen intestinal conocidos como GLI. Para las determinaciones de insulina utilizamos el antisuero 607/9, el cual fue donado por el Dr.P.Wright.

2.- ESTUDIOS EN HUMANOS

Trozos de las glándulas parótidas y submaxilares fueron obtenidos en la sala de operaciones inmediatamente después de su extirpación en pacientes que padecían de litiasis y tumores de estas glándulas. Fueron desechadas aquellas porciones de tejido no glandular o las de tejido invadido por el tumor. Inmediatamente después de la extirpación, los trozos de órgano fueron conservados a 4°C bien en Krebs Ringer bicarbonato, como paso previo al aislamiento celular, o bien en soluciones alcohol-ácida o salino-acidificado, para una posterior extracción y determinación de su contenido en glucagón y GLI.

3.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se utilizaron para los estudios perros adultos y ratas albinas de la raza Wistar.

Los perros poseían un peso que oscilaba alrededor de los

15 Kg, estos fueron mantenidos en un estabulario con ciclos regulares de luz-obscuridad, temperatura constante y una alimentación equilibrada en los distintos principios inmediatos, sales y vitaminas.

De una forma semejante, las ratas utilizadas (150-200 gr) fueron mantenidas bajo condiciones controladas de luz y temperatura y alimentadas ad libitum con una dieta estandar adquirida en Piensos Cóndor S.A. (grasas 3,8%, carbohidratos 49,5%, proteínas 21,4%, sales, humedad y material no absorbible).

3 3.1.- Tratamiento de los animales y toma de muestras sanguíneas

Los perros fueron divididos en dos grupos : controles y diabéticos. A estos últimos se les hizo diabéticos mediante la administración intravenosa de alloxana (65mg/Kg de peso corporal). 24 horas después de su administración se les instauró un tratamiento con insulina Novo Lente (10 UI/12h) durante 7 días; este tratamiento se suprimió 24 horas antes de someter a los animales a estudios específicos. Los perros fueron anestesiados con Pentobarbital sódico. La ventilación fue controlada por un respirador después de la intubación endotraqueal. A continuación se practicaron dos incisiones : una media en el abdomen y otra media en la cara anterior del cuello para exponer las glándulas submaxilares, insertándose catéteres en las venas cava, gastroepiploica izquierda, pancreático-duodenal superior y tiroidea. Quince minutos después de finalizada la intervención quirúrgica se infundió arginina en la vena femoral (0,5gr/Kg de peso corporal) a un ritmo de 2ml/min. durante 15 minutos, tomándose muestras de san-

gre de 1 ml, basales y a distintos tiempos durante y después de la infusión de arginina, las cuales fueron depositadas en tubos de ensayo conteniendo trasylol (500 UI/ml de sangre) y EDTA (1,2 mg/ml de sangre). Las muestras fueron centrifugadas a 4°C y el plasma fue congelado hasta el momento en que fueron realizadas las distintas pruebas analíticas.

Con las ratas se hicieron también dos grupos experimentales : controles y diabéticas; estas últimas fueron hechas diabéticas por la administración intracardíaca de estreptozotocina (65-100 mg/Kg de peso corporal). Después de la administración de estreptozotocina se les empezó a inyectar insulina Lente (2 UI/100gr de peso corporal/12 hr) durante 15 días. 48 horas antes de que los animales fuesen sacrificados se les suprimió el tratamiento con insulina.

En todos los experimentos realizados las ratas (con un ayuno de 18-20 hr) fueron anestesiadas con Nembutal sódico (40mg/Kg de peso corporal) y después de practicarles una incisión media abdominal, se tomaron muestras de sangre de 1 ml de la vena cava inferior las cuales se depositaron en tubos de ensayo conteniendo trasylol (500 UI/ml de sangre) y EDTA (1,2 mg/ml de sangre); inmediatamente después se centrifugaron a 4°C y el plasma fue congelado a -20°C para posteriores determinaciones de glucosa, glucagón, GLI e insulina.

4.- EXTRACCION DE GLUCAGON, GLI E INSULINA DE TEJIDOS HUMANOS Y DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION

El procedimiento experimental seguido para la extracción

de glucagón, GHI e insulina de los diferentes tejidos fue esencialmente el mismo en humanos, perros y ratas. Este proceso ha sido esquematizado en la Fig.1.

Una vez extirpados los órganos seleccionados para el estudio fueron inmediatamente sumergidos en metanol-nieve carbónica y homogeneizados en solución alcohol-ácida (etanol, agua - destilada, ClH; 75:23,2:1,8; V/V) o en cloruro sódico al 0,9% acidificado con ClH a un pH de 2,8.

Las distintas hormonas fueron extraídas y parcialmente purificadas según el proceder de Kenny (KENNY, 1955). Los homogenados fueron conservados durante 18 horas a 4°C después de lo cual se centrifugaron en una centrífuga Sorvall, rotor SS 34, a 3000 rpm durante 15 minutos. El precipitado resultante se volvió a extraer durante 4 horas con solución alcohol-ácida o salino-acidificado, centrifugándose de nuevo durante 15 minutos. Los sobrenadantes resultantes de las dos centrifugaciones anteriores fueron mezclados y tratados con hidróxido amónico hasta alcanzar un pH de 8,2, obtenido lo cual se volvió a repetir la centrifugación. A los sobrenadantes obtenidos se les añadió una mezcla de etanol y éter (etanol, éter; 1,7:2,8; V/V) y se les dejó a 4°C durante 12 horas, después de lo cual se obtuvo un nuevo precipitado que fue liofilizado y conservado en un desecador a -20°C. Para las determinaciones hormonales estos precipitados se disolvieron en tampón de glicocola 0,2M, albúmina bovina (BSA) 0,25%, - suero bovino 1%, pH 8,8.

5.- DETERMINACION DE GLUCOSA EN PLASMA

Para las valoraciones de glucosa se tomaron muestras de

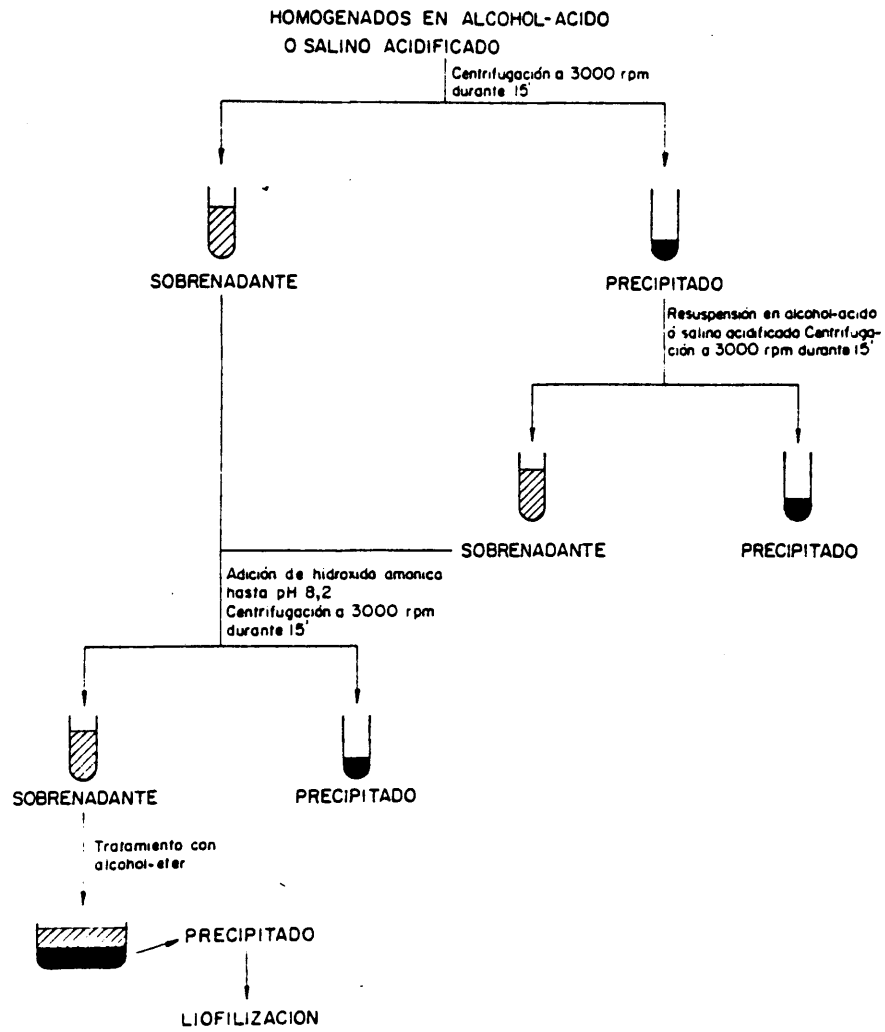


Figura 1.- REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL PROCESO DE EXTRACCION HORMONAL CON SOLUCION ACIDO - ALCOHOLICA.

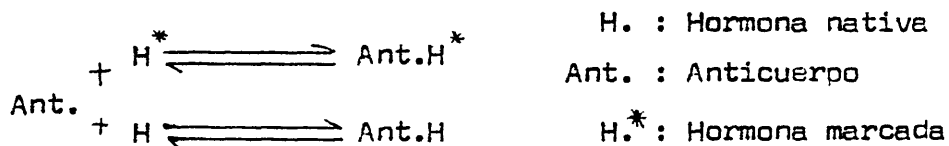
sangre de la vena cava inferior. Los plasmas fueron primero desproteinizados con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 1,8% y SO_4Zn 2%, y en ellos se determinó el contenido en glucosa según el método de la glucosa oxidasa de Hugget y Nixon (HUGGET y NIXON, 1957).

6.- DETERMINACIONES HORMONALES EN PLASMA Y EXTRACTOS TISULARES

6.1.- Fundamentos y validez del radioinmunoensayo para la valoración de hormonas polipeptídicas

La técnica del radioinmunoensayo para hormonas polipeptídicas fue desarrollado por Berson y Yalow (BERSON y YALOW, 1959) quienes observaron en pacientes diabéticos, que habían sido tratados con insulina, la aparición de anticuerpos con capacidad de unión específica a la insulina-¹³¹I. Asimismo observaron que la unión de la insulina marcada a los anticuerpos podía ser inhibida competitivamente por la adición de insulina no marcada. La observación de que la fracción de la insulina marcada unida por los anticuerpos representaba un índice de la cantidad de insulina no marcada añadida a la mezcla de reacción, cuando la concentración de anticuerpo se mantenía constante, constituyó la base para el desarrollo del radioinmunoensayo de insulina y, por analogía de todas las hormonas peptídicas.

El principio general del radioinmunoensayo se puede resumir en las siguientes reacciones :



Si a una mezcla de H^* y anticuerpo- H^* se le añade la hormona nativa H , esta última competirá con la H^* para unirse al anticuerpo y formar un complejo anticuerpo- H , con lo cual se modificará el cociente H^* unida/ H^* libre. Añadiéndose cantidades crecientes o decrecientes de H , este cociente irá disminuyendo o aumentando, respectivamente. Extrapolando esta competición al radioinmunoensayo, se puede establecer la comparación entre el cociente unida/libre provocado por la adición de cantidades desconocidas de la hormona con el cociente unida/libre inducido por soluciones estandar de ella y, como consecuencia de ello, estimar la concentración de hormona en la muestra problema.

Esta técnica del radioinmunoensayo es más específica, sencilla y de menor coste que los bioensayos, por lo cual ha reemplazado a estos últimos en la mayoría de las determinaciones hormonales.

6.2.- Radioinmunoensayo de glucagón

Unger y col. (UNGER y col.,1959) aplicaron los principios del radioinmunoensayo para la determinación de glucagón circulante poco tiempo después de su descubrimiento por Berson y Yalow en 1959. El desarrollo de esta técnica ha conducido a un mejor conocimiento del papel desempeñado por esta hormona en una gran variedad de situaciones fisiopatológicas. Existen dos dificultades fundamentales en la utilización de esta técnica, que afortunadamente han sido superadas: 1) Degradación del glucagón por enzimas proteolíticas. El glucagón es una hormona altamente susceptible a la actividad proteolítica lo cual ocurre incluso -

" in vitro " durante el procesamiento de las muestras del radioinmunoensayo. Este hecho es de especial importancia, ya que una degradación de la hormona radiactiva puede dar lugar a valores falsamente elevados. No obstante, el hallazgo de que el trasylol (EISENTRAUT y col.,1968), un inhibidor de las proteasas, puede bloquear el efecto degradativo sobre la hormona, supuso un gran avance para la valoración de las concentraciones de glucagón. Posteriormente (ENSINCK y col.,1972) se ha descrito que la benzamidina posee los mismos efectos que el trasylol, pero aventajando a este por su menor coste, 2) Especificidad de los antisueros. La existencia de un factor hiperglucémico-glucogenolítico en la mucosa del tracto digestivo fue descubierta en 1948 (SUTHERLAND y De DUVE,1948). Por estudios posteriores se identificó este factor con una familia de polipéptidos (GLI) de origen intestinal con capacidad de reacción con la mayoría de los antisueros contra glucagón. Sin embargo, más recientemente, se han obtenido un cierto número de antisueros que son específicos para el glucagón pancreático y que se caracterizan por reaccionar con la porción C-terminal de la molécula de la hormona (fragmento 24-29) en contraposición con lo que ocurre con los anticuerpos no específicos, con reacción cruzada con el GLI, que interaccionan con la porción central y N-terminal (fragmento 2-23).

Dada la importancia de la especificidad de los antisueros, con anterioridad a las determinaciones de glucagón, es imprescindible su tipificación. En este estudio hemos realizado las valoraciones de glucagón con la ayuda de un antisuero C-terminal (30K) y otro N-terminal (AG-1C), lo que nos ha permitido también obtener información sobre las concentraciones de GLI.

6.2.1.- Marcaje y aislamiento del glucagón mono - ^{125}I

El método básicamente consiste en la yodación de los residuos de tirosina presentes en la molécula de la hormona. Originalmente se utilizó ^{131}I (GREENWOOD y col., 1963), pero debido a la mayor abundancia isotópica y vida media del ^{125}I , actualmente se utiliza este último isótopo.

La yodación se llevó a cabo por el procedimiento de la cloramina T de Hunter y Greenwood (HUNTER y GREENWOOD, 1962) modificado por Nottey y Rosselin (NOTTEY y ROSSELIN, 1971). La reacción consiste en la oxidación del I^- para convertirlo en una forma capaz de reaccionar con la proteína, y la posterior unión de este átomo de yodo en las posiciones orto del anillo del grupo tirosil.

Los reactivos utilizados fueron los siguientes :

- Glucagón porcino, diluido en agua destilada a una concentración de 1 mg/ml, y conservado en alícuotas de 5 μl a -20°C .
- Tris-HCl 0,05 M, urea 7 M, pH 9,5.
- Tris-HCl 0,05 M, urea 7 M, NaCl 99,5 mM, pH 9,5.
- Tris-HCl 1 M.
- Tampón fosfato 0,3 M, pH 7,5.
- Cloramina T (5mg/2ml de tampón fosfato).
- Metabisulfito sódico (5mg/ml de tampón fosfato).
- Albúmina bovina (BSA) (25 mg/ml de tampón fosfato).
- Acido tricloroacético (TCA) al 20%.

-Na¹²⁵I... Actividad específica : 11-17 mCi/ μ g I (100 mCi/ml).

El procedimiento consiste en la rápida adición de los siguientes componentes :

Tampón fosfato 0,3 M	-----	40 μ l
Na ¹²⁵ I	-----	2,5 mCi
Glucagón porcino	-----	5 μ g
Cloramina T	-----	12,5 μ g

Esta solución se mantiene en constante agitación durante 30 segundos, pasados los cuales se le añaden 5 μ l de metabisulfito sódico para parar la reacción. La mezcla es entonces rápidamente diluida con 100 μ l de BSA con objeto de reducir la adsorción de la hormona radiactiva a la superficie del tubo de ensayo y para reducir el daño de la hormona por autoirradiación.

Para calcular el rendimiento de la yodación se tomaron 5 μ l de la mezcla de reacción a los que se añadieron 1 ml de tampón fosfato conteniendo BSA al 1% y 1 ml de TCA al 20%. Tras agitación y centrifugación de los tubos de ensayo durante 10 minutos a 3000 rpm, la radiactividad presente en sobrenadantes y sedimentos fue determinada en un contador Packard. Calculado el rendimiento de la yodación, este resultó ser de 80-90%. Cuando este rendimiento fue calculado por precipitación de 5 μ l de la mezcla de reacción con pastillas de talco, resultó ser de un 70-80%.

La actividad específica fue calculada de la siguiente manera :

$$AE = \frac{\text{Cantidad de I radiactivo (} \mu\text{Ci)} \times \% \text{ de incorporación}}{\text{Cantidad de glucagón (} \mu\text{g) añadido al tubo de reacción}} \times 1/100$$

La actividad específica teórica, teniendo en cuenta las condiciones anteriormente citadas de la yodación y suponiendo que se ha incorporado el 100% de radiactividad, sería de 500 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ de glucagón. Nosotros obtuvimos unas actividades específicas que oscilaron entre 425-450 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ de glucagón.

Inmediatamente después del marcaje, la hormona yodada se purificó por cromatografía en columna (1x30 cm) de DEAE-celulosa 52 con objeto de separar el glucagón monoyodado de la hormona diyodada o no yodada, I libre y productos de degradación.

La celulosa fue preparada disolviéndola en agua destilada y HCl hasta alcanzar un pH de 4. Posteriormente se lavó con Tris-HCl 1 M (aproximadamente 100 ml/10 gr de celulosa), y se resuspendió en Tris-HCl 0,05 M, urea 7 M , pH 9,5.

Tras la aplicación de la muestra, la columna fue eluida con 80 ml de Tris-HCl 0,05 M, urea 7 M, pH 9,5, con objeto de separar el yodo libre. Inmediatamente después, se aplicó un gradiente lineal de NaCl de 0 M - 0,2 M, con la ayuda de un aparato Vari-grad. El volumen total del gradiente fue de 200 ml y se mantuvo un ritmo de flujo de 15 ml/h.

La DEAE-celulosa utilizada a este pH es un efectivo adsorbente de polianiones y permite una discriminación clara entre moléculas con distinta carga. El primer producto eluido será el -

menos cargado negativamente y el orden de elución será por tanto: glucagón no yodado, glucagón monoyodado y glucagón diyodado.

El perfil de elución obtenido se representa en la Fig.2.

El número de átomos de yodo fijados sobre la molécula de hormona, calculado a partir de las actividades específicas real y teórica, osciló entre 0,8 - 0,9 átomos de yodo/ molécula. La diferencia con la unidad es debida a la ligera contaminación de los picos por glucagón no marcado. El pico I corresponde a fragmentos peptídicos degradados mientras que el pico III representaría el glucagón monoyodado.

Una vez eluida la columna y seleccionados los picos II y III, las distintas fracciones constitutivas de cada pico fueron mezcladas y dializadas, previa la adición V/V de tampón fosfato - conteniendo BSA al 1%, frente a 1 litro de tampón fosfato, 2 veces durante 2 horas. La diálisis fue realizada a 4°C con objeto de evitar la degradación del glucagón.

Una vez realizada la diálisis, los volúmenes totales de los picos II y III fueron distribuidos en alícuotas y congelados a -20°C.

6.2.2.- Especificidad de los antisueros

Como ya hemos descrito anteriormente. (apartado 6.2.), existen dos tipos de antisueros : específicos para el glucagón - pancreático o C-terminales e inespecíficos o N-terminales, los cuales valoran tanto glucagón como GHI. En la actualidad se acepta que estos últimos reaccionan con el fragmento 2-23 común a am-

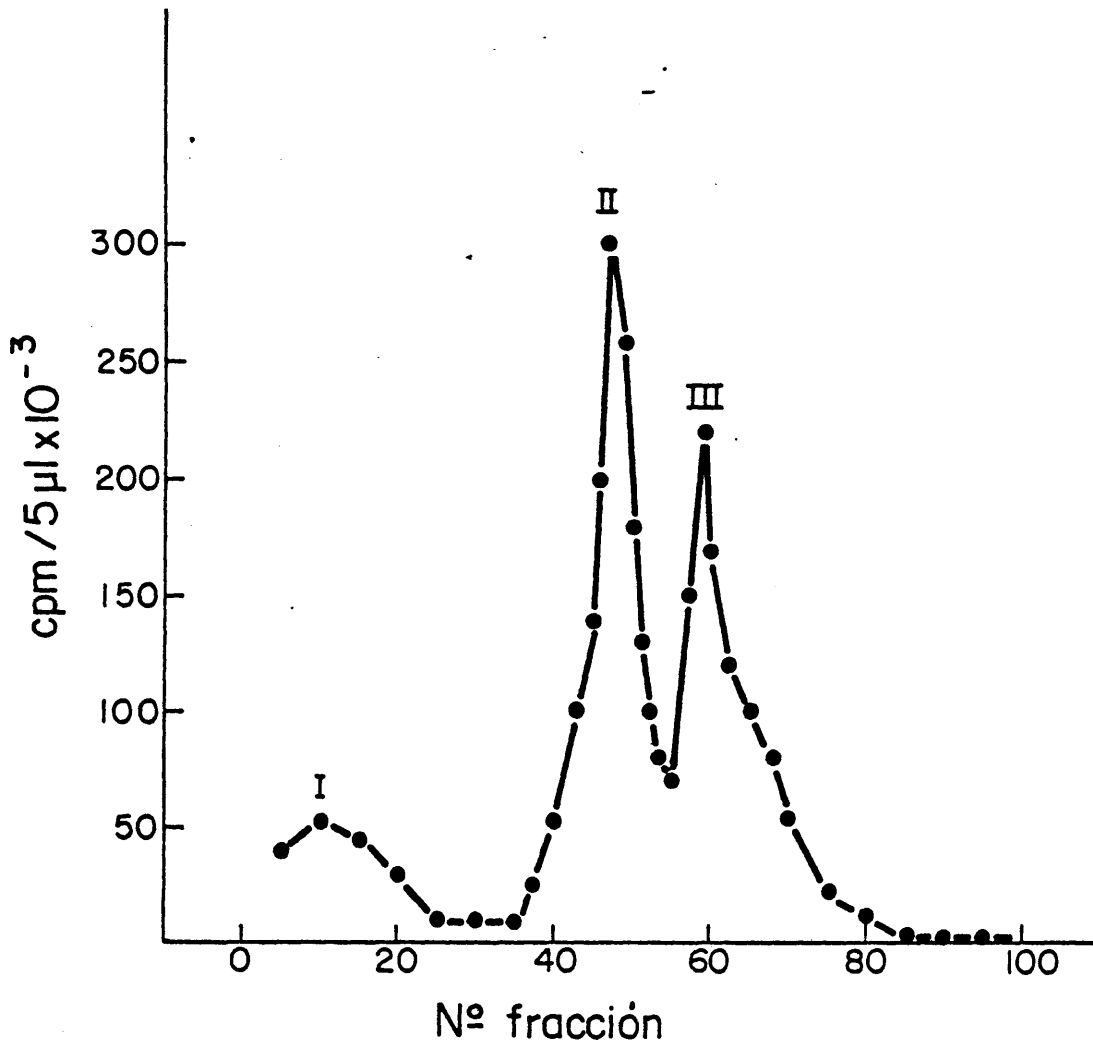


Figura 2.- PERFIL DE ELUCION DEL GLUCAGON - ¹²⁵I EN COLUMNA DE DEAE - CELULOSA.

bas moléculas hormonales, mientras que con el fragmento 24-29 solo reaccionan los anticuerpos específicos, ya que la elongación de la molécula de GLI situada a continuación de la de glucagón enmascara dicha capacidad inmunoreactiva. Hay autores (YAMAIMARA y col., 1979) que han confirmado esta idea, mostrando que el glucagón sintético acoplado al octapéptido C-terminal de la glicentina no reacciona con antisueros dirigidos contra la secuencia 24-29 de la molécula de glucagón.

El antisuero 30K, utilizado en este estudio para las determinaciones de glucagón, reacciona con esta zona C-terminal de su molécula no dando reacciones cruzadas con el GLI y siendo, por tanto, específico para las valoraciones de la hormona pancreática y posibles polipéptidos semejantes a ella existentes en otros tejidos. En cuanto al antisuero AG-10, es N-terminal y por tanto valora tanto las concentraciones de glucagón como las de GLI.

6.2.3.- Método

El diluyente utilizado para todos los reactivos del inmuensayo fue tampón de glicocola 0,2 M, conteniendo BSA al 0,25% y suero bovino al 1%, ajustado a un pH de 8,8 con NaOH 2 N.

Como glucagón estandar se utilizó glucagón porcino altamente purificado disuelto inicialmente en ClH 20 mM, hasta alcanzar una concentración de 80 µg/ml y, posteriormente en agua destilada hasta una concentración final de 20 µg/ml. Esta concentración fue contrastada por espectrofotometría, midiendo su absorción a 279 nm. Alícuotas de esta solución fueron congeladas a -20°C.

A partir de esta solución fueron preparados los distintos puntos de la curva estandar por sucesivas diluciones hasta - obtener unas concentraciones de : 20,50,100,200,300,600,1000 y - 2000 pg/ml.

Cada tubo del inmunoensayo contenía :

0,5 ml de glucagón-¹²⁵I (15 pg)

0,1 ml de trasylol (1000 KIU)

0,2 ml de los puntos de la curva estandar o de la muestra problema

0,4 ml de antisuero 30K (dilución final : 1:80000)

Para determinar la unión no específica de la hormona - (cuentas registradas en ausencia del antisuero) , en unos tubos controles se substituyó el antisuero 30K por 0,4 ml de tampón de glicocola. Siempre se determinó la unión inespecífica de la hormona con muestras de la curva estandar y de las soluciones problema.

Después de una incubación de 4 días a 4°C, se añadió a cada tubo 0,2 ml de suero bovino, separándose el glucagón libre - del glucagón unido al anticuerpo por la adición de 0,5 ml de una suspensión de carbón activado (0,5%) y dextrano T-70 (0,25%), en tampón de glicocola 0,2 M , pH 8,8. Los tubos fueron agitados e incubados de nuevo a 4°C durante 45 minutos. Transcurrido este período de tiempo, se centrifugaron en una centrifuga Internacional refrigerada a 3000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes fueron entonces aspirados con una trompa de vacío y la cantidad de

incluyeron tubos controles con muestras y de soluciones conocidas con objeto de determinar la unión inespecífica.

Los tubos fueron incubados durante 4 días a 4°C, pasados los cuales se les añadió 0,1 ml de suero bovino y 0,5 ml de una mezcla de carbón activado (0,5%) y dextrano T-70 (0,25%), e incubados de nuevo a 4°C durante 45 minutos. Finalizado este período de tiempo, la hormona unida fue separada de la libre por centrifugación (3000 rpm durante 10 minutos) en una centrífuga International. La cantidad de hormona libre presente en los sedimentos fue determinada midiendo la radiactividad que presentaban con un contador Packard para radiaciones gamma.

Los cálculos se realizaron de acuerdo con lo descrito en el apartado 6.2.4. El contenido de GLI en cualquiera de las muestras examinadas fue calculado por sustracción de los valores determinados con el antisuero 30K de aquellos obtenidos con el anticuerpo AG-10.

6.4.- Radioinmunoensayo de insulina

Aunque existan numerosos métodos para la medición de la insulina, la mayoría de los cuales son radioinmunoensayos en los cuales varía el modo de separación del antígeno unido al anticuerpo del antígeno libre, nosotros utilizamos el mismo inmunoensayo, con algunas variaciones, que empleamos para la medición de glucagón y GLI (apartados 6.2 y 6.3), utilizando una mezcla de carbón y dextrano para la separación de las hormonas libre y unida al anticuerpo

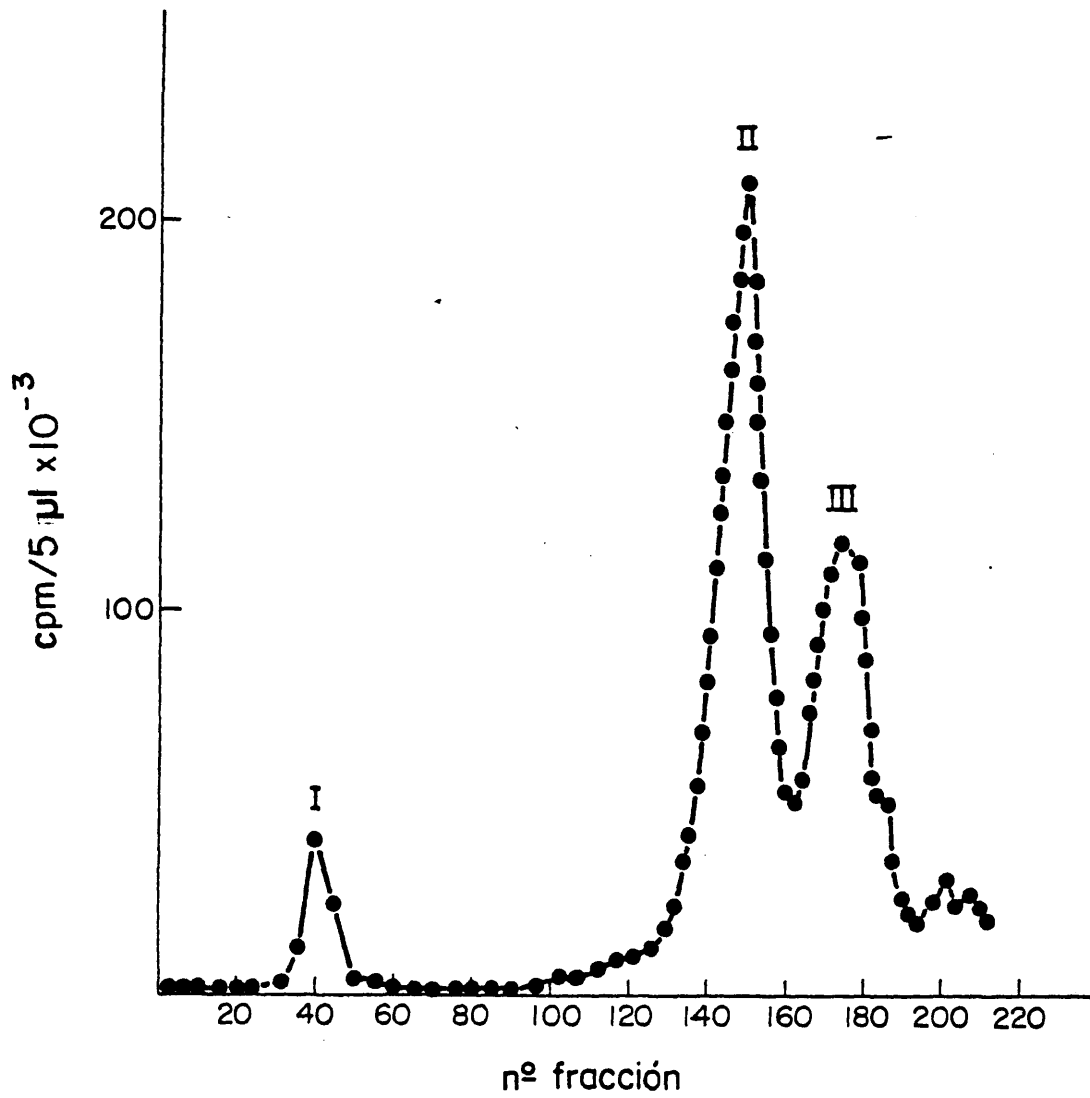


Figura 3.- PERFIL DE ELUCION DE LA INSULINA - ¹²⁵I EN COLUMNA DE DEAE CELULOSA.

6.4.2.- Características del antisuero

El antisuero utilizado (607/9) fue obtenido en cobayas tratados con insulina porcina según la técnica descrita previamente (WRIGHT y col., 1968). Este antisuero fue liofilizado, reconstituido en agua destilada y conservado en alícuotas a una dilución de 1:1000 a -20°C .

6.4.3.- Método y cálculos

El diluyente empleado fue el mismo tampón de glicocola - 0,2 M, BSA al 0,25% , suero bovino 1% , pH 8,8 , utilizado en el apartado 6.2. para las determinaciones de glucagón.

Un prerequisite esencial en el ensayo es que la hormona presente en las muestras problema y las soluciones estandar compitan idénticamente para los sitios de unión con el anticuerpo.- Esto es debido a la diferente reactividad inmunológica de la insulina perteneciente a animales de diversas especies, lo cual es - especialmente cierto en la rata ya que, además de las peculiaridades interespecies citadas, posee dos moléculas diferentes de - insulina y proinsulina. Como consecuencia de ello utilizamos soluciones conocidas de insulina de estos animales (Lab.Novo, Copenhagen) para confeccionar la curva estandar. Para las determinaciones en humanos utilizamos insulina de cerdo para la curva estandar, ya que la insulina de ambas especies reaccionan de una forma idéntica con el anticuerpo. Ambas curvas estandar se construyeron con las siguientes concentraciones de insulina : 2,5 , 5 , 10 , 20 , 30 , 40 , 60 , 100 , 200 y 400 $\mu\text{U}/\text{ml}$.

En cada tubo del inmunoensayo se incluyeron los siguientes componentes :

0,6 ml de insulina - ^{125}I (50 pg)

0,2 ml de los distintos puntos de la curva estandar o muestras problema

0,2 ml del antisuero 607/9 (dilución final : 1:500000)

Al igual que para las determinaciones de glucagón y GLI (apartados 6.2.4 y 6.3.2.), se determinó la unión inespecífica de insulina con muestras problema y puntos de la curva estandar.

Todas las muestras se incubaron durante 2 días a 4°C. Finalizado este período de tiempo, se añadieron a cada tubo de ensayo 0,2 ml de suero bovino y 0,5 ml de una suspensión de carbón activado (3%) y dextrano T-70 (0,25%), mantenida en constante agitación en tampón de glicocola 0,2 M , pH 8,8. Después de una incubación a 4°C durante 45 minutos, la hormona unida al anticuerpo se separó de la libre mediante centrifugación a 3000 rpm en una centrífuga International. De una forma semejante a lo descrito en los apartados 6.2 y 6.3 en el precipitado obtenido se determinó la radiactividad con la ayuda de un contador Packard para radiaciones gamma.

Los resultados fueron calculados mediante la representación gráfica de los distintos puntos de la curva estandar frente al porcentaje de insulina - ^{125}I unida al anticuerpo. La concentración de la hormona en las muestras problema fue obtenida por comparación con estas curvas.

7.- IDENTIFICACION DE LOS COMPONENTES INMUNOREACTIVOS PARA GLUCAGON GLI E INSULINA EN EXTRACTOS EXTRAPANCREATICOS

7.1.- Caracterización tras filtración con Bio-Gel P-30

Los extractos obtenidos de acuerdo con lo descrito en el apartado 4. fueron purificados por cromatografía en columna (1x 60 cm) de Bio-Gel P-30.

Con objeto de eliminar las partículas de distinto tamaño que normalmente poseen los geles y que provocarían distorsiones en los picos obtenidos, el gel fue lavado repetidas veces con agua destilada hasta conseguir una solución homogénea de partículas, después de lo cual se resuspendió en el tampón de elución.

Las columnas fueron calibradas con azul dextrano, insulina - ^{125}I y glucagón - ^{125}I como marcadores de peso molecular, - utilizándose solo durante un período de 7 días para evitar cualquier distorsión en los picos provocada por un mayor empaquetamiento del gel. Estas columnas fueron eluidas bien en tampón de glicocola 0,2 M conteniendo BSA al 0,25% y suero bovino al 1% a un pH - de 8,8 o en ácido acético 1 M.

7.1.1.- Elución con tampón de glicocola

Los extractos fueron reconstituidos en tampón de glicocola 0,2 M , BSA al 0,25% , suero bovino al 1% , pH 8,8. Muestras de 500-1000 pg fueron aplicadas a las columnas previamente equilibradas con 100 ml de este tampón y eluidas a 4°C, manteniendo un -

ritmo de flujo de 0,12 - 0,16 ml/minuto. Con la ayuda de un colector de fracciones LKB se recogieron fracciones de 1 ml en tubos conteniendo 1000 KIU de trasylol. En muestras de estas fracciones se determinó el contenido de glucagón, GLI e insulina según el método del radioinmunoensayo descrito en los apartados 6.2, 6.3 y 6.4.

7.1.2.1- Elución con ácido acético

Las columnas fueron equilibradas con 100 ml de ácido acético 1 M, después de lo cual se les aplicaron muestras de 500 a 1000 pg de los distintos extractos reconstituidos en este mismo diluyente.

El ritmo de flujo se mantuvo en 0,12 - 0,16 ml/minuto y se recogieron fracciones de 1 ml en tubos conteniendo 1000 KIU de trasylol. Las distintas fracciones obtenidas fueron liofilizadas y reconstituidas en 1 ml de tampón de glicocola 0,2 M , - BSA al 0,25% , suero bovino al 1% , pH 8,8, para determinaciones de glucagón y GLI.

7.2.- Caracterización tras electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis se llevó a cabo según la técnica de - Davis (DAVIS , 1964) en geles conteniendo 7% de acrilamida. Esta técnica proporciona un método excelente para la separación de las moléculas constituyentes de la muestra problema por : 1) di-

ferencias entre las movilidades electroforéticas de ellas como consecuencia de su distinta carga eléctrica y 2) por diferencias en sus pesos moleculares, debido a que los poros de los geles - producen una separación diferencial de las moléculas según su tamaño.

Los geles fueron incluidos en tubos cilíndricos de vidrio de 0,15 x 13 cm y constituidos en dos capas : una de gel con poro grande sobre el que se depositó la muestra y un segundo gel de poro pequeño en el que tuvo lugar la separación electroforética. Todos los tubos fueron constituidos con el mismo material de vidrio y dimensiones semejantes , con objeto de evitar diferencias individuales por una distinta resistencia eléctrica.

La electroforesis se realizó con los tubos en posición vertical con sus extremos inicial y terminal sumergidos en cubetas, de un material inerte no conductor, conteniendo la solución tampón compuesta de Tris 4,9 mM, glicocola 40 mM, urea 4 M a un pH de 8,3. En cada una de las cubetas se colocaron los electrodos de forma que los componentes de la muestra migraran hacia el gel de poro pequeño.

Las soluciones base empleadas fueron las siguientes :

- Solución A

HCl 0,5 N

Tris 3 M

TEMED 0,02 M

pH 8,9

- Solución B

HCl. 0,5 N

Tris 0,5 M

TEMED 0,04 mM

pH 6,7

- Solución C

Acrilamida 4 M

Bis-acrilamida 47 mM

Urea 8 M

- Solución E

Rivoflavina 0,1 mM

- Solución D

Acrilamida 1,4 mM

Bis-acrilamida 0,16 mM

- Solución F

Sacarosa 1,2 mM

Urea 8 M

Estas soluciones se mantuvieron a 4°C en botellas color topacio durante un máximo de 6 meses. A partir de ellas, el mismo día de la electroforesis, se prepararon los geles de la siguiente forma :

- Solución de poro pequeño-I

Una parte de la solución A

Dos partes de la solución C

Una parte de agua

pH 8,9

- Solución de poro pequeño-II

Persulfato amónico 6 mM

- Solución de poro grande

Una parte de la solución B

Dos partes de la solución D

Una parte de la solución E

Cuatro partes de la solución F

pH 6,7.

En primer lugar se preparó la columna del gel de poro - pequeño mezclando volúmenes iguales de las soluciones I y II y - añadiendo esta mezcla a los tubos correspondientes hasta una altura de 7 cm. Con objeto de eliminar la formación de un menisco - sobre la parte superior del gel se añadió una pequeña capa de agua que se dejó fluir lentamente a través de las paredes del tubo para evitar posibles mezclas con la solución del gel. Inmediatamente después, los tubos fueron colocados debajo de una luz durante 30 - 45 minutos. Transcurridos los primeros 5 minutos, se pudo - observar una dispersión de la luz en las soluciones indicando fotopolimerización del gel. Una vez conseguida esta, los tubos fueron invertidos sobre un papel absorbente para eliminar la capa de agua, añadiéndose a continuación la solución de poro grande hasta alcanzar una altura aproximada de 3 cm. Encima de ella se añadió de nuevo agua y se volvieron a dejar los geles bajo una luz durante 60 - 90 minutos, pasados los cuales se decantó el agua y se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de empezar la electroforesis.

Los tubos conteniendo los geles fueron insertados en sus adaptadores correspondientes con los extremos sumergidos en las - cubetas que contenían la solución tampón : Tris 4,9 mM, glicocola 40 mM, urea 4M, pH 8,3.

Alícuotas de los extractos tisulares fueron reconstituidos en un volumen de 0,1 ml de Tris 4,9 mM, glicocola 40 mM, urea

4 M, pH 8,3. Como marcadores se utilizaron glucagón cristalino e insulina porcina monocomponente disueltos en esta solución tampón a una concentración final de 20 µg/ml. Las soluciones conteniendo las muestras problema o los marcadores se introdujeron a través de la solución tampón dentro de los tubos conteniendo los geles y a unos 5 mm de la solución del gel permitiendo que se formara una capa entre la superficie del gel y la solución tampón. En uno de los geles se aplicó azul de bromofenol como control del tiempo de la electroforesis.

Una vez añadidas las muestras, se conectó la fuente de alimentación a las terminales de los electrodos y se aplicó una corriente de 2 - 5 mA/tubo. Cuando la banda de azul de bromofenol migró hasta aproximadamente 0,5 cm del final del tubo, se desconectó la fuente de alimentación. Con una corriente de cerca de 4 mA/tubo el tiempo de la electroforesis fue de 3 horas.

Una vez finalizada esta, se vaciaron las cubetas conteniendo la solución tampón y los tubos fueron liberados de sus adaptadores. Los geles fueron extraídos de los tubos con la ayuda de una jeringa inyectándoles lentamente agua hasta que el extremo final del gel salió del tubo.

Los geles conteniendo las distintas muestras y los marcadores fueron cortados en secciones de 2 mm las cuales fueron transferidas a tubos de ensayo conteniendo 0,2 ml de tampón de glicocola 0,2 M, BSA al 0,25%, suero bovino al 1%, pH 8,8. Estos tubos se mantuvieron a 4°C durante 12 horas, pasadas las cuales se eliminaron los geles de los tubos y en los 0,2 ml de solución tampón se determinó el contenido de glucagón y/o insulina.

La detección de las bandas de glucagón e insulina se

llevó a cabo por tinción de los geles con azul de coomassie preparado en ácido acético al 7 %, durante un mínimo de 1 hora. Pasada esta, el colorante fue extraído del gel por sucesivos lavados con ácido acético al 7 %.

8.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL GLUCAGON INMUNOREACTIVO PRESENTE EN EXTRACTOS EXTRAPANCREÁTICOS

8.1.- Aislamiento de membranas hepáticas de rata

Las membranas plasmáticas hepáticas fueron aisladas y parcialmente purificadas utilizando la técnica de Neville (NEVILLE, 1968) mediante centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa. Todos los pasos del proceso de purificación se realizaron a 0 - 4°C.

Los hígados se obtuvieron de ratas Wistar pesando entre 150 - 250 gr. Los animales fueron sacrificados por un golpe en la cabeza y el hígado fue inmediatamente extraído, liberándolo de cualquier resto de tejido conectivo que pudiera acompañarle y troceado con unas tijeras.

El tejido fue homogeneizado con ocho pases rápidos de émbolo, cuatro de ellos con un émbolo ligero y otros cuatro con un émbolo ajustado, después de lo cual el homogenado resultante fue diluido hasta 500 ml con sacarosa 0,25 M y filtrado sobre gasa doble para eliminar posibles restos de tejido conectivo. Esta suspensión fue colocada en botellas de 500 ml y centrifugada a 1500xg durante 30 minutos. El sobrenadante se decantó con cuidado y el precipitado se resuspendió en el homogeneizador con

tres pases de émbolo, añadiéndole después sacarosa 69 % hasta conseguir una suspensión sacarosa-homogenado al 44 % ajustada exactamente en un refractómetro Bausch & Lomb.

De esta suspensión se tomaron 15 ml que fueron transferidos a tubos de nitrato de celulosa sobre los que, lentamente - para evitar mezclas y conseguir dos capas bien definidas, se fueron añadiendo 10 ml de sacarosa 42,3 % (verificada igualmente en el refractómetro). Los tubos conteniendo el gradiente fueron entonces centrifugados en una ultracentrífuga Seckman, modelo L2-65B, rotor SW-27, a 25000 rpm durante 2 horas. Al cabo de este tiempo, y con la ayuda de una espátula, se recogieron las membranas, que se localizaron en forma de capa flotante sobre la superficie del gradiente. Las membranas fueron entonces homogeneizadas con una jeringa, resuspendidas en 35 ml de sacarosa 0,25 M y centrifugadas a 4°C , en una centrífuga Sorvall, rotor SS 34 a 15000 rpm durante 10 minutos. Finalizada la centrifugación , el sedimento fue resuspendido en sacarosa 0,25 M y conservado tal como se detalla en el apartado 8.1.2.

8.1.1.- Grados de pureza de las membranas hepáticas de rata:

Actividad de la 5' nucleotidasa y unión de glucagón -
mono - ¹²⁵I a su receptor durante las distintas etapas
del proceso de purificación

Los niveles de pureza de nuestra preparación se estimaron midiendo la actividad de la 5' nucleotidasa y la unión de glucagón mono - ¹²⁵I a sus receptores en cada paso del proceso de

purificación : homogenado, precipitado - 1500xg y fracción parcialmente purificada.

La 5' nucleotidasa cataliza la hidrólisis del fosfato de la molécula de 5'AMP y, por tanto, su actividad puede ser medida - por la liberación de adenosina.

- Reactivos

- Tris-HCl 50 mM , pH 7,8
- $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$, 10 mM
- 5'AMP , 10 mM
- AMP- 3H (actividad específica : 17 Ci/mmol)

La actividad de la 5' nucleotidasa fue determinada según el método de Avruch y Wallach (AVRUCH y WALLACH,1971), en un volumen total de 1 ml, conteniendo : 50 μ moles de Tris-HCl pH 7,8; 0,2 μ moles de Mg^{2+} , 0,2 μ moles de 5'AMP , 20000 cpm de 5'AMP- 3H y 20 μ g de proteína del homogenado, precipitado * 1500 x g o fracción parcialmente purificada. Paralelamente se pusieron unos tubos controles a los que no se les añadió proteína y un tubo para determinar las cuentas totales.

La incubación se realizó a 30°C durante 15 minutos, parándose la reacción por la adición de 0,2 ml de $SO_4 Zn$ 0,25 M y - $Ba(OH)_2$ 0,25 M. Tanto las proteínas como el 5'AMP no hidrolizado fueron precipitados mientras que la adenosina quedó en el sobrenadante.

Los tubos fueron entonces centrifugados en una centrifuga Beckman, modelo TJ-6RS, rotor TH-4, a 4000 rpm durante 10 -

minutos. Se tomaron entonces alícuotas de 0,5 ml del sobrenadante las cuales se contaron en 5 ml de líquido de centelleo Tolueno - Tritón X-100 (2 : 1 , V/V) conteniendo PPO (4 g/l) y POPOP - (0,1 g/l).

Los resultados obtenidos fueron expresados como μ moles de 5'AMP hidrolizados/mg de proteína/hora :

$$\frac{\text{cpm de la muestra} - \text{cpm del blanco}}{\text{cpm totales} - \text{cpm del blanco}} \times 0,2 \mu\text{moles AMP} \times 1/\text{mg} \times 1/\text{hr.}$$

La unión de glucagón mono - ^{125}I se realizó también en los tres pasos del proceso de purificación de las membranas plasmáticas de hígado, con objeto de tener otro indicador del grado de pureza de las preparaciones obtenidas.

Las incubaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 0,25 ml de Krebs Ringer fosfato BSA al 1 % , pH 7,5 , conteniendo 45 μ g de glucagón mono - ^{125}I y 40 - 60 μ g de proteína, durante 20 minutos a 30°C. La unión inespecífica de la hormona fue determinada por la adición de glucagón cristalino en exceso (10^{-6}M). Al final de las incubaciones la hormona libre fue separada de la hormona unida al receptor por microfiltración tal como se indica en el apartado 8.2.2.

8.1.2.- Conservación de las membranas hepáticas

Una vez realizado todo el proceso de purificación, las membranas hepáticas fueron conservadas a -263 °C en un tanque de nitrógeno líquido (Unión Carbide, modelo 2R - 7). Las membranas

así conservadas mantienen su actividad biológica durante meses.

8.2.- Desplazamiento del glucagón mono - 125 I unido a sus receptores hepáticos por alícuotas de extractos pancreáticos y extrapancreáticos y glucagón pancreático cristalino.

Dada la alta especificidad y afinidad del glucagón por su receptor, estas propiedades pueden ser utilizadas para medir la potencia biológica de muestras en las que se sospeche la presencia de la hormona. Simultáneamente se deben realizar valoraciones con concentraciones conocidas de glucagón cristalino, lo cual permitirá cuantificar la actividad biológica de las muestras problema.

Este procedimiento experimental aventaja al radioinmunoensayo al dar una información fidedigna sobre la cantidad total de hormona activa, lo cual le da una mayor importancia fisiológica. Utilizando un ensayo de " radioreceptores " en membranas hepáticas de rata, nosotros hemos podido detectar hasta 20 pg de glucagón.

8.2.1.- Características del ensayo biológico

El glucagón cristalino estandar y las muestras problema fueron diluidas en Krebs Ringer fosfato conteniendo BSA al 1% , - pH 7,5.

Tubos de ensayo con un volumen total de 0,5 ml de Krebs

Ringer fosfato, pH 7,5 , conteniendo 20 - 5000 pg/ml de glucagón cristalino estandar o de glucagón, previamente determinado por radioinmunoensayo, de los extractos tisulares y 50 - 100 µg de proteína de membranas hepáticas, fueron incubados durante 30 minutos a 20°C. Después de este período de tiempo se añadieron 50 pg de glucagón mono - ¹²⁵I, continuándose la incubación durante otros 15 minutos. Finalizada esta segunda incubación, los contenidos de los tubos de ensayo fueron diluidos por la adición de 1 ml de Krebs Ringer fosfato conteniendo BSA al 1 %, pH 7,5. Inmediatamente después, la hormona libre fue separada de la hormona unida al receptor por microfiltración tal como se indica en el apartado 8.2.2.

Para los cálculos hemos representado el tanto por ciento de glucagón mono - ¹²⁵I específicamente unido a las membranas hepáticas en función de la concentración de hormona no marcada. La unión obtenida con concentraciones de glucagón de 10^{-6} M se consideró como inespecífica.

8.2.2.- Separación de la hormona unida al receptor de la hormona libre

El método empleado para la separación de la hormona libre de la hormona unida al receptor fue la microfiltración utilizando filtros OXOID de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0,45 µm. Con objeto de evitar la adsorción de la hormona al filtro, estos fueron sumergidos en Krebs Ringer fosfato conteniendo BSA al 10 %, al menos 1 hora antes de ser utilizados. Una vez terminada

la microfiltración los filtros, conteniendo la hormona unida al receptor, fueron contados en un contador Packard para radiaciones gamma.

9.- BIOSINTESIS DE GLUCAGON

9.1.- Estudios en ratas

9.1.1.- Obtención de células aisladas de glándulas submaxilares y timo

El método empleado fue la digestión enzimática con colagenasa. Para ello, se utilizaron ratas Wistar hembras pesando entre 200 - 250 gr con un ayuno de 12 - 18 horas. Una vez anestesiados los animales, se les extrajeron rápidamente el timo y las glándulas submaxilares que fueron colocados en una placa Petri y cortados muy finamente con unas tijeras. El tejido fue entonces colocado en 30 ml de Krebs Ringer bicarbonato BSA al 1 %, conteniendo 30 mg de colagenasa tipo I y agitado a 37°C durante 10 minutos en una atmósfera de O_2 y CO_2 (95 % : 5 %). Pasado este tiempo se filtró el sobrenadante por gasa doble y al resto del tejido se le añadieron 30 ml de Krebs Ringer bicarbonato BSA al 1% , conteniendo 15 mg de colagenasa, manteniéndolo de nuevo a 37°C durante 10 minutos. Los filtrados obtenidos después de las dos incubaciones fueron mezclados y las células incluidas en ellos se lavaron tres veces mediante centrifugación a 200 x g durante 30 segundos. El precipitado final fue resuspendido en 10 ml de Krebs Ringer bicarbonato , previamente oxigenado con O_2 y CO_2 (95 % : 5 %) y -



mantenido a 4°C.

La viabilidad obtenida con este método, medida por exclusión con azul tripán 0,5 %, fue de un 85 % - 95 %.

9.1.2.- Aislamiento de hepatocitos

El método empleado para la obtención de hepatocitos fue un sistema de perfusión del hígado intacto con un tampón conteniendo colagenasa. El medio fue perfundido con la ayuda de una bomba peristáltica, SAGE 375 - A, manteniendo un ritmo de flujo de 35ml/min. Los tampones utilizados fueron mantenidos en una atmósfera de O₂ y CO₂ (95 % : 5 %), a 37°C antes de realizar el experimento y durante todo el tiempo que duró la perfusión.

Se utilizaron ratas hembras Wistar pesando entre 200-500 gr, con un ayuno de 12-18 horas. Una vez anestesiados los animales en una atmósfera de éter etílico, se les practicó una incisión media abdominal, apartándose el paquete intestinal hacia el lado izquierdo con objeto de exponer las venas porta - hepática y cava inferior. Inmediatamente después la vena porta fue canulada, practicándose una ligadura alrededor de ella justo antes de su entrada en el hígado. La vena cava inferior fue entonces seccionada permitiendo, de esta forma, que el líquido de perfusión escapara por esta vía.

La perfusión fue programada de la siguiente manera : en primer lugar se perfundió con Krebs Ringer bicarbonato, libre de - Ca²⁺ y Mg²⁺, pH 7,4, conteniendo 0,33 mg/ml de EDTA, durante 4 minutos, para después hacerlo con Krebs Ringer bicarbonato, libre

de Mg^{2+} , pH 7,4, conteniendo 0,22 mg/ml de colagenasa tipo I. Cinco minutos después de comenzar la perfusión con la enzima, el hígado fue extraído y troceado en una placa Petri que contenía 20 ml de Krebs Ringer bicarbonato. A continuación, los hepatocitos - fueron liberados de los pequeños trozos de hígado tras agitación bajo una atmósfera de O_2 y CO_2 (95 % : 5 %), durante 5 minutos. La suspensión así obtenida fue filtrada a través de una gasa doble suspendida sobre un tubo de centrifuga, lavándose las células tres veces en Krebs Ringer bicarbonato, pH 7,4, mediante centrifugación a 200 x g durante 30 segundos. El precipitado final fue resuspendido en 20 - 30 ml de Krebs Ringer bicarbonato, pH 7,4 - y mantenido a 4°C hasta su utilización.

La viabilidad celular, medida por exclusión con azul - tripán al 0,5 %, fue de 80 % - 90 %.

9.1.3.- Procedimiento seguido en las incubaciones de células aisladas o trozos de tejido con triptófano - H^3

Todas las incubaciones se realizaron a 37°C en un baño - metabólico con agitación continua y bajo una atmósfera de O_2 y CO_2 (95 % : 5 %).

Las células ($2 \times 10^5 - 10^6$) o trozos de tejido (20 - 60 mg) fueron incubados en 1 ml de Krebs Ringer bicarbonato conteniendo BSA al 1 % y suplementado con glucosa (1 mg/ml). Después de 20 minutos de incubación se añadieron 25 μ l de triptófano - H^3 (actividad específica : 6 Ci/mmol ; 1 mCi/ml) y se mantuvieron en estas condiciones durante 1,2,4 o 6 horas. En algunas incuba-

ciones, se añadieron al medio 1000 KIU de trasylol.

Con objeto de conseguir una inhibición de la incorporación de triptófano - ^3H en proteínas, células de las glándulas submaxilares (1×10^6) fueron incubadas con 25 μCi de triptófano - ^3H durante 2 horas, después de las cuales se añadió al medio cicloheximida (100 $\mu\text{g/ml}$), o bien el medio fue centrifugado y el precipitado resultante resuspendido en un medio nuevo conteniendo 1 mg de triptófano no radiactivo, continuándose las incubaciones durante otras 2 horas. Esta concentración de cicloheximida fue suficiente para bloquear la síntesis de proteínas.

Finalizadas las incubaciones, el medio con las células fue precipitado por la adición de 1 ml de TCA al 20 %. Los tubos fueron centrifugados en una centrífuga Beckman TJ - 6RS, rotor - TH - 4, a 3000 rpm durante 10 minutos, y el precipitado resultante fue extraído con una solución alcohol - ácida, de acuerdo con el método descrito en el apartado 4.

Los medios conteniendo trozos de tejido se homogeneizaron en solución alcohol - ácida y se extrajeron según se indica en el apartado 4.

9.1.4.- Purificación parcial de las formas inmunoreactivas de glucagón extrapancreático

Los extractos obtenidos (apartado 9.1.3.) se resuspendieron en tampón de glicocola 0,2 M , conteniendo BSA al 0,25 % y suero bovina al 1 % , pH 8,8 o en ácido acético 1 M, y se cromatografiaron a 4°C en columnas (1 cm x 60 cm) de Bio-Gel P-30, -

equilibradas con tampón de glicocola 0,2 M , pH 8,8 o con ácido acético 1 M. El ritmo de flujo fue de 0,12 - 0,16 ml/minuto. Con la ayuda de un colector LKB se recogieron fracciones de 1 ml. Las columnas fueron calibradas con azul dextrano, glucagón mono - ^{125}I e insulina mono ^{125}I como marcadores de peso molecular.

En uno de los extractos cromatografiados, alícuotas de las fracciones 12 - 20 , correspondientes al pico de mayor peso molecular, fueron mezcladas y liofilizadas. Después de su resuspensión en tampón de glicocola 0,2 M , conteniendo BSA al 0,25 % y suero bovino al 1 %, pH 8,8 , fueron tratadas con tripsina (1µg/ml) a 37°C durante 20 minutos. La reacción fue parada por la adición de 50 µl de ácido acético y el tubo conteniendo la solución se sumergió en baño maría durante 5 segundos, después de lo cual, se volvió a repetir la cromatografía en la misma columna de Bio - Gel P-30.

9.1.5. Detección de polipéptidos- ^3H inmunoreactivos con el anticuerpo 30K

El contenido en glucagón inmunoreactivo en las distintas fracciones obtenidas de la cromatografía, fue determinado utilizando una técnica de doble anticuerpo con suero anti - conejo obtenido en la cabra como segundo anticuerpo y empleando como primer anticuerpo el 30K.

La unión al anticuerpo se llevó a cabo por la incubación a 37°C durante 1 hora de alícuotas de las distintas fracciones - con trasylol (1000 KIU/ml) y antisuero 30K (dilución final : 1 : 20000), en un volumen final de 1 ml. La hormona unida al anti-

cuerpo fue precipitada por la adición del segundo anticuerpo (dilución 1 : 250). Los tubos fueron entonces incubados a 4°C durante 48 horas y centrifugados en una centrífuga Beckman TJ - 6RS, - rotor TH-4, a 3000 rpm durante 30 minutos. El precipitado conteniendo el complejo hormona - anticuerpo, fue disuelto en 1 ml de OHNa 0,05 N y mezclado con 10 ml de tolueno - tritén X -100 (2 : 1) - conteniendo PPO (4 g/l) y POPOP (0,1 g/l).

9.2.- Biosíntesis de glucagón por las glándulas salivares humanas

Trozos de glándulas submaxilares y parótidas obtenidas en el quirófano, fueron inmediatamente sumergidos en Krebs Ringer bicarbonato conteniendo BSA al 1 %, cortados en pequeñas porciones y con la ayuda de unas tijeras . Los procedimientos experimentales - seguidos para la obtención de células, incubaciones, purificación y determinación de glucagón, fueron semejantes a los ya descritos para la rata.

10.- FACTORES QUE MODULAN LA SECRECIÓN DE GLUCAGON EXTRAPANCREÁTICO

10.1- Estudios in vivo

10.1.1.- Secreción de glucagón extrapancreático en condiciones basales y tras la sobrecarga intravenosa de arginina en perros

Después de que los perros fuesen intervenidos quirúrgi-

camente (apartado 3), se tomaron muestras de sangre antes, durante y después de la administración intravenosa de arginina (0,5 g / Kg de peso corporal). Estas muestras fueron centrifugadas en una centrífuga Beckman TJ - 6RS, rotor TH - 4, a 3000 rpm durante 10 minutos.

En los plasmas obtenidos se determinaron las concentraciones de glucagón mediante radioinmunoensayo con el anticuerpo 30K según se detalla en el apartado 6.2.

10.2.- Estudios in vitro

10.2.1.- Control de la secreción de glucagón en células aisladas y trozos de tejido de la rata o células aisladas de glándulas salivares humanas

Células aisladas (2×10^5) o trozos de tejido (20 - 60 mg) fueron transferidos a viales que contenían 1 ml de Krebs Ringer bicarbonato BSA al 1 % , previamente gaseado con O_2 y CO_2 (95% : 5%) conteniendo trasyolol (1000 KIU). La incubación se realizó a 37°C en un baño metabólico con agitación y en una atmósfera de O_2 y CO_2 (95 % : 5 %). En algunos viales el medio estaba enriquecido con glucosa (30 , 100 o 300 mg/ml) , arginina (5 mM) , noradrenalina (5 μ g) o insulina porcina monocomponente (5 μ g).

Después de 2 horas de incubación las células o trozos de tejido fueron desechadas y en el medio de incubación se determinó la concentración de glucagón por radioinmunoensayo con la ayuda del anticuerpo 30K.

RESULTADOS

1.- CONCENTRACIONES DE GLUCOSA , GLUCAGON , GLI E INSULINA EN EL PLASMA DE RATAS CONTROLES Y DIABETICAS

En ratas diabéticas , las concentraciones en plasma de glucosa y glucagón (381 ± 21 mg/100 ml y $0,23 \pm 0,02$ ng/ml, respectivamente) fueron encontradas elevadas y las de insulina ($10 \pm 1,1$ μ U/ml) disminuidas, en comparación con los valores obtenidos en las ratas controles (120 ± 16 mg/100 ml , $0,16 \pm 0,02$ ng/ml y $60,6 \pm 10,7$ μ U/ml, de glucosa, glucagón e insulina, respectivamente) (Tabla 1). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas (glucosa : $P < 0,01$, insulina: $P < 0,01$, glucagón : $P < 0,05$).

Las concentraciones de GLI también fueron encontradas elevadas en las ratas diabéticas : $0,8 \pm 0,1$ ng/ml frente a los $0,7 \pm 0,06$ ng/ml determinados en las ratas controles, aunque la diferencia entre ambos valores no fue estadísticamente significativa.

2.- DISTRIBUCION TISULAR DE GLUCAGON , GLI E INSULINA

2.1.- Ratas controles

En un intento por conocer las fuentes productoras de glucagón, insulina y GLI, en extractos ácido - alcohólicos de diferentes tejidos de la rata, se determinaron las concentraciones de estas hormonas en una amplia variedad de ellos.

TABLA 1

CONCENTRACIONES EN PLASMA DE GLUCOSA, GLUCAGON, GLI E INSULINA EN RATAS
CONTROLES Y DIABETICAS. MEDIAS \pm ES. N=10.

	Peso corporal (grs)	Glucosa (mg/100ml)	Glucagon (ng/ml)	GLI (ng/ml)	insulina (μ U/ml)
Controles	133 \pm 4	120 \pm 16	0.16 \pm 0.02	0.7 \pm 0.06	60.6 \pm 10.7
Diabeticas	137 \pm 7	**381 \pm 21	*0.23 \pm 0.02	0.8 \pm 0.1	**10.0 \pm 1.1

* P<0.05

* * P<0.01

En tres de estos tejidos : hipotálamo, hígado y mucosa esofágica, no se pudo detectar la presencia de ninguna de estas hormonas.

En ratas controles (Tabla 2), el mayor contenido de glucagón fue encontrado en el páncreas, seguido de la mucosa gastrointestinal. Dentro del tracto gastrointestinal, la concentración hormonal fue escasa en el estómago e intestino delgado superior y significativamente más elevada en el yeyuno e íleon - ($2,75 \pm 0,44$ ng de glucagón/mg). El timo fue, después de la mucosa gastrointestinal, el órgano con un mayor contenido de glucagón ($2,79$ ng), seguido de las glándulas salivares ($1,48$ ng) y, en mucho menor grado, del tiroides ($0,28$ ng), glándulas suprarrenales ($0,25$ ng) e hipófisis ($0,20$ ng).

Con objeto de determinar el contenido en GLI de los extractos tisulares, utilizamos en el inmunoensayo el antisuero AG-10, que tiene capacidad de unión con el glucagón y con polipéptidos de origen intestinal. Por tanto, si los resultados obtenidos con ambos antisueros (30K y AG - 10) se expresan a través de un cociente glucagón/GLI , los valores inferiores a la unidad indicarán la presencia de GLI. De acuerdo con ello, en la Tabla 2 podemos observar que el mayor contenido de GLI se encuentra en la porción post-duodenal de la mucosa intestinal. Asimismo cantidades significativas, aunque menores, de estos péptidos fueron encontradas en el timo, glándulas salivares e hipófisis. Tanto en el páncreas como en el tiroides no se detectó la presencia de GLI.

Por otra parte, cuando el glucagón se extrajo con una -

TABLA 2

DISTRIBUCION TISULAR DE GLUCAGON Y GLI EN RATAS CONTROLES. MEDIA \pm ES. N=10

	Peso 6rgano (mg)	Glucagon (ng/100mg tejido)	GLI (ng/100mg tejido)	Cociente glucagon/GLI
Est6mago	213 \pm 8	1,71 \pm 0,15	1,60 \pm 0,16	1,06
Duodeno	314 \pm 26	0,95 \pm 0,11	2,36 \pm 0,53	0,40
Yeyuno	719 \pm 49	1,89 \pm 0,21	13,80 \pm 2,38	0,14
Ileon	763 \pm 54	2,75 \pm 0,44	42,02 \pm 10,6	0,06
Colon recto	214 \pm 23	1,98 \pm 0,42	27,50 \pm 4,43	0,07
Par6tidas	229 \pm 20	0,41 \pm 0,05	0,60 \pm 0,13	0,68
Submaxilares	221 \pm 16	0,23 \pm 0,03	0,35 \pm 0,08	0,65
Sublinguales	57 \pm 6	0,65 \pm 0,06	1,52 \pm 0,30	0,43
Pancreas	704 \pm 51	645,15 \pm 92,8	561,00 \pm 89,10	1,15
Timo	374 \pm 41	0,75 \pm 0,09	1,84 \pm 0,30	0,41
Suprarrenales	29 \pm 2	0,86 \pm 0,13	1,80 \pm 0,46	0,48
Tiroides	12 \pm 1	2,43 \pm 0,90	2,50 \pm 0,84	0,97
Hip6fisis	5 \pm 0,3	4,01 \pm 0,60	6,06 \pm 1,32	0,66
Ri6ones	601 \pm 22	0,09 \pm 0,01	0,21 \pm 0,04	0,43

Las hormonas fueron medidas en alfcuotas de extractos 6cido-alcoh6licos

solución salina acidificada con HCl hasta un pH de 2,8 , los valores de glucagón disminuyeron sensiblemente en la mayoría de los órganos estudiados, posiblemente como consecuencia del mayor poder degradativo de este medio en relación a las soluciones ácido alcohólicas.(tabla 3). Sin embargo, en las glándulas submaxilares se observó un gran incremento en las concentraciones de esta hormona, pudiéndose detectar 66 veces más cantidad de glucagón que cuando la extracción se realizó con una solución ácido - alcohólica. El timo fue otro de los órganos en los que se elevó la cantidad detectada de glucagón (6,99 ng en extractos ácido - salinos frente a los 2,79 ng hallados en los extractos ácido-alcohólicos.

En contraste con la amplia distribución tisular del glucagón y GLI, la insulina solo pudo ser detectada en el páncreas - (21037 ng) y, en muy pequeña cantidad en el timo (17,89 ng) - (Tabla 4).

2.2.- Ratas diabéticas

En ratas hechas diabéticas por la administración intracardíaca de estreptozotocina, el contenido de glucagón en los distintos órganos no se modificó significativamente en relación a los valores encontrados en las ratas controles (Tabla 5). Sin embargo, las concentraciones de GLI fueron más elevadas en la mucosa - gastrointestinal, glándulas salivares, hipófisis y tiroides de las ratas diabéticas.

Por otra parte, las concentraciones de insulina descen-

TABLA 3

DISTRIBUCION TISULAR DE GLUCAGON INMUNOREACTIVO MEDIDO EN EXTRACTOS
ACIDO-ALCOHOLICOS Y ACIDO-SALINOS. MEDIA \pm ES. N=10.

	Glucagón (ng/órgano)	
	Acido-alcohólico	Acido-salino
Estómago	3,65 \pm 0,32	1,30 \pm 0,20
Duodeno	2,88 \pm 0,28	4,87 \pm 0,85
Yeyuno	14,40 \pm 1,38	9,32 \pm 1,50
Ileon	20,19 \pm 2,94	7,00 \pm 0,71
Parótidas	0,61 \pm 0,06	1,94 \pm 0,32
Submaxilares	0,49 \pm 0,07	32,50 \pm 6,43
Pancreas	4398,98 \pm 710,90	137,33 \pm 25,13
Timo	2,79 \pm 0,46	6,99 \pm 0,84
Suprarrenales	0,25 \pm 0,04	ND
Tiroides	0,28 \pm 0,05	ND
Hipófisis	0,20 \pm 0,02	ND
Riñones	0,54 \pm 0,06	ND

ND= no detectado

TABLA 4

CONTENIDO DE INSULINA EN PANCREAS Y TIMO DE RATAS CONTROLES Y DIABETICAS. MEDIA \pm ES. N=10.

Organo	Ratas controles		Ratas diabéticas	
	ng/100mg tejido	ng/órgano	ng/100mg tejido	ng/órgano
Pancreas	2818 \pm 295	21.037 \pm 2911	8,96 \pm 1,67	86,4 \pm 17,7
Timo	5 \pm 0,8	17,89 \pm 3,07	7,22 \pm 1,38	19,5 \pm 4,1

La hormona fue medida en alícuotas de extractos ácido-alcohólicos.

TABLA 5

DISTRIBUCION TISULAR DE GLUCAGON Y GLI EN RATAS DIABETICAS.MEDIA±ES.N=10.

	Peso órgano (mg)	Glucagón (ng/100mg tejido)	GLI (ng/100mg tejido)	Cociente glucagon/GLI
Estómago	215±13	1,58±0,15	3,40±0,74	0,46
Duodeno	284±23	1,31±0,16	7,19±1,49	0,18
Yeyuno	664±45	1,85±0,23	33,80±4,35	0,05
Ileon	645±81	2,31±0,44	31,50±5,03	0,07
Colon Recto	194±15	2,35±0,59	77,70±24,36	0,03
Parótidas	190±18	0,36±0,09	1,58±0,37	0,23
Submaxilares	188±9	0,37±0,06	0,81±0,22	0,46
Sublinguales	47±4	1,04±0,28	2,20±0,42	0,47
Pancreas	917±72	552,14±101,38	624,60±75,20	0,90
Timo	287±31	0,73±0,09	1,35±0,17	0,54
Suprarrenales	35±2	0,55±0,11	1,21±0,16	0,45
Tiroides	13±1	2,87±0,42	4,55±0,74	0,63
Hipófisis	6±0,3	4,63±0,90	17,30±6,19	0,27
Riñones	721±21	0,06±0,01	0,58±0,17	0,11

Las hormonas fueron medidas en alícuotas de extractos ácido-alcohólicos.

dieron de 21037 ng en el páncreas de ratas controles a valores mínimos (86 ng) en el páncreas de animales diabéticos (Tabla 4). No se pudo observar este mismo fenómeno en el timo, conservando los animales diabéticos los mismos valores, e incluso superiores, de insulina que los animales no sometidos a tratamiento con estreptozotocina.

3.- CARACTERES DISTINTIVOS INTERESPECIES EN LA DISTRIBUCION TISULAR DEL GLUCAGON EXTRAPANCREATICO

Las glándulas salivares de humanos y el tiroides y glándulas submaxilares de perros fueron homogeneizados y extraídos - según se indica en Materiales y Métodos y el contenido total de glucagón fue estimado y comparado con los valores obtenidos en la rata (Tabla 6).

Inmunoreactividad para el glucagón se detectó en las tres especies estudiadas y se pudo observar que, en general, los tejidos extraídos con salino - acidificado poseían valores más elevados de esta hormona que los tejidos extraídos con ácido -salino.

Los extractos salinos de las glándulas submaxilares de rata son, sin lugar a dudas, los que poseen un contenido más elevado en glucagón ($165 \pm 30,5$ ng/g de tejido), seguidos por los de humanos ($18,5 \pm 2,5$ ng/g de tejido) y , finalmente, los de perro con cantidades muy inferiores ($1,48 \pm 0,36$ ng/g de tejido).

Las cantidades de glucagón inmunoreactivo encontradas en

TABLA 6

DISTRIBUCION TISULAR DE GLUCAGON INMUNOREACTIVO EN EXTRACTOS ACIDO-ALCOHOLICOS Y ACIDO-SALINOS DE PERRO, RATA Y HUMANOS. MEDIA \pm ES.

Especie	Organos	Glucagon (ng/g tejido)	
		Acido-alcohólico	Acido-salino
Rata (N=10)	Gl. Submaxilares	2,3 \pm 0,3	165 \pm 30,5
	Gl. Parótidas	4,1 \pm 0,5	9,7 \pm 1,5
	Tiroides	24,3 \pm 9,0	ND
Perro (N=5)	Gl. Submaxilares	0,98 \pm 0,12	1,48 \pm 0,36
	Tiroides	1,1 \pm 0,25	1,86 \pm 0,36
Humanos	Gl. Submaxilares (N=7)	8,9 \pm 1,2	18,50 \pm 2,50
	Gl. Parótidas (N=3)	2,9 \pm 1,3	3,50 \pm 0,30

ND = No detectado



las glándulas parótidas, tanto de ratas como humanas, fueron también muy elevadas cuando las determinaciones se realizaron en extractos ácido - salinos, a pesar de que las concentraciones detectadas fueron muy inferiores a las de las glándulas submaxilares.

Mientras que los extractos salinos del tiroides de perro presentaban una pequeña elevación de su contenido en glucagón - frente a extractos alcohol - ácidos, en el tiroides de la rata no se detectó glucagón inmunoreactivo cuando fue extraído con ácido-salino. Teniendo en cuenta que la degradación de la hormona en - los extractos ácido - salinos (71 %) es muy superior a la que - tiene lugar en extractos alcohol - ácidos (1 - 3 %), esta falta aparente de glucagón en los extractos ácido - salinos del tiroides de rata puede ser la consecuencia de una activación del proceso - degradativo.

4.- CARACTERIZACION DE LAS FORMAS INMUNOREACTIVAS DE GLUCAGON, GLI E INSULINA DE ORIGEN PANCREATICO O EXTRAPANCREATICO

4.1.- Fraccionamiento cromatográfico

4.1.1.- Fraccionamiento cromatográfico de las formas immuno- reactivas de glucagón

La Fig 4 muestra la distribución de la inmunoreactividad para glucagón (determinada con el anticuerpo 30K) en extractos - ácido - alcohólicos de páncreas, yeyuno, timo y glándulas submaxilares de rata después de la cromatografía en columnas (1 cm x 60

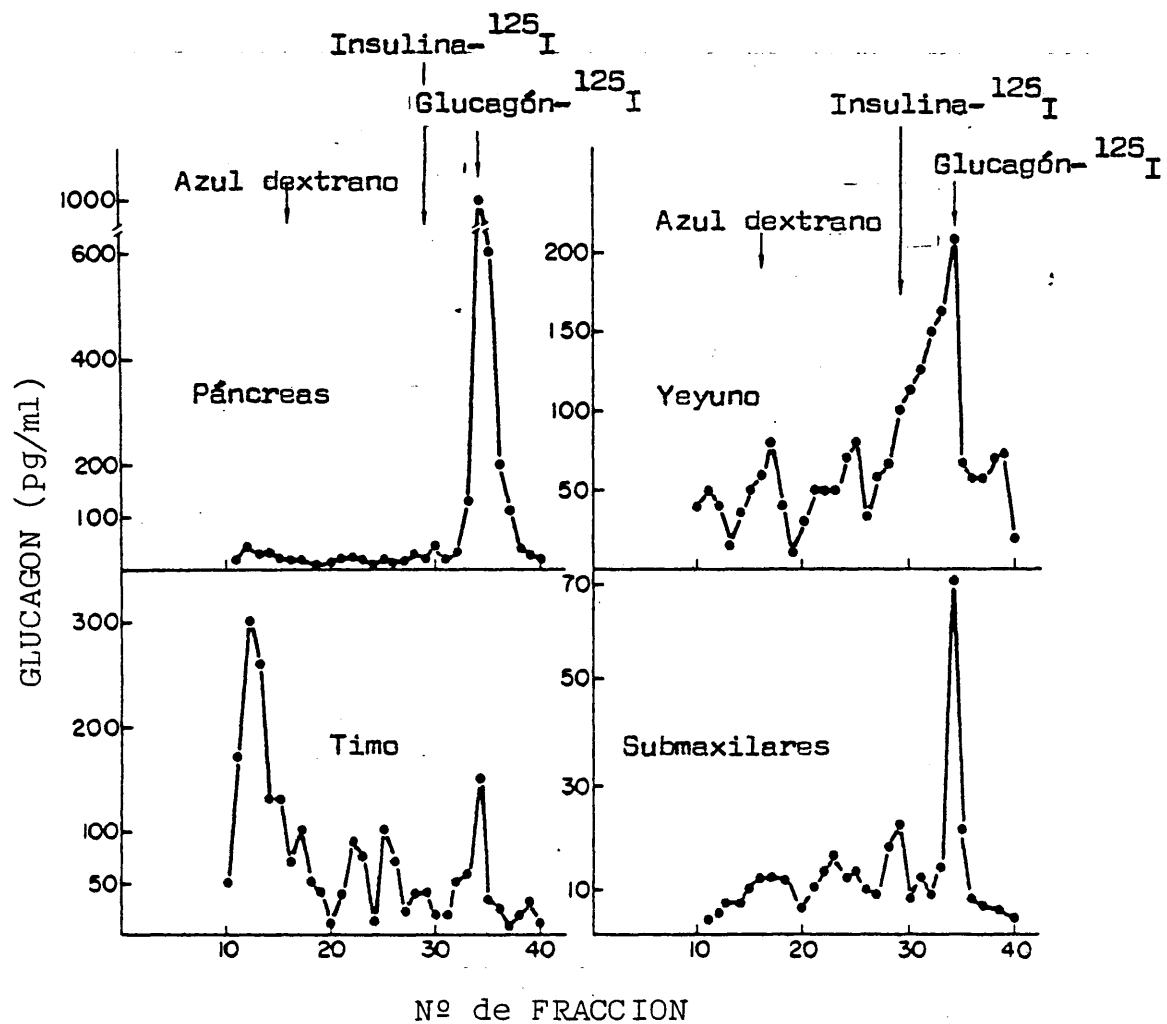


Figura 4.- PERFILES CROMATOGRÁFICOS DEL GLUCAGON IMMUNOREACTIVO PRESENTE EN EXTRACTOS ACIDO - ALCOHOLICOS DE PANCREAS, TIMO, YEYUNO Y GLANDULAS SUBMAXILARES.

Alícuotas de los extractos fueron aplicadas a columnas (1 cm x 60 cm) de Bio-Gel P-30 equilibradas con tampón de glicocola 0,2 M, conteniendo BSA al 0,25 % y suero bovino al 1 %, pH 8,8. Las fracciones recogidas fueron de 1 ml ; en alícuotas de ellas se determinó el contenido en glucagón con la ayuda del anticuerpo 30K.

cm) de Bio-Gel P-30, eluidas con tampón de glicocola 0,2 M, conteniendo BSA al 0,25 % y suero bovino al 1 %, a un pH de 8,8.

En el páncreas cerca del 90 % de la inmunoreactividad - apareció en la zona correspondiente a un peso molecular de 3500 - daltons (zona de elución del marcador : glucagón - ^{125}I). En - extractos de yeyuno y glándulas submaxilares, el principal pico - inmunoreactivo eluyó en la zona del marcador glucagón - ^{125}I , elu- yendo los restantes en zonas anteriores al marcador insulina - ^{125}I . En cuanto a los extractos de timo, el pico inmunoreactivo princi- pal eluyó en el volumen vacío de la columna.

Comparando las gráficas obtenidas utilizando extractos - ácido - alcohólicos con las obtenidas mediante la extracción con - ácido - salino (Fig 5), se puede observar una distribución seme- jante de cuatro picos inmunoreactivos para glucagón, similares a los descritos previamente por Valverde y col (VALVERDE y col., - 1970) en plasma de humanos y animales de experimentación. Estos - picos se distribuyen de la siguiente forma :

Pico I, de alto peso molecular, presente en el volumen - vacío de la columna. Pico II, correspondiente aproximadamente a la zona de peso molecular de 9000 dalton . Pico III, con un peso mo- lecular de 3500 dalton , correspondiente al lugar de elución del - glucagón, y pico IV, con un peso molecular inferior a 3000 dalton .

Para eliminar la posibilidad de que los picos I y II, de alto peso molecular, fueran agregaciones de péptidos unidos no co- valentemente, se realizó una cromatografía en columnas (1 x 60 cm) de Bio-Gel P-30 eluidas con ácido acético 1 M (Fig 6). El trata- miento con ácido acético prácticamente no modificó el perfil de -

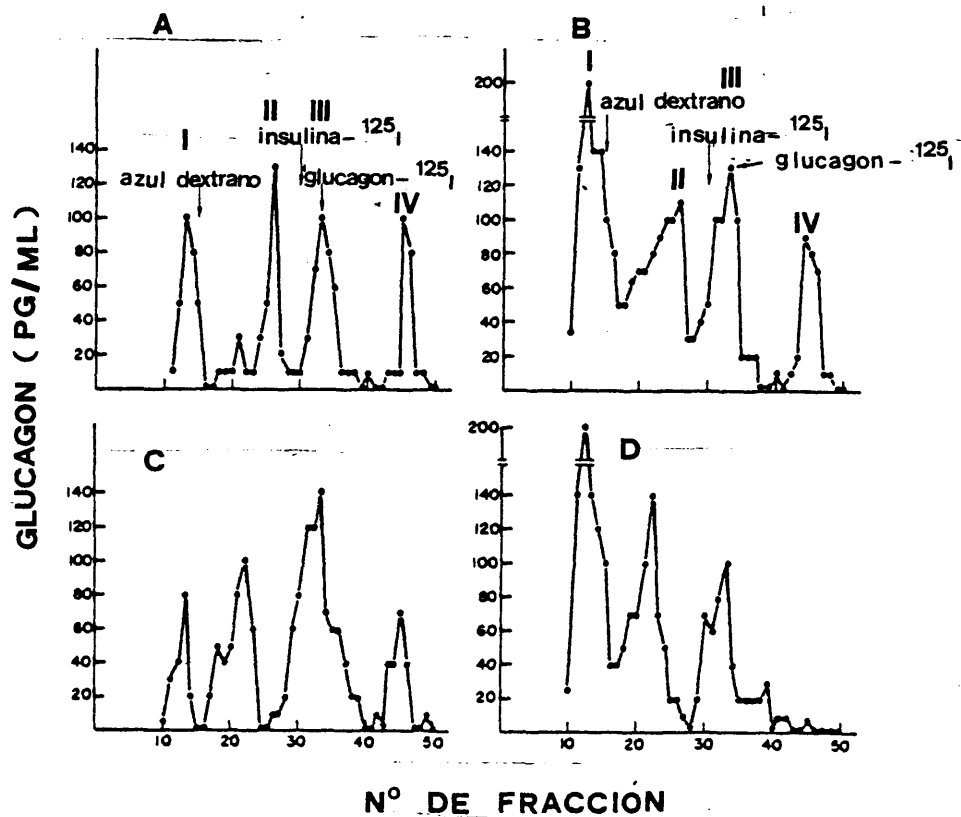


Figura 5.- PERFILES CROMATOGRÁFICOS DEL GLUCAGON INMUNOREACTIVO PRESENTE EN EXTRACTOS ACIDO-ALCOHOLICOS Y SALINO - ACIDIFICADO DE TIMO Y GLANDULAS SUBMAXILARES DE RATA.

Alícuotas de los extractos fueron aplicadas a columnas (1 cmx60 cm) de Bio-Gel P-30 equilibradas con tampón de glicocola 0,2 M, conteniendo BSA al 0,25 % y suero bovino al 1 % , pH 8,8. Se recogieron fracciones de 1 ml ; en alícuotas de ellas se determinó el contenido en glucagón con la ayuda del antisuero 30K.
 Panel A : Timo , extracción ácido - alcohólica. Panel B : Timo, extracción ácido - salina. Panel C : Gl. submaxilares, extracción - ácido - alcohólica. Panel D : Gl. submaxilares, extracción ácido - salina.

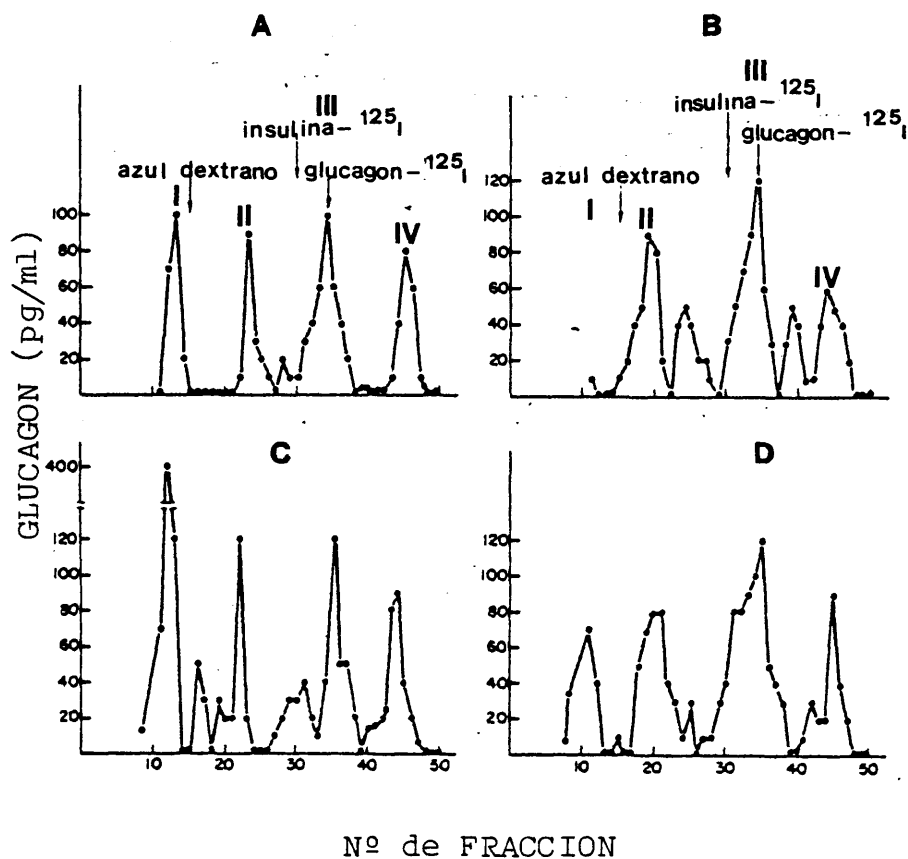


Figura 6.- PERFILES CROMATOGRÁFICOS DEL GLUCAGON INMUNOREACTIVO PRESENTE EN EXTRACTOS ÁCIDO - ALCOHÓLICOS Y ÁCIDO - SALINO DE TIMO Y GLANDULAS SUBMAXILARES DE RATA.

Alícuotas de los extractos fueron aplicadas a columnas (1 x 60 cm) de Bio-Gel P-30, equilibradas con ácido acético 1 M. Se recogieron fracciones de 1 ml ; en alícuotas de ellas, se determinó el contenido en glucagón con la ayuda del anticuerpo 30K. Panel A : Timo , extracción ácido - alcohólica. Panel B : Timo : extracción ácido - salina. Panel C : Gl. submaxilares, extracción ácido - alcohólica. Panel D : Gl. submaxilares, extracción ácido-salina.

elución de los extractos, obteniéndose como en el caso de la elución con tampón de glicocola 0,2 M, cuatro picos bien diferenciados tanto en extractos ácido - alcohólicos como en extractos ácido - salinos.

En la Fig 7 se presentan los perfiles cromatográficos - obtenidos con extractos ácido - alcohólicos de glándulas submaxilares humanas. En las gráficas obtenidas se pudo observar siempre un pico inmunoreactivo principal que eluyó en la zona correspondiente a un peso molecular de 3500 dalton .

4.1.2.- Fraccionamiento cromatográfico de las formas inmunoreactivas de GLI

La Fig 8 representa los perfiles cromatográficos obtenidos cuando alícuotas de extractos ácido - alcohólicos de yeyuno, - timo y glándulas submaxilares de rata fueron cromatografiados en - columnas (1 cm x 60 cm) de Bio-Gel P-30. En los eluidos de estos extractos se determinó la inmunoreactividad que presentaban con el anticuerpo AG - 10.

Como en el caso del glucagón, se obtuvieron varios picos inmunoreactivos, uno de los cuales eluía siempre en la zona del - marcador glucagón - ¹²⁵I, observándose sin embargo picos adicionales.

En el caso de la cromatografía en estas mismas columnas de extractos de glándulas salivares humanas (Fig 9), se obtuvo - también una amplia distribución de picos inmunoreactivos con el -

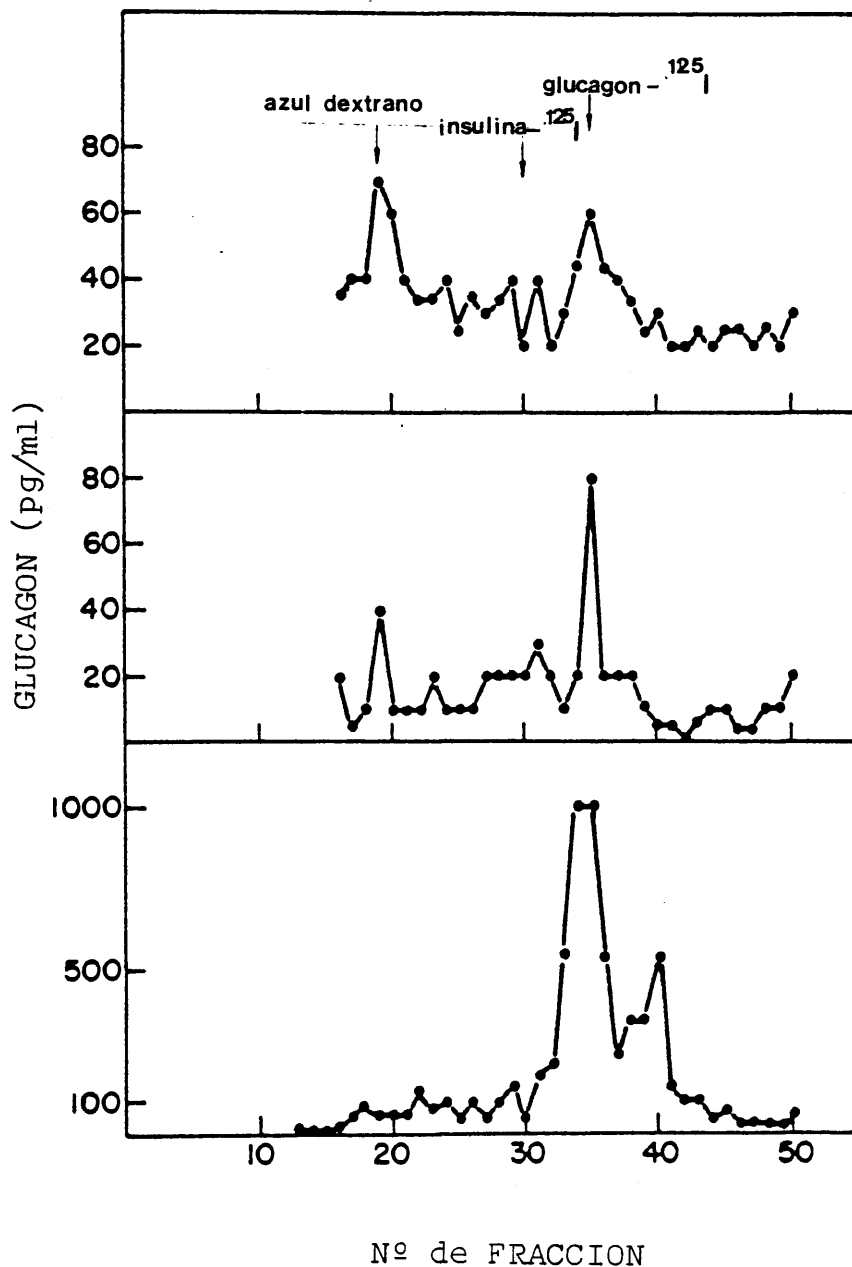


Figura 7.- PERFILES CROMATOGRÁFICOS DEL GLUCAGON INMUNOREACTIVO PRESENTE EN EXTRACTOS ACIDO - ALCOHÓLICOS DE GLANDULAS SUBMAXILARES HUMANAS.

Alícuotas de los extractos fueron aplicadas a columnas (1 x 60 cm) de Bio-Gel P-30 , equilibradas con tampón de glicocola 0,2 M, conteniendo BSA al 0,25 % y suero bovino al 1 %, pH 8,8. Se recogieron fracciones de 1 ml ; en alícuotas de ellas se determinó el contenido en glucagón con la ayuda del antisuero 30K.

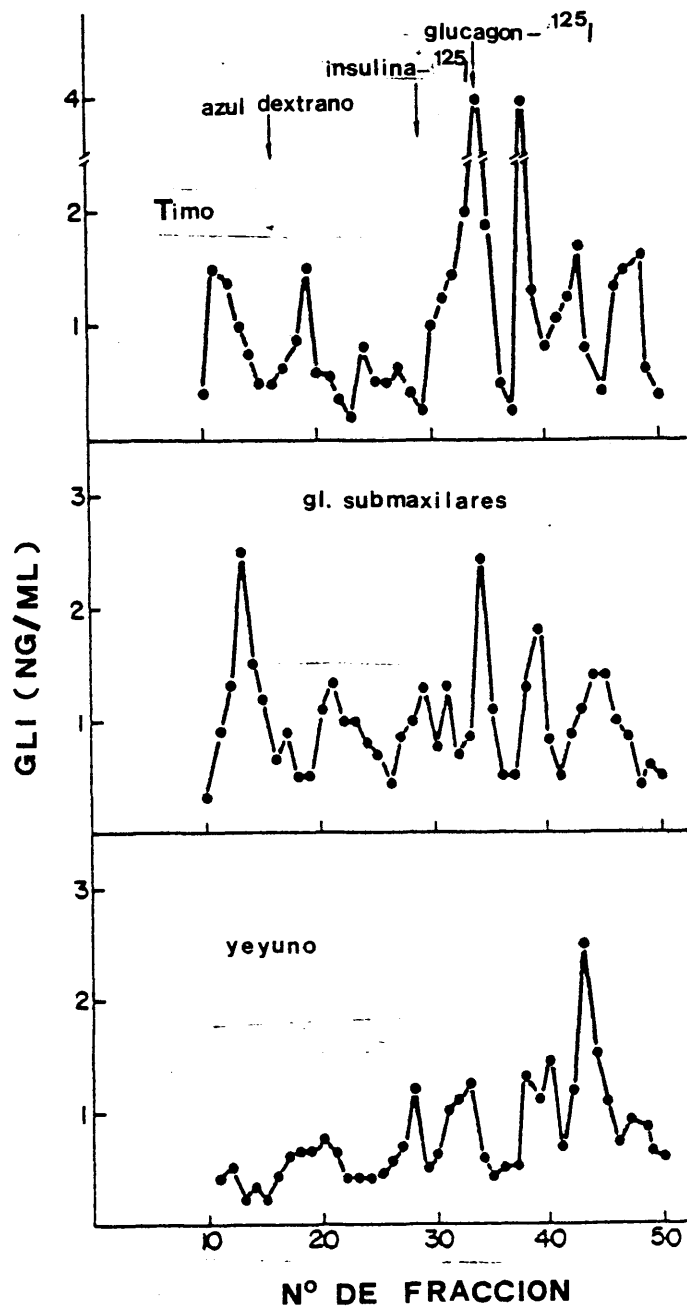


Figura 8.- PERFILES CROMATOGRÁFICOS DEL GLUCAGON INMUNOREACTIVO PRESENTE EN EXTRACTOS ACIDO - ALCOHÓLICOS DE YEYUNO, TIMO Y GLANDULAS SUBMAXILARES DE RATA.

Alícuotas de los extractos fueron aplicadas a columnas (1cmx60cm) de Bio-Gel P-30, equilibradas con tampón de glicocola - 0,2 M, conteniendo BSA al 0,25 % y suero bovino al 1 %, pH 8,8. Se recogieron fracciones de 1 ml ; en alícuotas de ellas se determinó - el contenido en GLI con la ayuda del antisuero AG - 10.

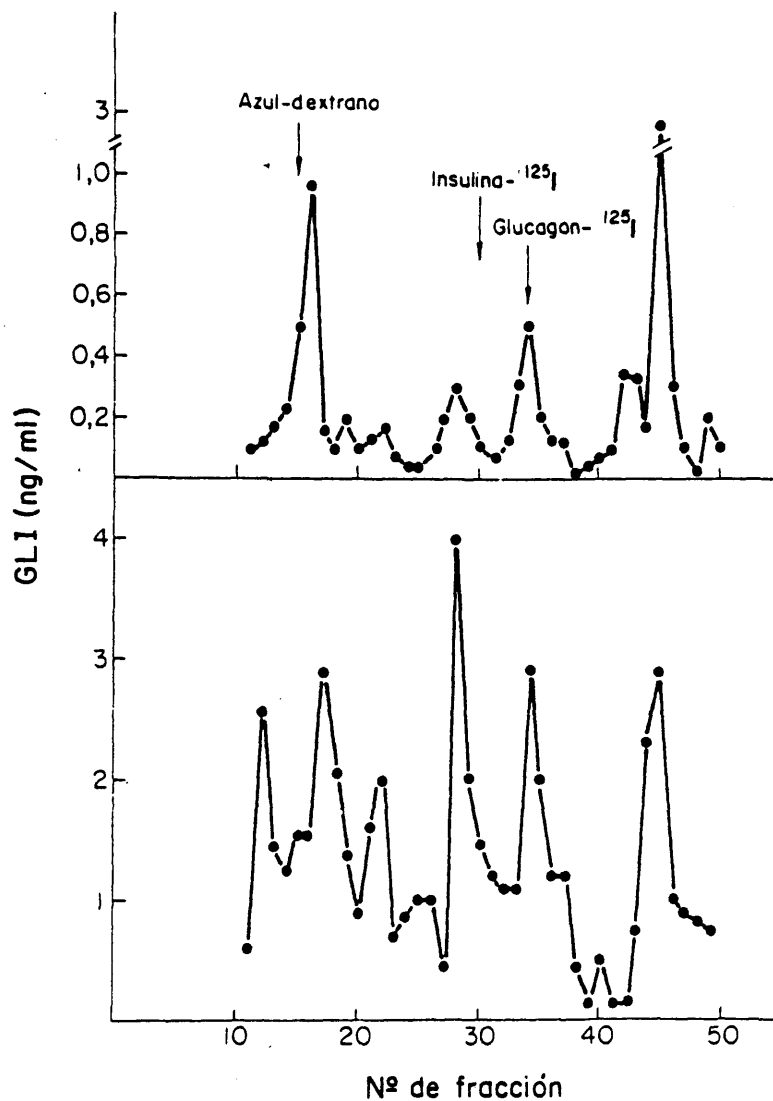


Figura 9.- PERFILES CROMATOGRAFICOS DEL GLUCAGON IMMUNOREACTIVO PRESENTE EN EXTRACTOS ACIDO - ALCOHOLICOS DE GLANDULAS SUBMAXILARES HUMANAS.

Alícuotas de los extractos fueron aplicadas a columnas (1 x 60 cm) de Bio-Gel P-30, equilibradas con tampón de glicocola 0,2 M, conteniendo BSA al 0,25 % y suero bovino al 1 %, pH 8,8. Se recogieron fracciones de 1 ml ; en alícuotas de ellas se determinó el contenido en GLI con la ayuda del antisuero AG -10.

antisuero AG - 10, eluyendo siempre uno de ellos en la zona de - 3500 dalton de peso molecular.

4.1.3.- Fraccionamiento cromatográfico de las formas inmunoreactivas de insulina

El perfil inmunoreactivo de los extractos ácido - alcohólicos de páncreas y timo de rata, cuando el anticuerpo utilizado - fue el 607/9, se muestra en la Fig 10.

En los extractos de páncreas se detectó un pico principal inmunoreactivo en la misma zona donde eluyó el marcador insulina - ¹²⁵I. Este pico, sin embargo, no se pudo encontrar cuando el extracto cromatografiado era el timo, observándose en este extracto pequeños picos adicionales antes y después del volumen de elución de la insulina.

4.2.- Movilidad electroforética

4.2.1.- Movilidad electroforética de las formas inmunoreactivas de glucagón

Una confirmación de las características comunes entre el glucagón cristalino y la hormona detectada en nuestros extractos, - se obtuvo por el análisis de la distribución de la inmunoreactividad en geles de poliacrilamida, después de la electroforesis, de - las proteínas presentes en dichos extractos.

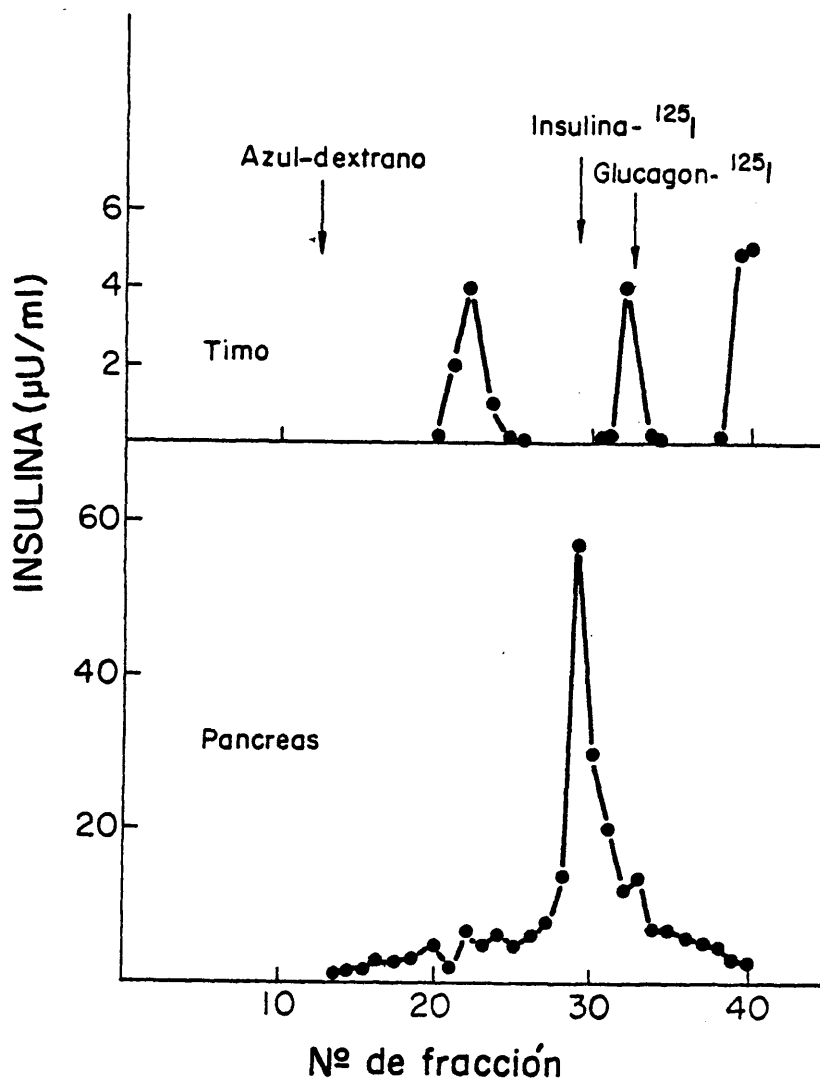


Figura 10.- PERFILES CROMATOGRAFICOS DE INSULINA INMUNOREACTIVA PRESENTE EN EXTRACTOS ACIDO - ALCOHOLICOS DE PANCREAS Y TIMO DE RATA.

Alícuotas de los extractos fueron aplicados a columnas (1 x 60 cm) de Bio-Gel P-30 equilibradas con tampón de glicocola 0,2 M, conteniendo BSA al 0,25 % y suero bovino al 1 %, pH 8,8. Se recogieron fracciones de 1 ml ; en alícuotas de ellas se determinó el contenido en insulina con ayuda del antisuero 607/9.

La distribución de la inmunoreactividad en los geles - (Fig 11), medida con el anticuerpo 30K, muestra una separación idéntica del glucagón cristalino y el material presente en los - extractos de glándulas submaxilares de rata con unas Rf de 0,8 y 2,6 . La migración electroforética del timo mostró una banda única con una Rf de 2,6. La banda menor (Rf : 2,6), se corresponde con la banda obtenida al teñir uno de los geles conteniendo glucagón cristalino con azul de coomassie.

Cuando la electroforesis se realizó con extractos de - glándulas submaxilares humanas (Fig 12), se observó, igualmente que el material presente en aquellos extractos migró en una banda (Rf : 3,2) idéntica a la que presentó el glucagón cristalino y otra banda anterior con una Rf de 1,4.

4.2.2.- Movilidad electroforética de las formas inmunoreactivas de GLI

La distribución de la inmunoreactividad para GLI, medida con el anticuerpo AG - 10, después de la electroforesis en geles de poliacrilamida, presenta una serie muy amplia de bandas, - observándose sin embargo que, tanto el extracto de timo como el de las glándulas submaxilares (Fig 13), contenían un material que migraba a una Rf idéntica (3,2) a la que presentaba el glucagón cristalino. En el caso del extracto de timo, se detectó una banda principal con una velocidad de migración mucho mayor (Rf : 5,2).

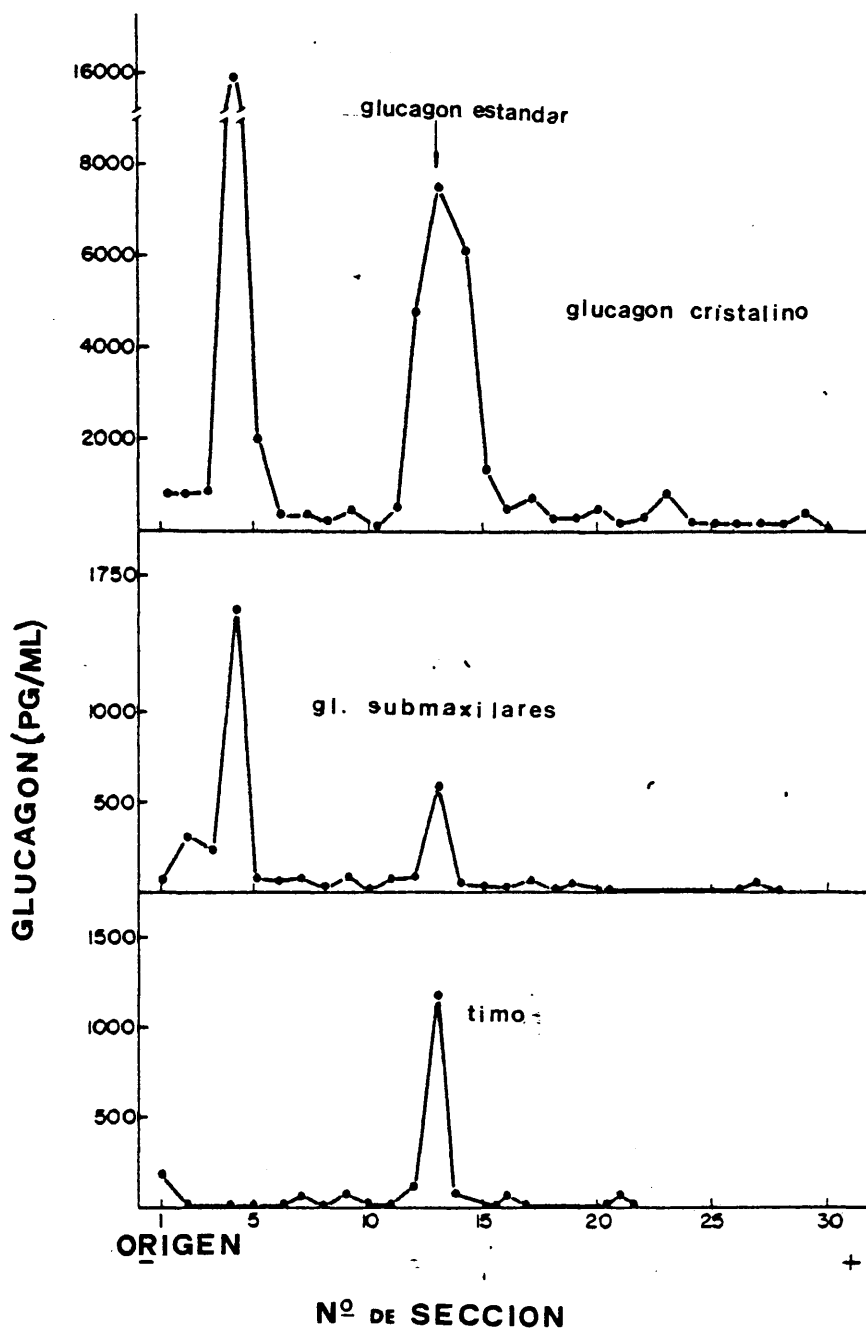


Figura 11.- ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE GLUCAGON PORCINO CRISTALINO Y DE ALICUOTAS DE EXTRACTOS ACIDO - ALCOHOLICOS DE TIMO Y GLANDULAS SUBMAXILARES DE RATA.

La electroforesis se llevó a cabo con geles de poliacrilamida al 7 %, conteniendo urea 4 M, a pH 8,7. Finalizada la electroforesis, los geles fueron cortados en secciones de 2 mm. Cada sección fue eluida con 0,2 ml de tampón de glicocola 0,2 M, conteniendo BSA al 0,25 % y suero bovino al 1 %, pH 8,8. En los eluidos se determinaron las concentraciones de glucagón con la ayuda del anticuerpo 30K.

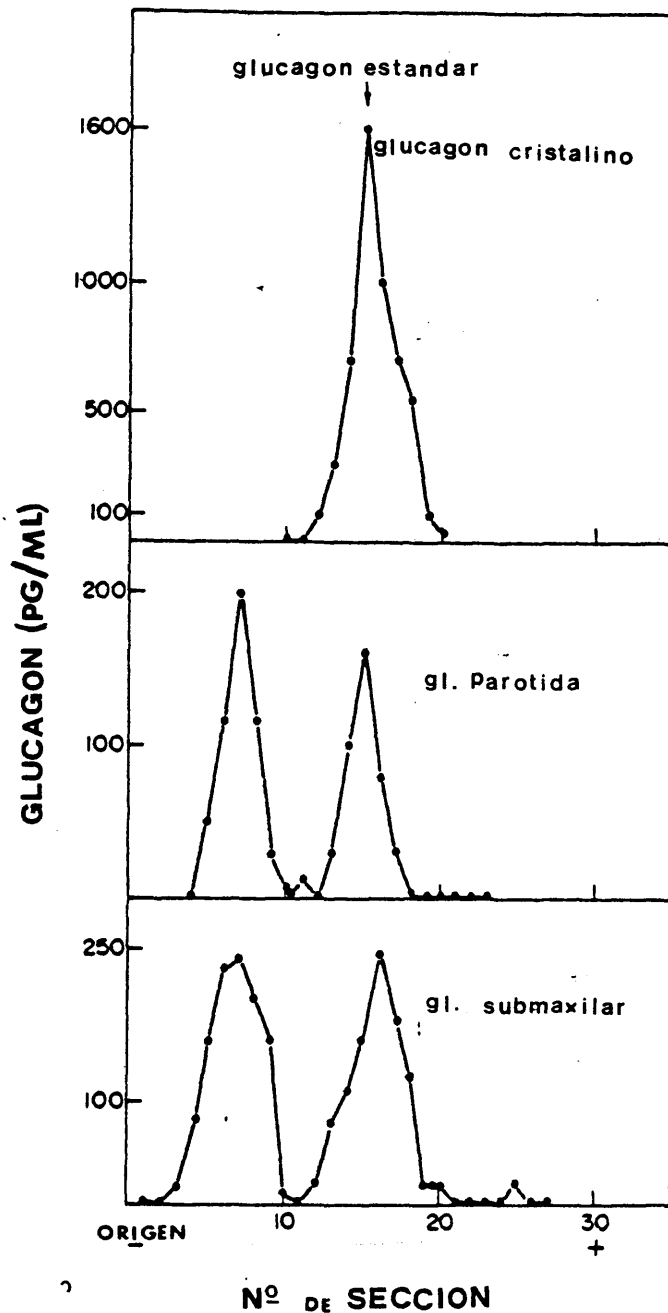


Figura 12.- ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE GLUCAGON PORCINO CRISTALINO Y DE ALICUOTAS DE EXTRACTOS ACIDO - ALCOHOLICOS DE GLANDULAS SUBMAXILARES Y PAROTIDAS HUMANAS.

La electroforesis se llevó a cabo con geles de poliacrilamida al 7 %, conteniendo urea 4 M, a pH 8,7. Finalizada la electroforesis los geles fueron cortados en secciones de 2 mm. Cada sección fue eluida con 0,2 ml de tampón de glicocola 0,2 M, conteniendo BSA al 0,25 % y suero bovino al 1%, pH 8,8. En los eluidos se determinaron las concentraciones de glucagón con la ayuda del anticuerpo 30K.

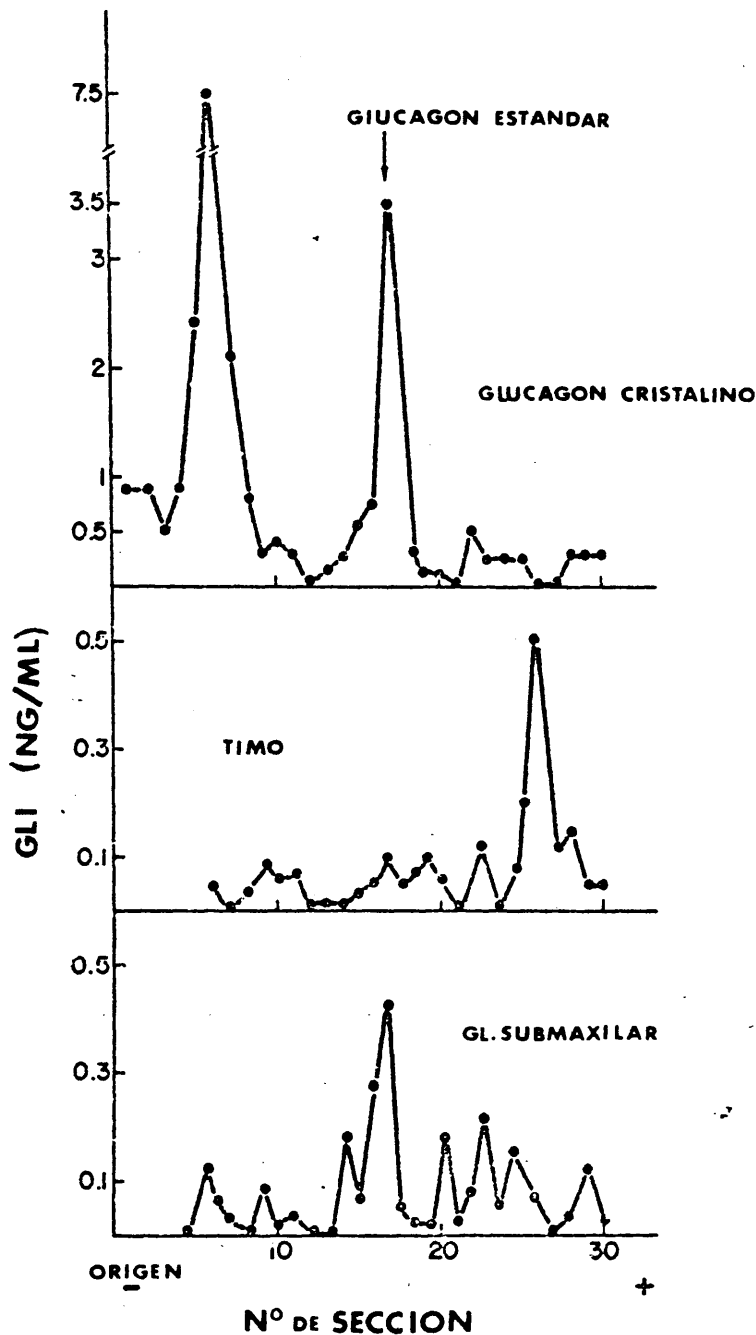


Figura 13.- ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE GLUCAGON PORCINO CRISTALINO Y DE ALICUOTAS DE EXTRACTOS ACIDO - ALCOHOLICOS DE TIMO Y GLANDULAS SUBMAXILARES DE RATA.

La electroforesis se llevó a cabo con geles de acrilamida al 7%, conteniendo urea 4 M, pH 8,7. Finalizada la electroforesis los geles fueron cortados en secciones de 2 mm. Cada sección fue eluida con tampón de glicocola 0,2 M, conteniendo BSA al 0,25 % y suero bovino al 1 %, pH 8,8. En los eluidos se determinaron las concentraciones de GLI con la ayuda del antisuero AG-10.

4.2.3.- Movilidad electroforética de las formas inmunoreactivas de insulina

En la Fig 14 se representa la distribución de la inmunoreactividad, medida con el antisuero 607/9, para insulina después de la electroforesis en gel de poliacrilamida de extractos ácido - alcohólicos de páncreas y timo de rata.

Con alícuotas de los extractos pancreáticos se obtuvo una banda principal que se localizó en una posición idéntica a la insulina estandar cristalina (Rf : 4,6), mientras que el material inmunoreactivo presente en el extracto de timo lo hizo en bandas de migración mucho menor, no pudiéndose detectar ninguna banda a una Rf de 4,6.

4.3.- Caracterización inmunológica : curvas de dilución

4.3.1.- Caracterización inmunológica de las formas inmunoreactivas de glucagón

Extractos de páncreas, tiroides, hipófisis y mucosa de estómago e ileon, fueron reconstituidos con tampón de glicocola - 0,2 M, conteniendo BSA al 0,5 % y suero bovino al 1 %, a un pH de 8,8, obteniéndose sucesivas diluciones con ellos y determinando su reactividad frente al anticuerpo 30K. Los valores obtenidos se representaron como el porcentaje de glucagón - ^{125}I unido al anticuerpo frente a la supuesta concentración de glucagón (pg/ml) basada en el ensayo del material no diluido.

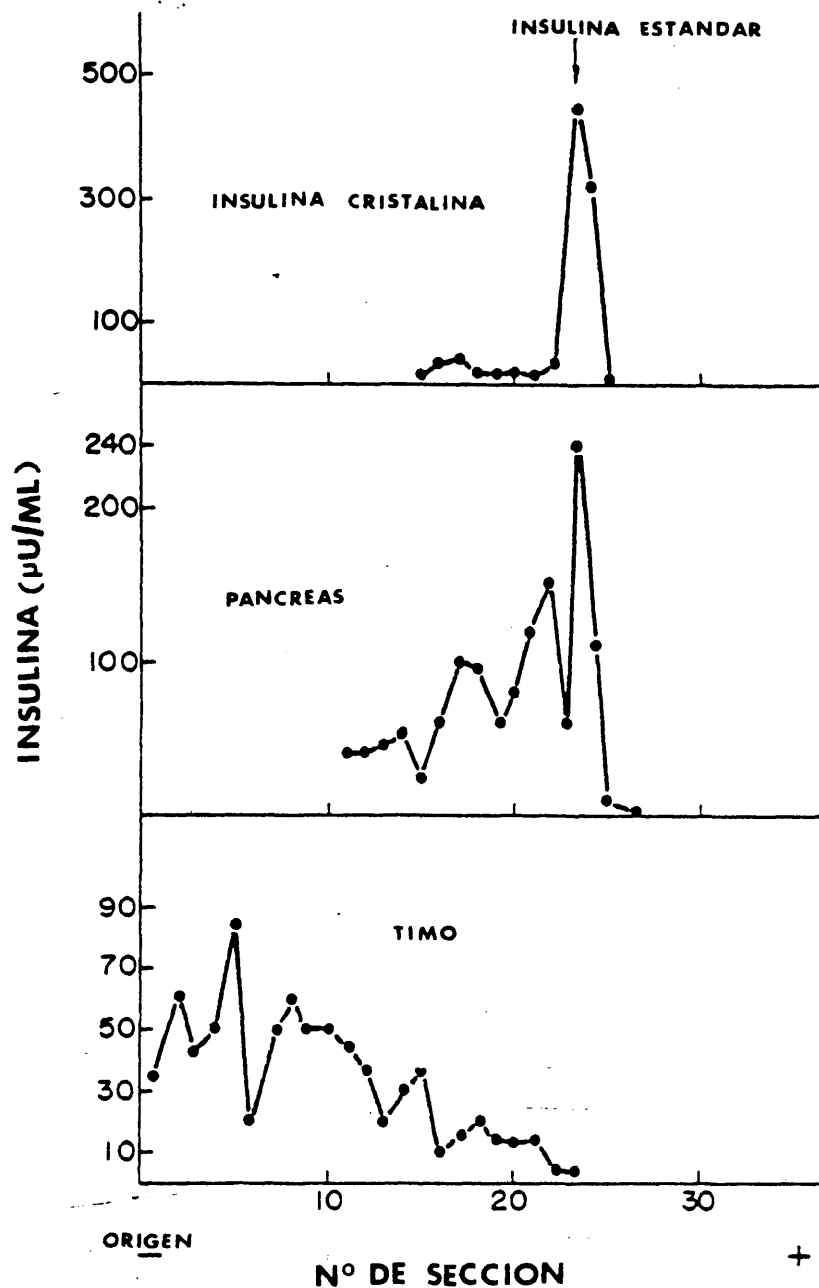


Figura 14.- ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE INSULINA DE RATA CRISTALINA Y DE ALICUOTAS DE EXTRACTOS ACIDO - ALCOHOLICOS DE PANCREAS Y TIMO DE RATA.

La electroforesis se llevó a cabo con geles de acrilamida al 7% conteniendo urea 4 M, a pH 8,7. Finalizada la electroforesis, los geles fueron cortados en secciones de 2 mm. Cada sección fue eluida con tampón de glicocola 0,2 M, conteniendo BSA al 0,25 % y suero bovino al 1%, pH 8,8. En los eluidos se determinaron las concentraciones de insulina con la ayuda del antisuero 607/9.

La Fig 15 muestra que la dilución de todos estos extractos provocó curvas idénticas, paralelas a la curva de dilución del glucagón cristalino estándar.

Las curvas obtenidas al ensayar diferentes diluciones de extractos ácido - alcohólicos de glándulas salivares humanas frente al anticuerpo 30K (Fig 16) fueron también paralelas a la curva de dilución del glucagón cristalino estándar.

4.3.2.- Caracterización inmunológica de las formas inmunoreactivas de insulina

Cuando el ensayo se realizó con el anticuerpo 607/9 y - con diferentes diluciones de los extractos ácido - alcohólicos de páncreas y timo de rata, se obtuvo (Fig 17) un desplazamiento idéntico del glucagón - ^{125}I al obtenido con insulina cristalina de rata, solamente en el caso del extracto de páncreas. En el caso del extracto de timo, este desplazamiento fue diferente.

5.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL GLUCAGON INMUNOREACTIVO PRESENTE EN EXTRACTOS PANCREATICOS Y EXTRAPANCREATICOS

5.1.- Grado de pureza de las membranas hepáticas de rata : actividad de la 5' nucleotidasa y unión del glucagón mono - ^{125}I a su receptor durante las distintas etapas del proceso de purificación

Con objeto de tener un índice del grado de pureza de las -

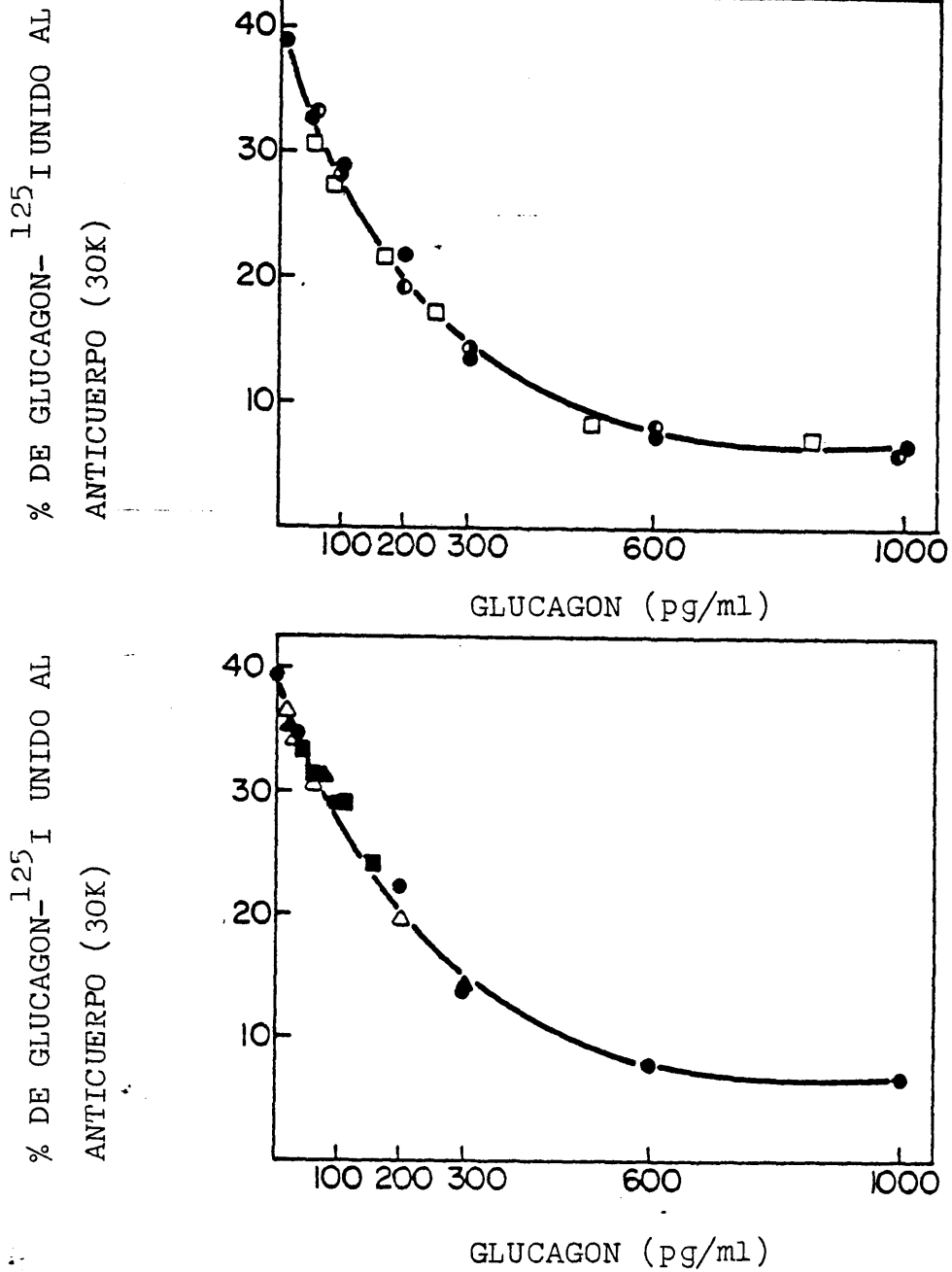


Figura 15.- INMUNOENSAYO DE GLUCAGON PORCINO CRISTALINO ALTAMENTE PURIFICADO Y ALICUOTAS DE EXTRACTOS ACIDO - ALCOHOLICOS DE ESTOMAGO, ILEON, TIROIDES, HIPOFISIS Y PANCREAS DE RATA.

Los ensayos se llevaron a cabo con el anticuerpo 30K.

Las concentraciones de glucagón fueron calculadas de las diluciones de los extractos.

- Glucagon cristalino
- Extracto de páncreas
- Extracto de íleon
- ▲-▲ Extracto de estómago
- ▲-▲ Extracto de tiroides
- Extracto de hipófisis.

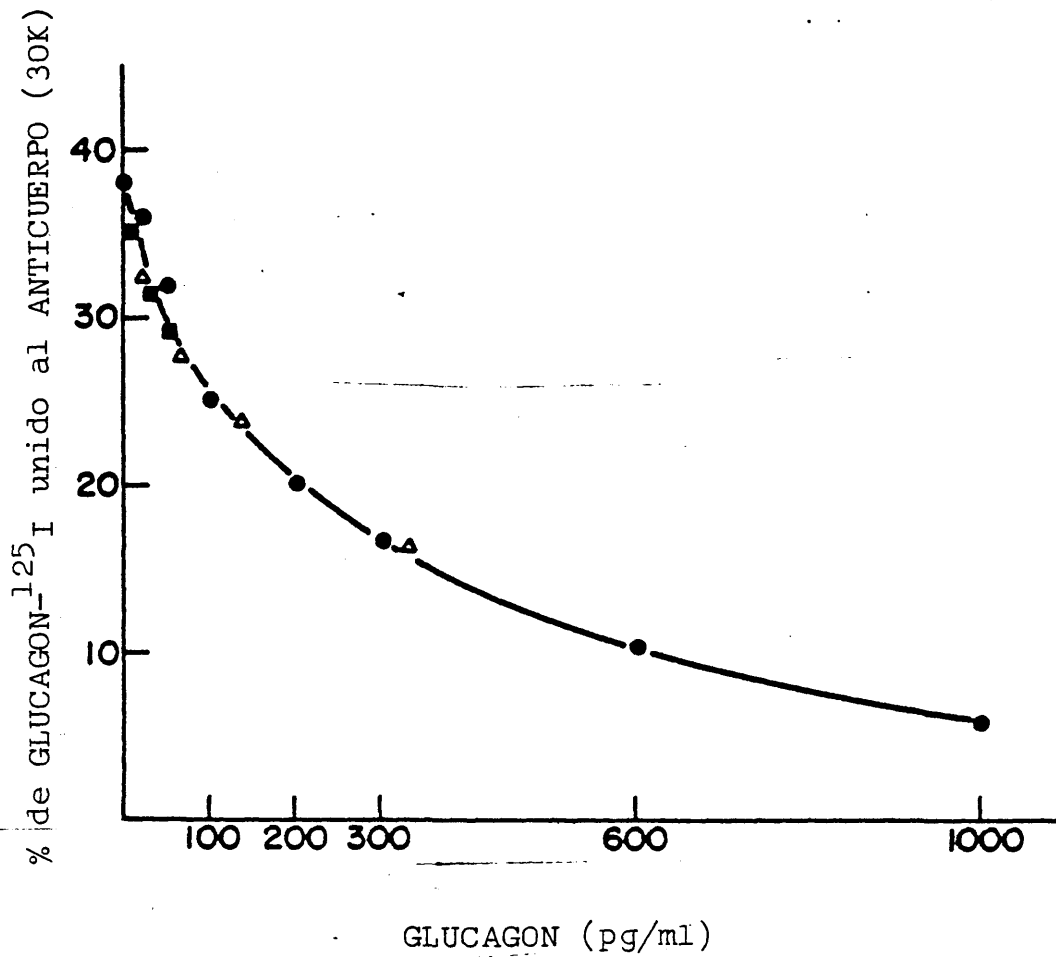


Figura 16.- INMUNOENSAYO DE GLUCAGON PORCINO CRISTALINO ALTAMENTE PURIFICADO Y DE ALICUOTAS DE EXTRACTOS ACIDO-ALCOHOLICOS DE GLANDULAS SUBMAXILARES Y PAROTIDAS HUMANAS.

Los ensayos se llevaron a cabo con el antisuero 30K. Las concentraciones de glucagón fueron calculadas de las diluciones de los extractos.

●-● Glucagon cristalino

■-■ Extracto de Gl. Parótida

▲-▲ Extracto de Gl. Submaxilar

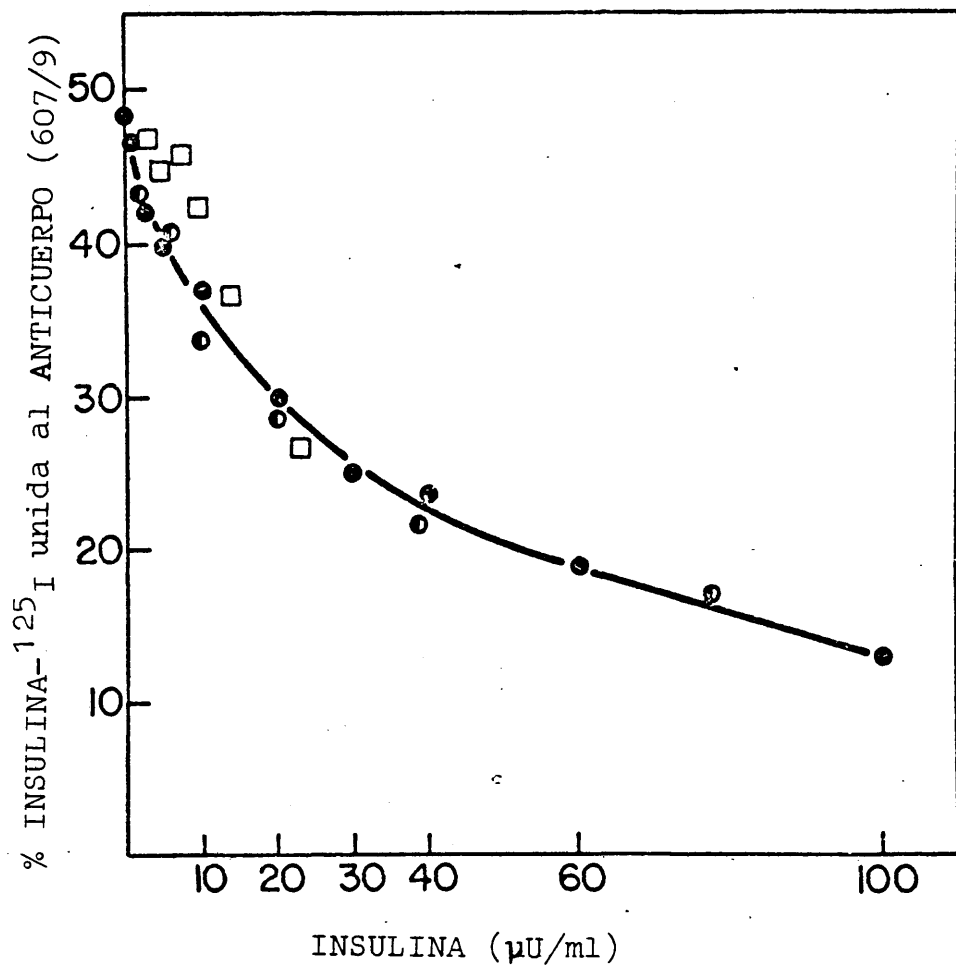


Figura 17.- INMUNOENSAYO DE INSULINA CRISTALINA DE RATA Y ALICUOTAS DE EXTRACTOS ACIDO - ALCOHOLICOS DE PANCREAS Y TIMO DE RATA.

Los ensayos se llevaron a cabo con el antisuero - 607/9; Las concentraciones de insulina fueron calculadas de las diluciones de los extractos.

● - ● Insulina cristalina

● - ● Extracto de páncreas

□ - □ Extracto de timo.



preparaciones de membranas plasmáticas, se midió en ellas la actividad de la 5' nucleotidasa y la unión de glucagón mono - ^{125}I comparándolos con los obtenidos en los distintos pasos del proceso de purificación.

La actividad de la 5' nucleotidasa (Tabla 7) aumentó - desde $1,5 \pm 0,3$ μmoles de 5'AMP hidrolizados/mg de proteína/hora en el homogenado hasta $14,2 \pm 1,8$ μmoles de 5'AMP hidrolizados/mg de - proteína/hora en las membranas hepáticas, poseyendo por tanto estas últimas una actividad específica de la enzima unas 7 veces mayor - que el homogenado y 5 veces mayor que la de la fracción - 1500xg.

En el caso de la unión del glucagón mono - ^{125}I a sus - receptores (Tabla 8), la fracción de membranas plasmáticas unió 31 veces más glucagón que el homogenado y unas 4 veces más que la fracción - 1500 x g.

5.2.- Desplazamiento del glucagón mono - ^{125}I , previamente unido a sus receptores hepáticos, por alícuotas de extractos pancreáticos y extrapancreáticos y glucagón pancreático - cristalino

Cuando alícuotas de extractos ácido - alcohólicos de - yeyuno, timo, páncreas, tiroides, glándulas suprarrenales y parótidas, fueron incubados " in vitro " con membranas plasmáticas hepáticas, provocaron una disminución de la unión de glucagón marcado al receptor, de una forma dependiente de la concentración - (Fig 18). Las curvas de desplazamiento fueron paralelas a las

TABLA 7

ACTIVIDAD DE LA 5'NUCLEOTIDASA Y CONCENTRACION DE PROTEINAS EN LOS DISTINTOS PASOS DEL PROCESO DE PURIFICACION DE LAS MEMBRANAS HEPATICAS DE RATA. MEDIA±ES. N=10.

Fracción	Proteinas (mg)	Actividad 5'nucleotidasa (µmoles 5'AMP hidrolizado/ mg proteina/hora)
Homogenado	2011±72	1,5±0,3
Precipitado 1500xg	240±23	3,9±0,5
Membranas parcial- mente purificadas	10,2±1	14,2±1,8

Las concentraciones de proteinas han sido expresadas en mg por 10 g de peso húmedo de hígado.

TABLA 8

UNION DE GLUCAGON-¹²⁵I A SUS RECEPTORES DURANTE LA PURIFICACION DE LAS
MEMBRANAS HEPATICAS DE RATA. MEDIA±ES. N=10.

Fracción	Glucagon unido (fmoles/mg proteína)
Homogenado	2,4±0,4
Precipitado- 1500xg	16,2±1,7
Membranas parcialmente purificadas	62,0±4,1

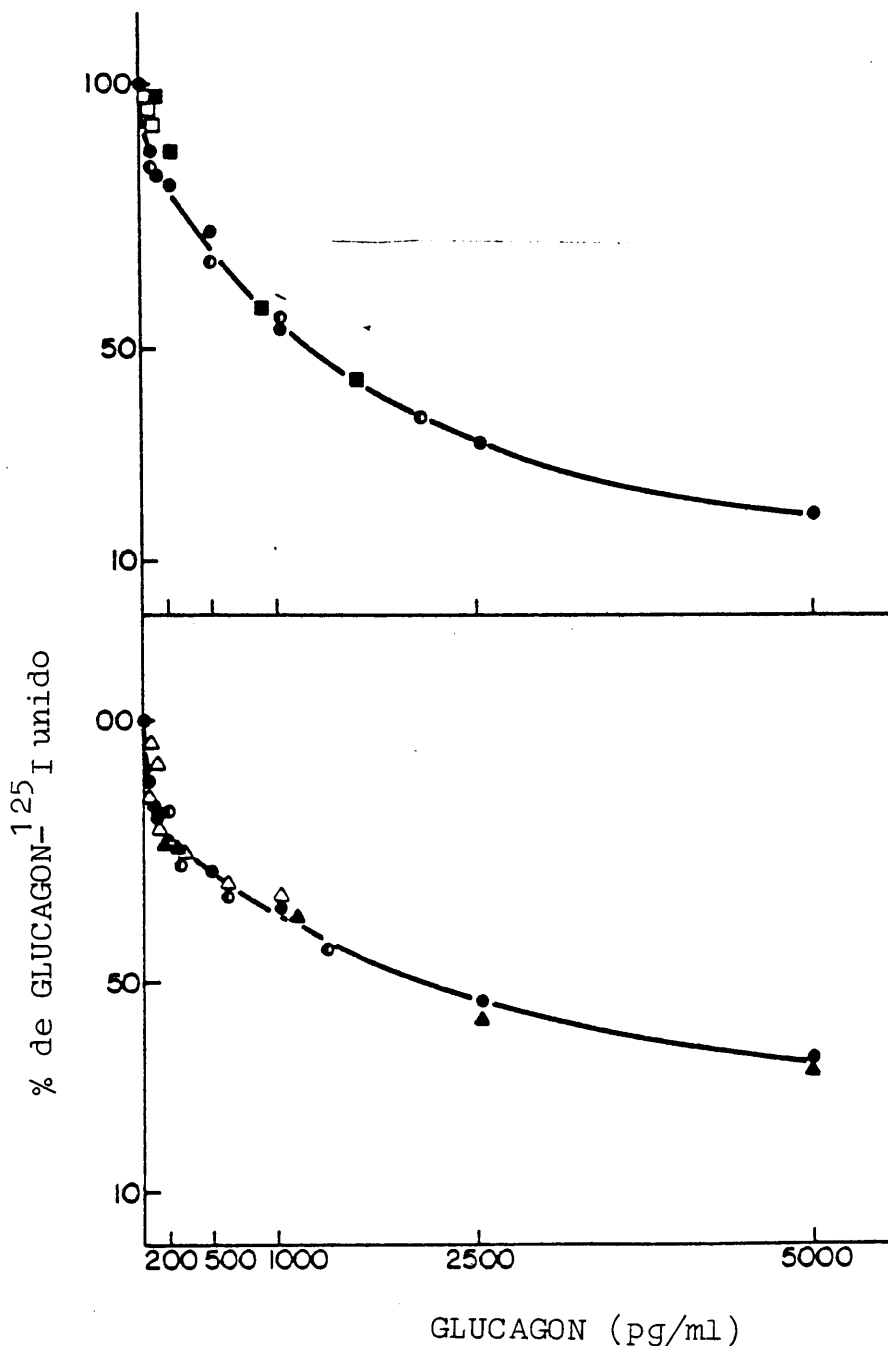


Figura 18.- CURVAS DE DESPLAZAMIENTO DEL GLUCAGON - ^{125}I DE MEMBRANAS PLASMATICAS HEPATICAS DE RATA POR GLUCAGON PORCINO CRISTALINO O EL GLUCAGON PRESENTE EN ALICUOTAS DE EXTRACTOS ACIDO - ALCOHOLICOS DE YEUONO, TIMO, TIROIDES, PANCREAS Y GLANDULAS SUPRARRENALES Y PAROTIDAS DE RATA.

La unión de glucagón - ^{125}I en ausencia de glucagón no marcado fue tomada como el 100%. La unión no específica fue menos del 5% de la unión total. ●-● Glucagón cristalino. ▲-▲ Extracto de yeyuno. ▲-▲ Extracto de timo. □-□ Extracto de tiroides. ○-○ Extracto de pancreas. ●-● Extracto de Gl. suprarrenales. ○-○ Extracto de Gl. parótidas

curvas del glucagón cristalino estandar.

Cantidades pequeñas de glucagón extrapancreático (alrededor de 50 pg/ml) fueron capaces de desplazar significativamente el glucagón mono - ^{125}I unido a su receptor.

Representando el cociente unido/libre de la hormona marcada frente a las concentraciones de glucagón cristalino, y glucagón pancreático o extrapancreático, de acuerdo con el análisis de Scatchard (Fig 19), se obtuvieron en todos los casos curvas idénticas, sugiriendo que la afinidad del receptor por las distintas muestras ensayadas fue la misma.

En la Fig 20 se muestra la curva de desplazamiento del glucagón mono - ^{125}I provocada por el glucagón presente en extractos ácido - alcohólicos de glándulas salivares humanas. Como en el caso de los extractos de tejido de rata, las curvas de inhibición fueron paralelas a la curva obtenida con glucagón cristalino.

Cuando a los distintos datos obtenidos se les sometió a un análisis de Scatchard (Fig 21), de nuevo , la afinidad del receptor por el glucagón de los extractos resultó ser idéntica a la del glucagón cristalino.

6.- BIOSINTESIS DE GLUCAGON EXTRAPANCREATICO

6.1.- Perfiles cromatográficos de proteínas marcadas con triptófano - ^3H

La Fig 22 muestra el perfil de elución de la radiactivi-

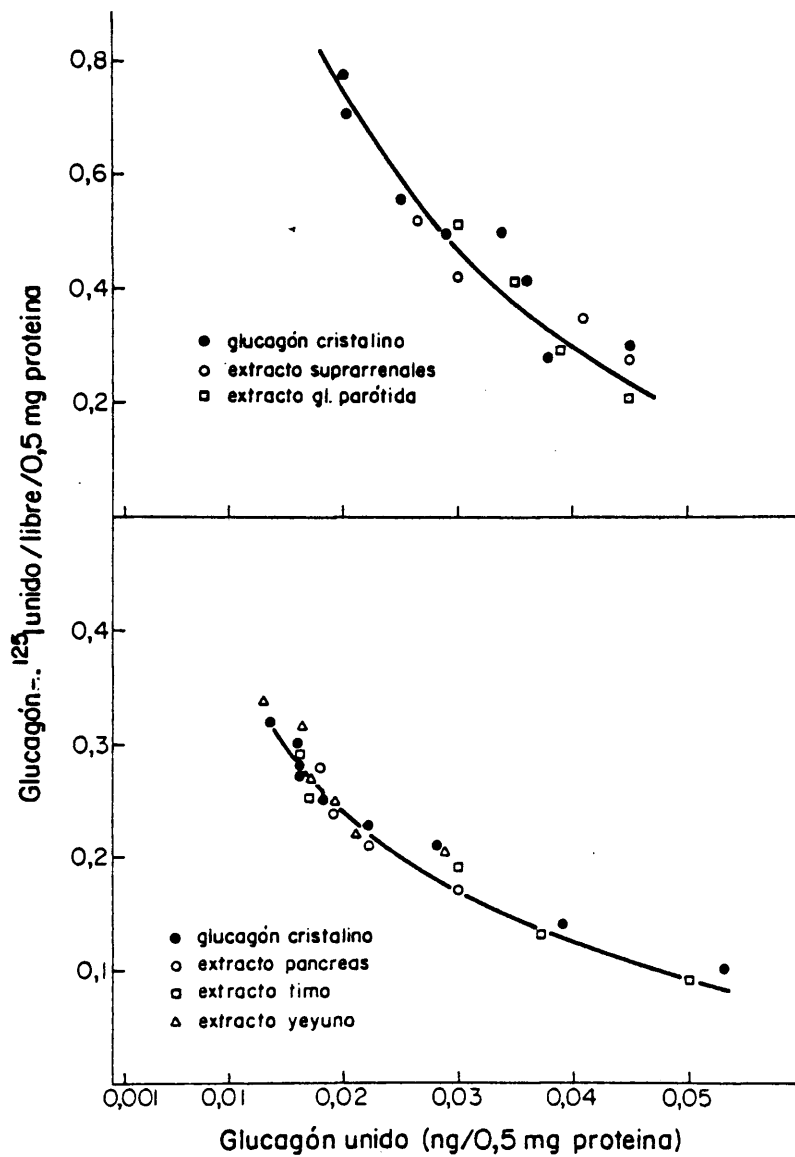


Figura 19.- ANALISIS DE SCATCHARD DE LA UNION DE GLUCAGON A MEMBRANAS PLASMATICAS HEPATICAS DE RATA.

Las membranas fueron incubadas con Krebs Ringer fosfato pH 7,5, conteniendo BSA al 1%, glucagón - ¹²⁵I ($0,6 \times 10^{-10}$ M) y en presencia de glucagón porcino cristalino no marcado (de 0,1 - 5 ng/ml) o de alícuotas de extractos ácido - alcohólicos de yeyuno, timo, páncreas y glándulas suprarrenales y parótidas de rata.

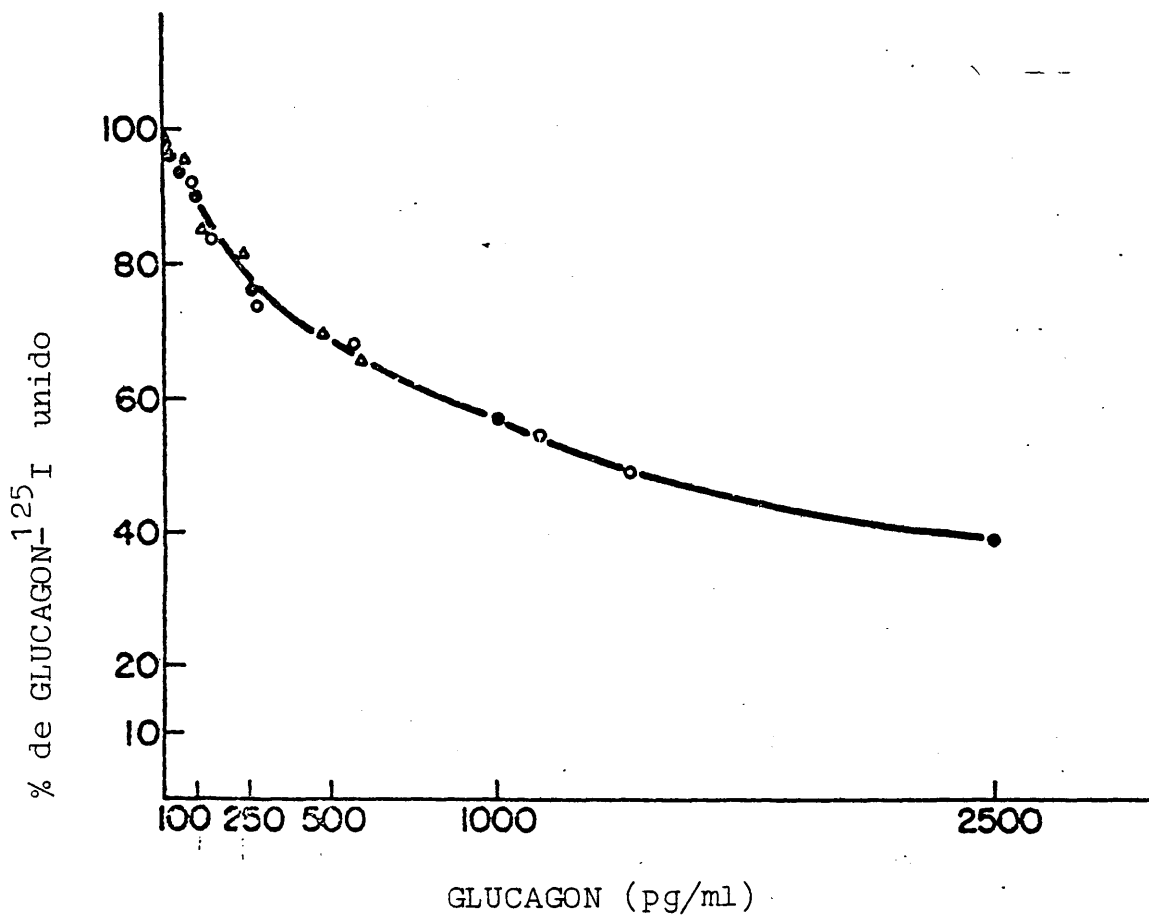


Figura 20.- CURVAS DE DESPLAZAMIENTO DEL GLUCAGON - ^{125}I DE MEMBRANAS PLASMATICAS HEPATICAS DE RATA POR GLUCAGON PORCINO CRISTALINO O EL GLUCAGON PRESENTE EN ALICUOTAS DE EXTRACTOS - ACIDO - ALCOHOLICOS DE GLANDULAS SUBMAXILARES Y PAROTIDAS HUMANAS.

La unión de glucagón - ^{125}I en ausencia de glucagón no marcado fue tomada como el 100 %. La unión no específica fue menos del 5 % de la unión total.

●-● Glucagón cristalino

Δ-Δ Extracto de Gl. parótidas

○-○ Extracto de Gl submaxilares

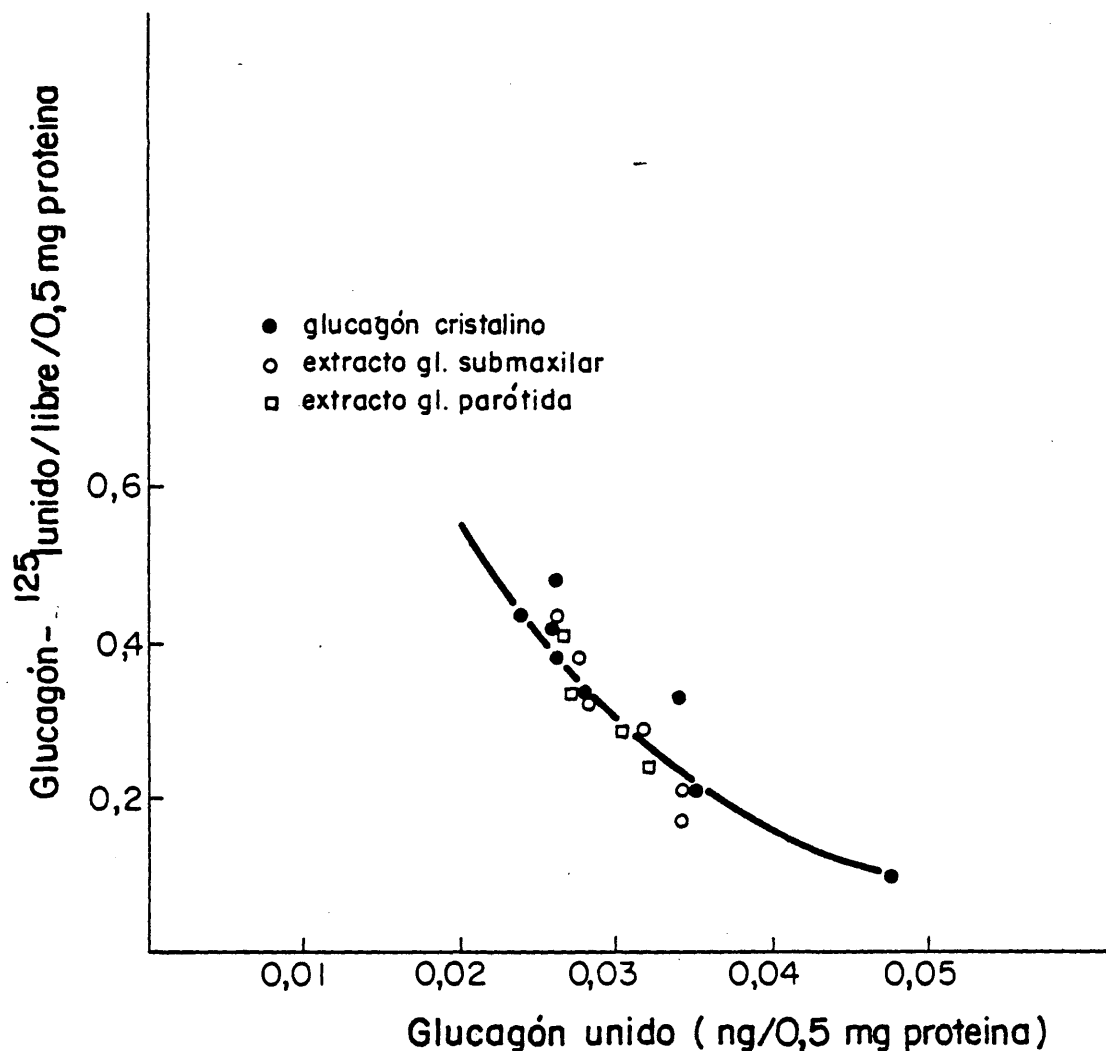


Figura 21.- ANALISIS DE SCATCHARD DE LA UNION DE GLUCAGON A MEMBRANAS PLASMATICAS HEPATICAS DE RATA.

Las membranas fueron incubadas con Krebs Ringer fosfato pH 7,5, conteniendo BSA al 1 %, glucagón - ^{125}I ($0,6 \times 10^{-10}\text{M}$) y en presencia de glucagón porcino cristalino no marcado (de 0,1 - 5 ng/ml) o de alícuotas de extractos ácido - alcohólicos de glándulas submaxilares y parótidas humanas.

dad de extractos ácido - alcohólicos de células aisladas de glándulas parótidas y trozos de tejido de tiroides y glándulas suprarrenales de rata incubados a 37°C con triptófano - ^3H durante 4 horas. Las columnas (1 cm x 60 cm) de Bio-Gel P-30 utilizadas, fueron eluidas con tampón de glicocola 0,2 M, conteniendo BSA al 0,5 % y suero bovino al 1 %, a un pH de 8,8.

Se obtuvieron dos fracciones principales:

- 1) Una situada inmediatamente después del volumen vacío de la columna, a la que hemos llamado " zona precursora " y
- 2) Otra comprendida en el lugar de elución del marcador glucagón mono - ^{125}I , a la que hemos denominado " zona del glucagón ".

En el caso del tiroides y de las glándulas suprarrenales, solo se pudo detectar inmunoreactividad en la segunda de las fracciones.

6.2. Combinación de proteínas marcadas con triptófano - ^3H con antisuero específico para glucagón pancreático (30K)

La identificación de los picos tritiados obtenidos por cromatografía, fue establecida por incubaciones de las distintas fracciones con anticuerpo 30K, pudiéndose localizar al menos dos componentes inmunoreactivos (Fig 22) claramente diferenciados, uno de ellos situado en la región precursora y otro, el más importante en el caso del tiroides y de las glándulas suprarrenales, - en la zona del glucagón. En todos los casos, el volumen de elución de este último pico coincidió exactamente con el volumen de elución del glucagón - ^{125}I utilizado como marcador.

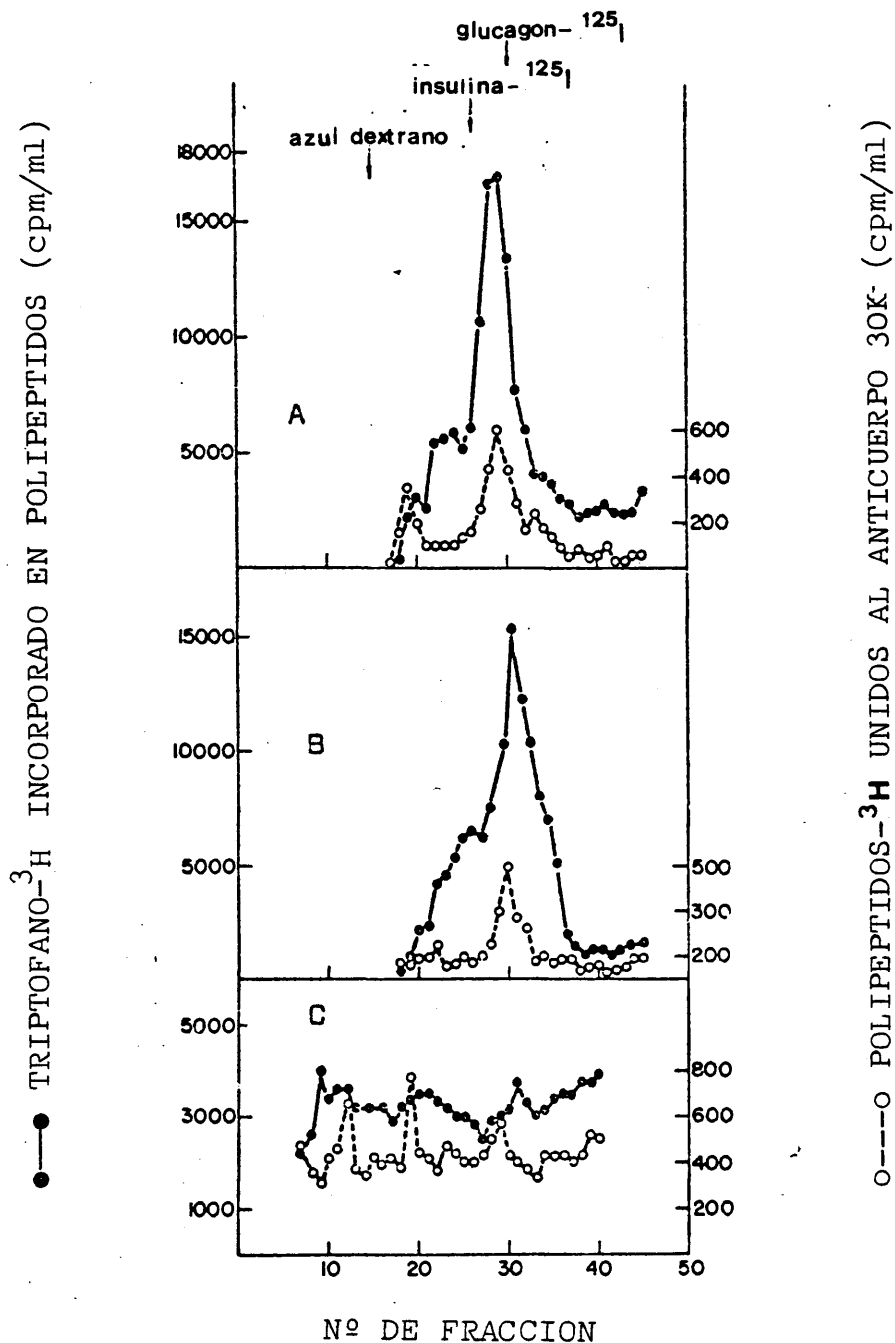


Figura 22.- PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE EXTRACTOS ACIDO - ALCOHÓLICOS DE TROZOS DE TEJIDO DE TIROIDES Y GL.SUPRARRENALES Y CELULAS AISLADAS DE GL.PAROTIDAS DE RATA INCUBADAS CON TRIPTOFANO - ³H.

Las incubaciones se realizaron a 37°C durante 4 horas en presencia de triptófano - ³H (6 Ci/mmol ; 1 mCi/ml). Alícuotas de los eluidos fueron ensayadas para glucagón con la ayuda del antisuero 30K. Panel A : Tiroides. Panel B : Gl suprarrenales. Panel C : Gl.parótidas.

En las Figs 23 y 24, se muestran los resultados del análisis de la incorporación de triptófano - ^3H en glucagón y otros péptidos relacionados con él, después de incubaciones a 1 , 2 , 4 y 6 horas a 37°C.

En incubaciones de corta duración, la mayoría de la inmunoreactividad apareció en la zona precursora (picos I y II) ; el máximo de incorporación de triptófano - ^3H en el pico II se obtuvo a las 2 horas de incubación, desapareciendo prácticamente después de 4 horas. El pico I estuvo presente en todos los tiempos estudiados, alcanzando sin embargo un máximo de inmunoreactividad a las 4 horas de incubación.

Por el contrario, la inmunoreactividad atribuible a los péptidos de tamaño igual al glucagón, es muy pequeña en tiempos cortos mostrando un rápido incremento a las 4 horas de incubación.

6.3.- Transferencia " in vitro " de la inmunoreactividad de la zona precursora a la región del glucagón

Si el material de mayor peso molecular representa a los precursores del glucagón, la incubación de las células extrapancreáticas con un inhibidor de la síntesis de proteínas, cuando aquellos se han formado, provocaría una disminución en la inmunoreactividad presente en la región precursora y un continuo aumento de ella en la zona del glucagón. Esto se consiguió por la adición al medio de cicloheximida (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) después de 2 horas de incubación de las células. El mismo efecto se obtuvo cuando las -

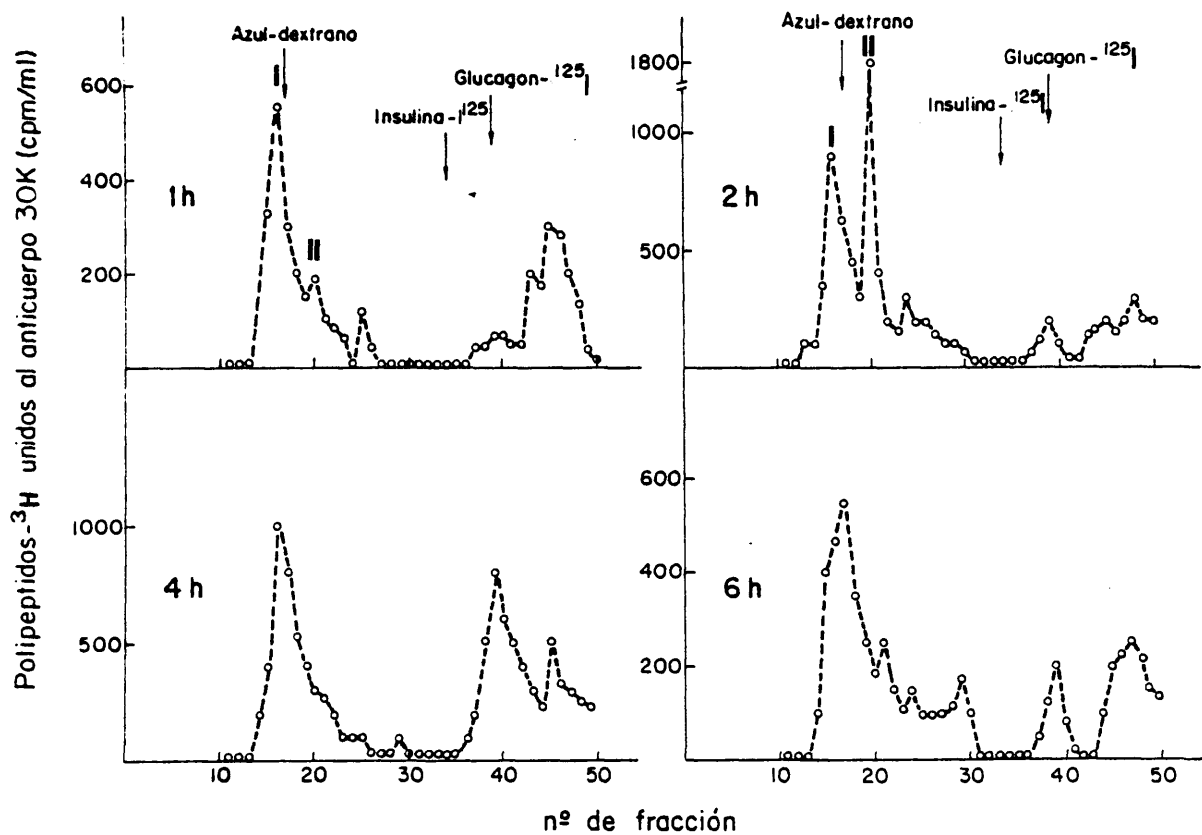


Figura 23.- PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE EXTRACTOS ÁCIDO - ALCOHÓLICOS DE CELULAS AISLADAS DE GLANDULAS SUBMAXILARES DE RATA INCUBADAS EN PRESENCIA DE TRIPTOFANO - ^3H .

Las incubaciones se realizaron a 37°C durante 1, 2, 4 y 6 horas en presencia de triptófano - ^3H (6 Ci/mmol ; 1 mCi/ml). - Alícuotas de los eluidos fueron ensayadas para glucagón con la ayuda del antisuero 3OK.

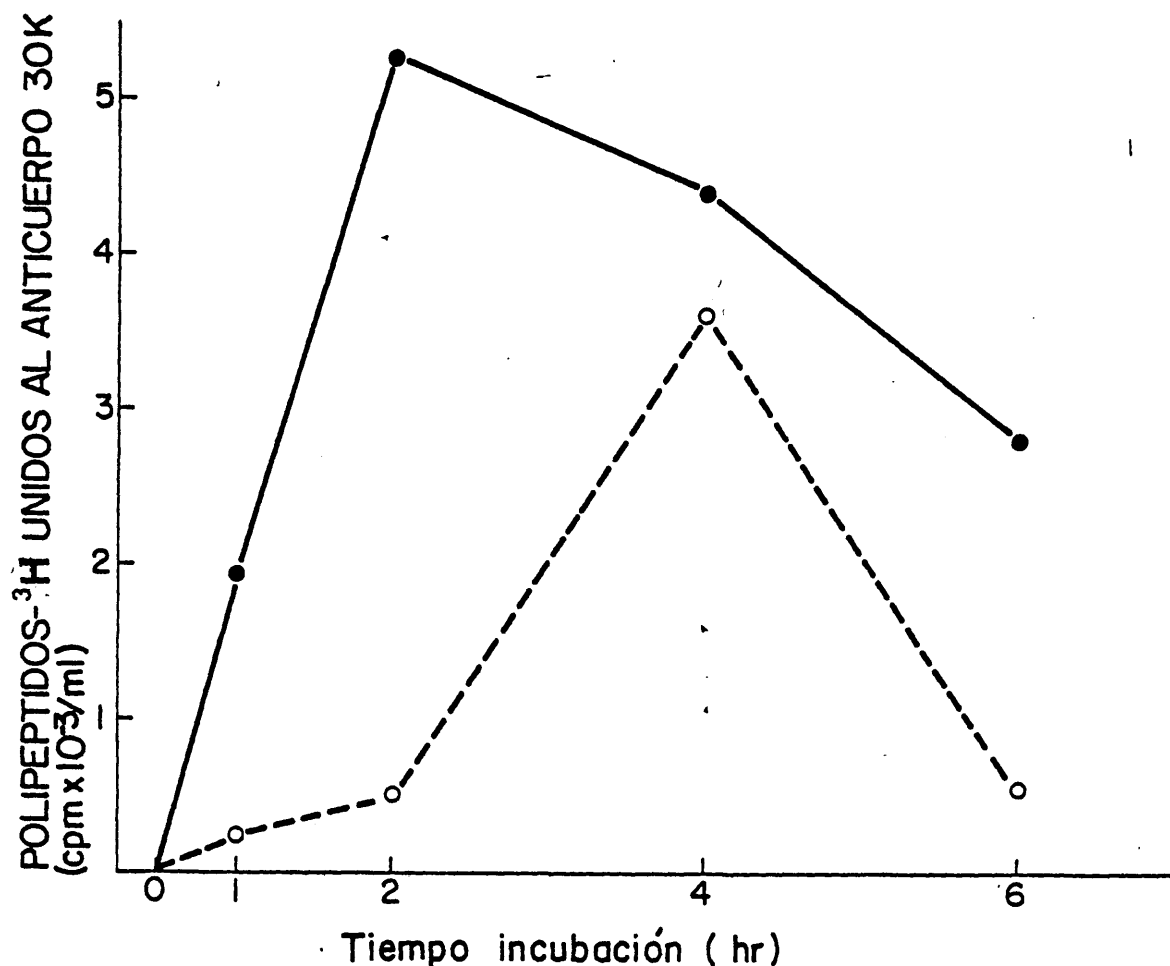


Figura 24.- NIVELES DE INMUNOREACTIVIDAD DEL PICO DE MAYOR PESO MOLECULAR Y DEL PICO DE 3500 DALTONS DESPUES DE INCUBACIONES DE CELULAS AISLADAS DE GLANDULAS SUBMAXILARES DE RATA CON TRIPTOFANO ^{-3}H .

Las células fueron incubadas a 37°C durante 1, 2, 4 y 6 horas en presencia de triptófano ^{-3}H (6 Ci/mmol ; 1 mCi/ml). Los picos fueron separados por filtración en columnas (1 x 60 cm) de Bio-Gel P-30 eluidas con tampón de glicocola 0,2 M, conteniendo BSA al 0,25 % y suero bovino al 1 %, pH 8,8. Los niveles de glucagón se midieron con ayuda del antisuero 30K.

●-● Pico de alto peso molecular

○-○ Pico de 3500 daltons

células, previamente incubadas, fueron lavadas e incubadas de nuevo, en medio nuevo conteniendo triptófano no radiactivo, durante - otras dos horas.

Efectivamente, cuando después de un período de preincubación las células fueron post - incubadas con cicloheximida (Fig- 25), la incorporación de radiactividad en la posible molécula - precursora fue marcadamente inhibida, mientras que se produjo un - aumento de la inmunoreactividad presente en la región del glucagón.

La Fig 26 muestra la distribución de la inmunoreactividad en los picos precursores y en la zona del glucagón después de una post - incubación de las células con nuevo tampón conteniendo triptófano no marcado. Igual que en el caso anterior, los resultados muestran una disminución apreciable de inmunoreactividad en - la molécula de mayor peso molecular acompañada de una transferencia de ella a la molécula de glucagón.

En la Tabla 9 se presenta el cociente : cpm zona del glucagón/cpm totales (zona precursora + zona del glucagón), en las - condiciones expuestas anteriormente. Este cociente aumentó desde - unos valores de 0,12 después de dos horas de preincubación a 0,84 y 0,72 después de una post - incubación con cicloheximida o con - triptófano no marcado.

6.4.- Transformación del precursor del glucagón de mayor peso - molecular después del tratamiento con tripsina

Si existiese una relación precursor - producto en las - moléculas inmunoreactivas detectadas con el anticuerpo 30K, una -

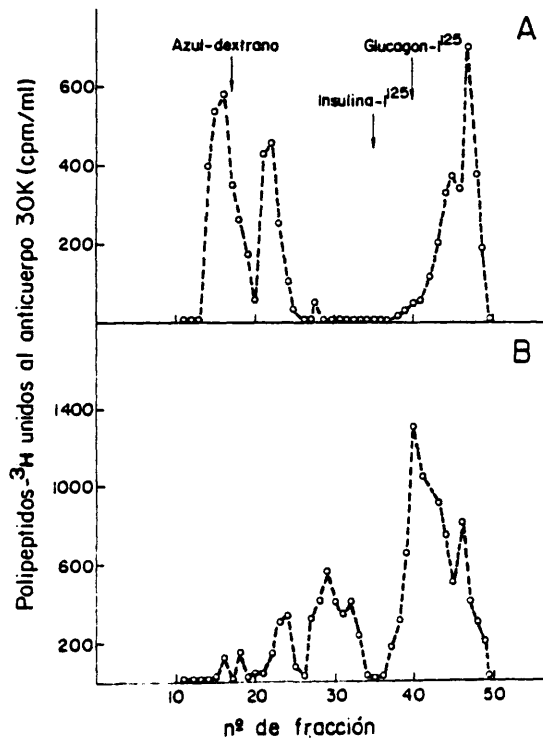
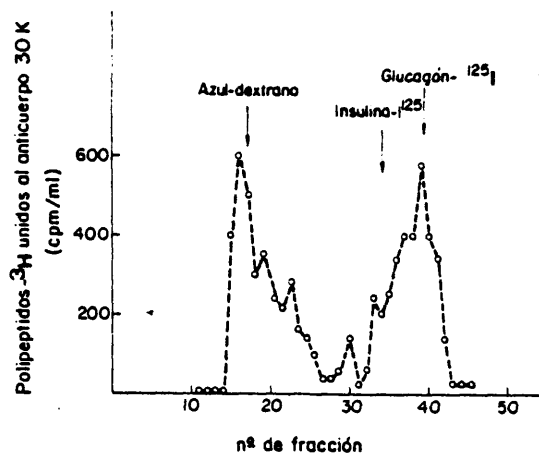


Figura 25.- PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE EXTRACTOS ACIDO - ALCOHÓLICOS DE CELULAS AISLADAS DE GLANDULAS SUBMAXILARES DE RATA INCUBADAS EN PRESENCIA DE TRIPTÓFANO $-^3\text{H}$.

Las células fueron incubadas a 37°C en presencia de triptófano $-^3\text{H}$ (6 Ci/mmol ; 1 mCi/ml). Alícuotas de los eluidos fueron ensayadas para glucagón con la ayuda del antisuero 30K.
 Panel A : tiempo de incubación 2 horas. Panel B : incubación 2 horas con cicloheximida (100 $\mu\text{g/ml}$). Panel superior : tiempo de incubación: 4 horas.

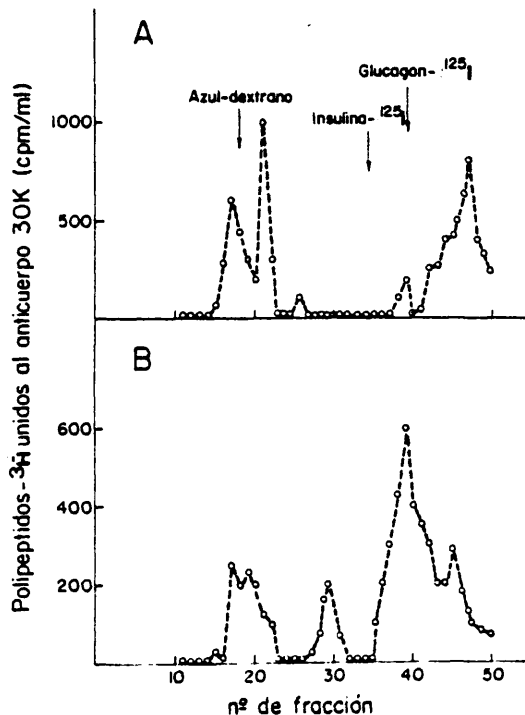
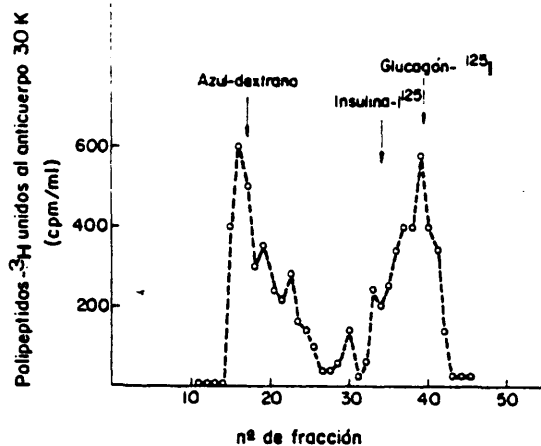


Figura 26.- PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE EXTRACTOS ACIDO - ALCOHÓLICOS DE CELULAS AISLADAS DE GLANDULAS SUBMAXILARES DE RATA INCUBADAS EN PRESENCIA DE TRIPTÓFANO $-^3\text{H}$.

Las células fueron incubadas a 37°C en presencia de triptófano $-^3\text{H}$ (6 Ci/mmol ; 1 mCi/ml). Alícuotas de los eluidos - fueron ensayadas para glucagón con la ayuda del antisuero 30K.

Panel A : tiempo de incubación: 2 horas. Panel B : 2 horas de incubación en ausencia de triptófano- ^3H y con 1 mg/ml de triptófano no marcado. Panel superior : tiempo de incubación 4 horas.

TABLA 9

INCORPORACION IN VITRO DE TRIPTOFANO-³H EN LAS ZONAS PRECURSORA Y DE GLUCAGON DESPUES DE LA INCUBACION DE CELULAS AISLADAS DE GLANDULAS SUBMAXILARES DE RATA.

Condiciones de incubación	Cpm/10 ⁵ células		Cociente cpm zona gluc./cpm totales
	Zona precursora	Zona glucagon	
2 hs.	3360	450	0,12
2h+2h cicloheximida	1050	5520	0,84
2h+2h triptófano no radiactivo(1mg/ml)	1110	2880	0,72
4 hs	3280	3040	0,48

tripsinización del precursor podría conducir a una liberación de glucagón. Esto podría ser detectado por la aparición de inmunoreactividad en la zona de 3500 dalton de peso molecular al aislar el pico precursor y someterlo a un tratamiento con tripsina.

La Fig 27 muestra los resultados obtenidos con este tipo de experiencias. En ella se puede observar una caída en la inmunoreactividad de la molécula de mayor peso molecular y la aparición de un pico en la zona de elución del glucagón, poseyendo una inmunoreactividad tres veces mayor que la originalmente detectada en el pico precursor.

6.5.- Biosíntesis de glucagón por las glándulas salivares humanas

Cuando células aisladas de glándulas salivares humanas fueron incubadas " in vitro " a 37°C en presencia de triptófano - ^3H y sus extractos sometidos a cromatografía en columnas (1 cm x 60 cm) de Bio-Gel P-30, se observó una incorporación del triptófano - ^3H en varios péptidos (Fig 28). Al incubar alícuotas de los eluidos de la columna con el antisuero 30K, se detectaron varios picos inmunoreactivos uno de los cuales eluyó siempre en la zona de 3500 dalton de peso molecular (Fig 28).

Igual que en el caso de las glándulas salivares de rata, aparecen también unas moléculas con inmunoreactividad para el glucagón pero de un peso molecular muy superior al de esta hormona, sugiriendo por tanto la existencia de materiales precursores del glucagón en las glándulas salivares de humanos.

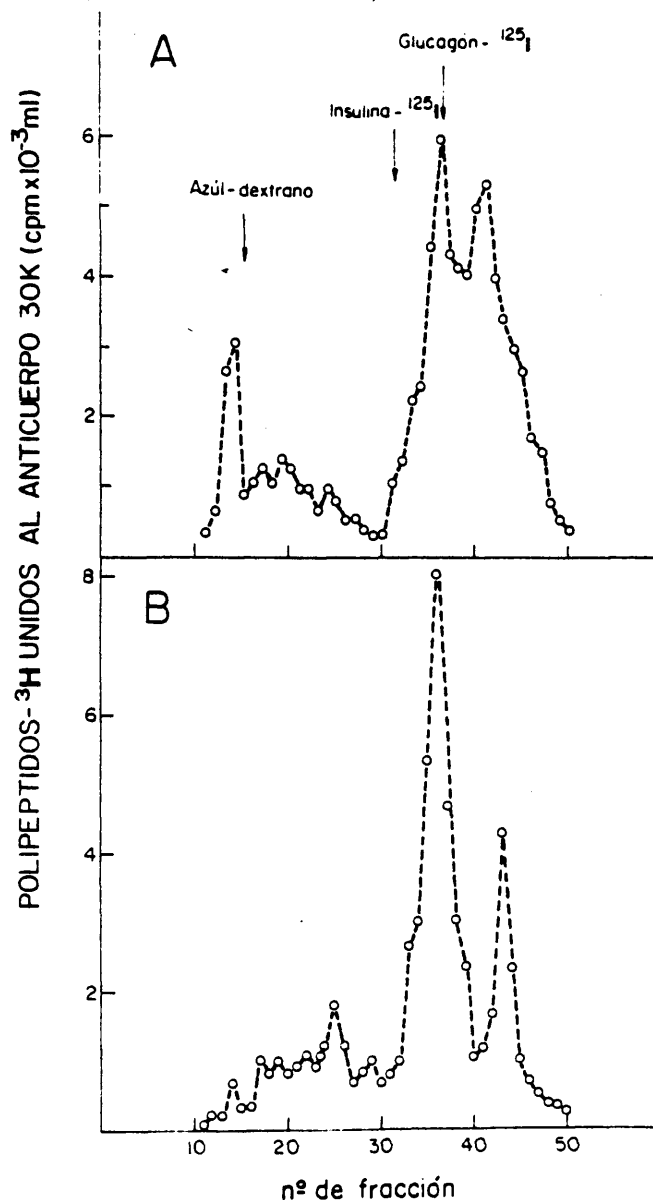


Figura 27.- PERFILES CROMATOGRAFICOS DE EXTRACTOS ACIDO - ALCOHOLICOS DE CELULAS AISLADAS DE GLANDULAS SUBMAXILARES DE RATA INCUBADAS EN PRESENCIA DE TRIPTOFANO -³H .

Las células fueron incubadas a 37°C en presencia de triptófano -³H (6 Ci/mmol ; 1 mCi/ml). Alícuotas de los eluidos fueron ensayadas para glucagón con la ayuda del antisuero 30K.

Panel A : 4 horas de incubación. Panel B: 4 horas de incubación seguido por un tratamiento con tripsina (1 µg/ml) del pico de mayor peso molecular, a 37°C durante 20 minutos. El tripsinizado resultante fue filtrado en columnas de Bio-Gel P-30 eluidas con tampón de glicocola 0,2 M, conteniendo BSA al 0,25 % y suero bovino al 1%, pH 8,8.

●—● TRIPTOFANO-³H INCORPORADO EN POLIPEPTIDOS (cpm/ml)

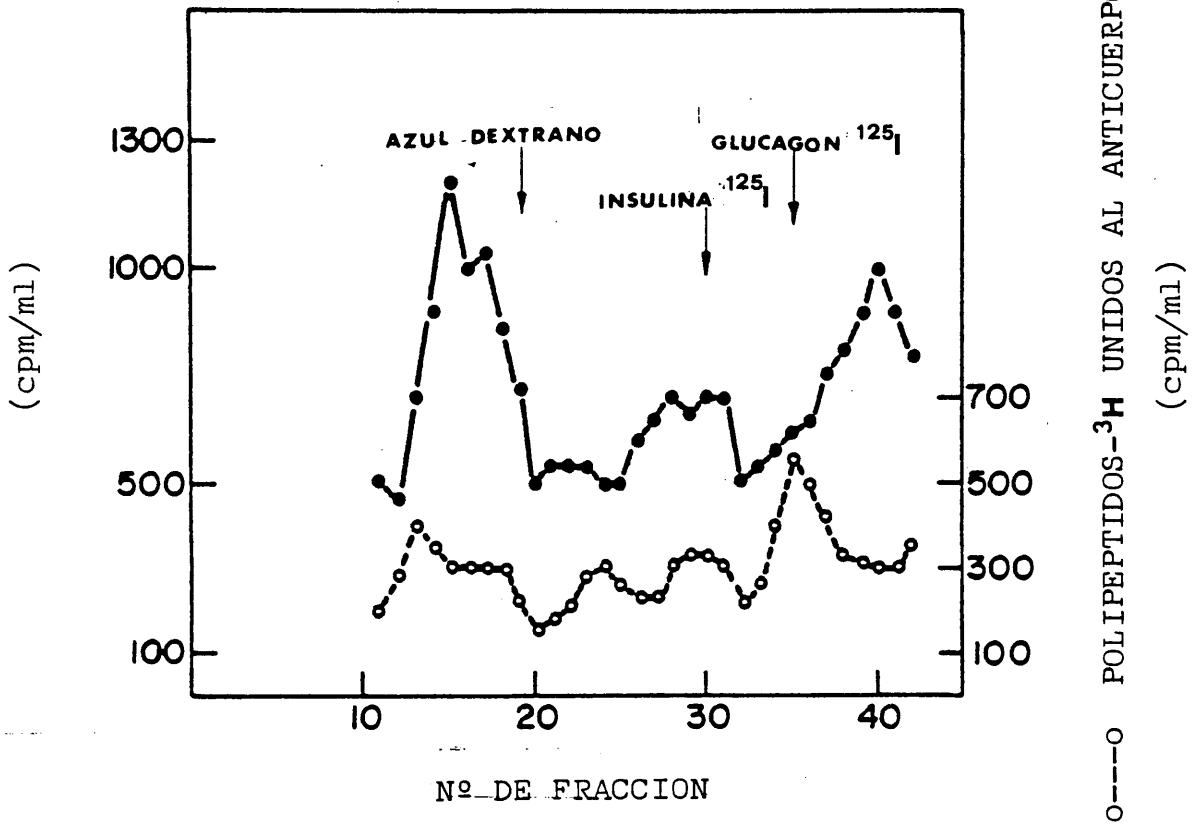


Figura 28.- PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE EXTRACTOS ACIDO - ALCOHOLICOS DE CELULAS AISLADAS DE GLANDULAS SUBMAXILARES HUMANAS INCUBADAS EN PRESENCIA DE TRIPTOFANO - ³H.

Las células fueron incubadas a 37°C en presencia de triptófano - ³H (6 Ci/mmol ; 1 mCi/ml) durante 4 horas. Alícuotas de los eluidos fueron ensayadas para glucagón con la ayuda del anti-suero 30K.

7.- FACTORES QUE MODULAN LA SECRECIÓN DE GLUCAGÓN EXTRAPANCREÁTICO

7.1.- Estudios " in vivo "

7.1.1.- Secreción de glucagón pancreático y extrapancreático en condiciones basales y tras la sobrecarga intravenosa de arginina en perros normales

Los resultados de los estudios de la secreción de glucagón en perros controles se presentan en la Fig 29.

Las concentraciones de glucagón en la vena cava aumentaron desde un valor basal de 120 pg/ml a un valor de 220 pg/ml a los 20 minutos del comienzo de la infusión de arginina. En la vena gastroepiloica izquierda el incremento en los valores de glucagón detectados después de la infusión de arginina, fue mucho mayor que el que se produjo en la vena cava (600 pg/ml a los 20 minutos frente a los 160 pg/ml basales). Asimismo, las concentraciones de esta hormona en la vena tiroidea fueron también mayores que las encontradas en la vena cava, con una media de 150 pg/ml basales y de 380 pg/ml 5 minutos después de la administración de arginina. Como era de esperar, los valores más altos se obtuvieron en la vena pancreático - duodenal superior, con un valor medio basal de 260 pg/ml y un valor a los 20 minutos de comenzar la infusión de 800 pg/ml.

7.1.2.- Modificaciones de la secreción de glucagón pancreático y extrapancreático en perros diabéticos

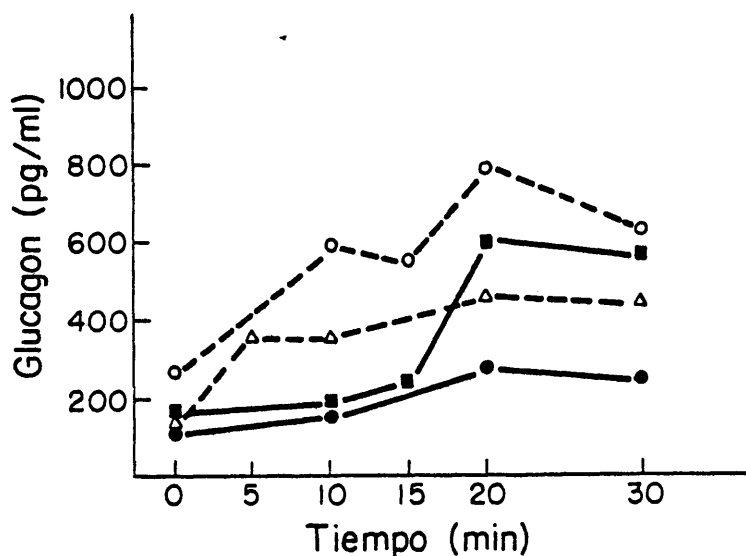


Figura 29.- NIVELES DE GLUCAGÓN INMUNOREACTIVO EN EL PLASMA DE PERROS CONTROLES.

Los niveles de glucagón fueron medidos, en condiciones basales y tras la administración intravenosa de arginina (0,5g/ Kg de peso corporal) durante 5 minutos, con la ayuda del antisuero 30K.

- - ● Vena cava inferior
- - ■ Vena gastroepiploica izda.
- △ - △ Vena tiroidea
- - ○ Vena pancreático-duodenal

En los perros hechos diabéticos por la administración intravenosa de alloxana, la secreción de glucagón, en todos los órganos estudiados, estuvo significativamente aumentada sobre las concentraciones obtenidas en los animales controles no sometidos a tratamiento, tanto antes como después de la administración intravenosa de arginina (Fig 30).

Los valores más elevados se obtuvieron a los 20 minutos de comenzar la infusión de arginina con 480, 1300, 1600 y 620 pg/ml frente a valores basales de 260, 300, 420 y 320 pg/ml en las venas cava, gastroepiploica izquierda, pancreático - duodenal superior y tiroidea, respectivamente.

7.2.- Estudios " in vitro "

7.2.1.- Efecto de diferentes metabolitos y hormonas sobre la secreción de glucagón por células aisladas de glándulas salivares de rata y humanos

Cuando células aisladas de glándulas submaxilares y parótidas de rata fueron incubados in vitro con diferentes estimulantes e inhibidores de la secreción de glucagón pancreático, se pudo observar que, tanto la arginina como la noradrenalina y bajas concentraciones de glucosa, estimulaban significativamente la secreción de glucagón (Tabla 10) a partir de estas células, cuando las comparaciones se realizaron con las células incubadas con 1 mg glucosa/ml (medio basal).

En el caso de las glándulas submaxilares, la liberación

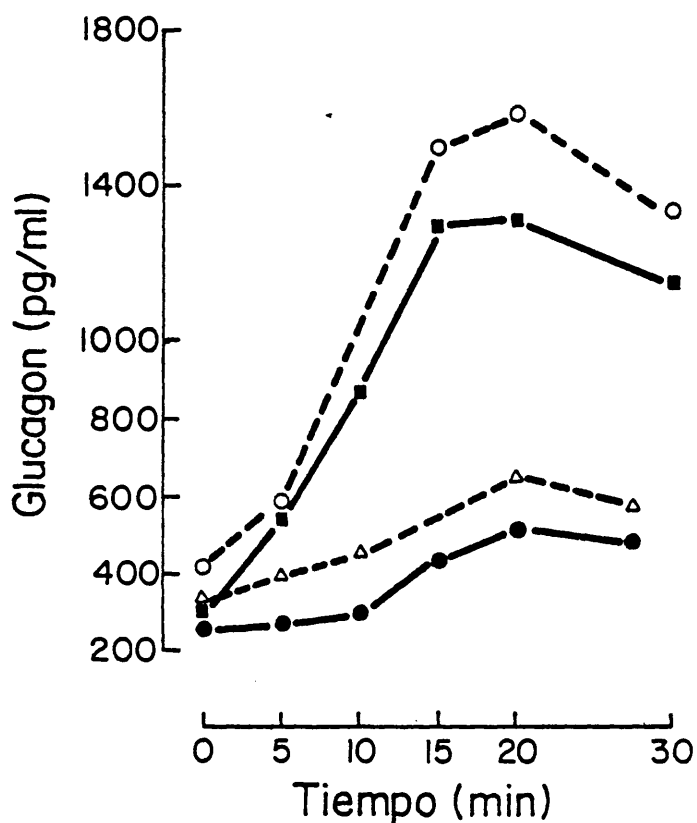


Figura 30.- NIVELES DE GLUCAGON IMMUNOREACTIVO EN EL PLASMA DE PERROS DIABETICOS.

Los niveles de glucagón fueron medidos, en condiciones basales y tras la administración intravenosa de arginina (0,5 g/Kg de peso corporal) durante 5 minutos, con la ayuda del antisuero 30K.

● - ● Vena cava inferior Δ - Δ Vena tiroidea

■ - ■ Vena gastroepiploica izda. ○ - ○ Vena pancreático-duodenal

TABLA 10

LIBERACION DE GLUCAGON POR CELULAS AISLADAS DE GLANDULAS SALIVARES HUMANAS Y DE RATA. MEDIAS.

Estímulo	Glucagón liberado (pg/10 ⁵ células/2h)			
	Glándulas humana		Glándulas de rata	
	Submaxilar (N=7)	Parótida (N=3)	Submaxilar (N=10)	Parótida (N=10)
Glucosa (0,3mg/ml)	145±7	145±12	2950±367	176±56
Glucosa (1mg/ml)	117±14	110±31	1743±339	100±10
Glucosa (3mg/ml)	89±18	88±3	1486±284	63±12
Insulina (5µg/ml)	99±16	100±29	1591±322	79±12
Arginina (5mM)	184±37	180±57	3160±538	171±23
Noradrenalina (5µg/ml)	159±24	123±38	2984±512	150±14

de glucagón fue muy elevada, alcanzando un valor 17 veces superior al detectado en las glándulas parótidas (1,74 ng de glucagón/ 10^5 células/2 horas basales, en las glándulas submaxilares, frente a 0,10 ng de glucagón/ 10^5 células/2 horas basales, en las glándulas parótidas).

Tanto la insulina como concentraciones elevadas de glucosa en el medio (3 mg/ml) no modificaron significativamente la secreción de glucagón.

También en la Tabla 10 se presentan los datos obtenidos con células aisladas de glándulas submaxilares y parótidas humanas incubadas " in vitro ". Una secreción elevada de glucagón sobre los valores basales (glucosa 1 mg/ml) se consiguió cuando al medio de incubación se añadió arginina, noradrenalina o cuando las concentraciones de glucosa fueron bajas (0,3 mg/ml). Igual que en los estudios realizados con ratas, la insulina y altas concentraciones de glucosa no modificaron esencialmente los valores basales de liberación hormonal.

7.2.2.- Efecto de diferentes metabolitos y hormonas sobre la secreción de glucagón por células aisladas y trozos de tejido de la rata.

La Tabla 11 muestra los efectos de la insulina, arginina, noradrenalina y distintas concentraciones de glucosa sobre la liberación de glucagón por células aisladas de timo y trozos de tejido de tiroides y glándulas suprarrenales.

TABLA 11

LIBERACION DE GLUCAGON POR CELULAS AISLADAS DE TIMO Y TROZOS DE TEJIDO DE TIROIDES Y GLANDULAS SUPRARRENALES DE RATA. MEDIA±ES. N=10.

Estímulo	Glucagón liberado		
	Timo (pg/10 ⁵ Cel/2h)	Tiroides (pg/órgano/2h)	Gl.Suprarrenales (pg/órgano/2h)
Glucosa (0,3mg/ml)	150±22	798±97	684±84
Glucosa (1mg/ml)	87±11	648±71	579±65
Glucosa (3mg/ml)	68±9	566±39	543±69
Insulina (5µg/ml)	59±9	546±58	538±69
Arginina (5mM)	182±20	923±101	800±96
Noradrenalina (5µg/ml)	152±17	802±81	790±94

La adición de arginina y noradrenalina al medio de incubación, aumentó significativamente los valores de secreción de glucagón en los tres órganos estudiados. Una disminución de los niveles de glucosa en el medio de incubación, produjo también un considerable incremento sobre los valores de secreción basales. (glucosa : 1mg/ml).

No se pudo observar sin embargo, una clara reducción de la liberación de glucagón por parte de estos órganos cuando el medio de incubación contenía insulina o altas concentraciones de glucosa.

DISCUSSION



Aunque desde hace muchos años se conoce que en los extractos de mucosa gástrica e intestinal existe un factor con propiedades hiperglucémicas y glucogenolíticas (SUTHERLAND y De DUVE 1948 y UNGER y col.,1967), se ha seguido considerando a las células A del páncreas endocrino como las únicas responsables de la síntesis y liberación de glucagón.

Tras el desarrollo del radioinmunoensayo para glucagón, se logró identificar una familia de polipéptidos, con origen en la mucosa intestinal, y que fueron englobados bajo la denominación de GLI. Estos péptidos, aunque aparentemente relacionados con el glucagón pancreático, difieren de este por su disminuida potencia biológica, distinto comportamiento inmunológico y por la existencia de cuatro fracciones con pesos moleculares diferentes a los de la hormona de origen pancreático.

Assan y col. (ASSAN y col.,1972) mostraron que los anticuerpos denominados " no específicos" estaban dirigidos contra un inmunodeterminante en la región amino terminal y central de la molécula de glucagón (residuos 2 - 23). El inmunodeterminante para anticuerpos " específicos " estaba localizado en la región carboxilo terminal de la molécula (residuos 24 - 29). Independientemente de sus tejidos de origen, los polipéptidos que reaccionan con anticuerpos C y N terminales se han denominado " glucagón inmunoreactivo " (IRG) y los polipéptidos que reaccionan solo con anticuerpos N terminales se han denominado " inmunoreactividad semejante al glucagón " (GLI).

Con el uso de estos dos tipos de antisueros : C y N terminales, junto con el descubrimiento de un anticuerpo dirigido

específicamente contra la glicentina, se ha obtenido suficiente información como para sugerir que este último polipéptido, o un polipéptido semejante a él, es el precursor común del glucagón y GLI. En apoyo de esta hipótesis están los hallazgos conseguidos con técnicas inmunocitoquímicas que muestran la presencia de GLI en las células L intestinales y la presencia de glucagón y GLI en las células A pancreáticas.

Como consecuencia del descubrimiento de niveles circulantes de glucagón normales en el plasma de perros previamente pancreatectomizados (MATSUYAMA y FOA, 1974 y VRANIC y col., 1974), - que sugerían la existencia de fuentes extrapancreáticas de glucagón, varios grupos (SASAKI y col., 1975 y MORITA y col., 1975), - identificaron en la mucosa gastrointestinal un polipéptido con un peso molecular de 3500 dalton y con unas propiedades inmunológicas, biológicas y fisicoquímicas semejantes a las del glucagón. - Asimismo Blázquez y col (BLAZQUEZ y col., 1977) han demostrado - que este glucagón extrapancreático se libera en grandes cantidades en los perros diabéticos.

Aunque durante mucho tiempo se pensó que el tracto gastrointestinal era la única fuente de GLI y glucagón de 3500 daltons, en 1974 (SILVERMAN y DUNBAR , 1974) se demostró la presencia de pequeñas cantidades de glucagón inmunoreactivo en las glándulas salivares de rata. Con posterioridad (PENHOS y col., 1975) se describió la presencia, en ratas evisceradas sin glándulas salivares, de niveles circulantes de glucagón e insulina semejantes a los que poseían los animales no tratados, lo cual sugería la existencia de otras fuentes extrapancreáticas para estas hormonas.

Ante estos hallazgos nos propusimos hacer un estudio detallado de la distribución tisular de ambas hormonas. Por los resultados presentados en este trabajo podemos afirmar que existe una amplia distribución de glucagón tipo pancreático y GLI en la rata. Con anterioridad, la presencia de glucagón inmunoreactivo no había sido localizada en órganos tales como tiroides, hipófisis, timo y glándulas suprarrenales. Recientemente sin embargo, (CONLON y col., 1979) se ha detectado GLI en varias áreas del cerebro canino como hipotálamo, amígdalas y mesencéfalo. Cuando estos autores utilizaron anticuerpos C - terminales, solo fueron capaces de determinar inmunoreactividad en el hipotálamo.

Por otra parte, Hojvat y col (HOJVAT y col., 1977) no pudieron localizar glucagón inmunoreactivo en las glándulas salivares de humanos y de varios animales de experimentación cuando el método empleado en la extracción hormonal fue ácido - alcohólico. Sin embargo, cuando emplearon salino acidificado con ClH a un pH de 2,8, fueron capaces de mostrar la presencia de cantidades sustanciales de un material de alto peso molecular (aproximadamente 70000 dalton) con inmunoreactividad para el glucagón. Al estudiar dicho material descubrieron que no se trataba de glucagón unido a proteínas de alto peso molecular o simplemente dimerizaciones de la molécula de glucagón, ya que el pico inmunoreactivo de 70000 dalton retenía su perfil cromatográfico cuando lo sometieron a incubaciones con urea 8 M o ácido acético 1 M durante 16 horas.

Contrariamente a lo observado por estos autores, la extracción con alcohol - ácido de las glándulas submaxilares, sublinguales y parótidas de la rata y de humanos (Tablas 2 , 5 , y 6) dieron resultados positivos para glucagón con los dos anticuer-

pos empleados en su medición (N y C terminales). Por otro lado, la cantidad de glucagón encontrada en las glándulas submaxilares aumentó tremendamente cuando el método empleado para la extracción era ácido - salino (Tabla 6). Igual fenómeno se pudo observar en las glándulas parótidas aunque en mucho menor grado - (Tabla 3).

En contraste con las elevadas concentraciones de glucagón inmunoreactivo detectadas en las glándulas salivares de la - rata, el perro solo posee cantidades trazadoras de la hormona en sus glándulas submaxilares (Tabla 6). El hombre, por el contrario, aunque en menor proporción que la rata, posee también una - cantidad apreciable de glucagón, especialmente en las glándulas - submaxilares (8,9 ng de glucagón/g de tejido en extractos ácido - alcohólicos y 18,5 ng de glucagón/g de tejido en extractos ácido - salinos).

Teniendo en cuenta el hecho de que Hojvat y col., no pudieron detectar glucagón de 3500 dalton en las glándulas submaxilares de ninguno de los animales que estudiaron, sometimos a los - extractos a un fraccionamiento cromatográfico en columnas de Bio - Gel P-30 con objeto de averiguar el peso molecular de los componentes que reaccionaban con anticuerpos C - terminales p específicos. En ambos tipos de extractos se obtuvo siempre un pico inmunoreactivo de un peso molecular de 3500 dalton , pudiéndose detectar - también otros dos picos adicionales de mayor peso molecular (Fig 5 y 6). Tanto el material de mayor peso molecular como el que - eluyó antes del marcador insulina - ¹²⁵I , no variaron su perfil - cromatográfico cuando fueron tratados con ácido acético 1 M (Fig 6) lo cual, de acuerdo con los estudios de Hojvat y col., parece

indicar que no se trata de polimerizaciones de la molécula de 3500 dalton ni de uniones a proteínas de alto peso molecular. Por tanto, el glucagón como tal molécula de 3500 dalton, puede ser añadido a la lista de otras hormonas identificadas en las glándulas salivares de roedores, tales como factor de crecimiento nervioso (FRAZIER y col., 1972), factor de crecimiento epitelial (STARKEY y col., 1975) y, posiblemente, gastrina (TATEUCHI y col., 1973).

Aunque el glucagón tipo pancreático, dentro del tracto gastrointestinal, solo había sido localizado en el estómago, nosotros hemos podido también detectarlo en cantidades apreciables tanto en el intestino delgado como en el grueso (Tablas 2 y 5). El contenido de GLI, de acuerdo con estudios anteriores, presenta una distribución típica en el tracto gastrointestinal, siendo prácticamente nula en el estómago y alcanzando los niveles máximos al final del intestino, concretamente en el íleon (Tablas 2 y 5). El reducido cociente glucagón/GLI (Tablas 2 y 5) en el yeyuno e íleon indica que el componente hormonal predominante era el GLI.

En contraste con la amplia distribución del glucagón y GLI, la inmunoreactividad para la insulina está limitada exclusivamente al páncreas y timo (Tabla 4).

Es pues un hecho claro que el glucagón tipo pancreático es una hormona de amplia distribución no circunscrita exclusivamente al páncreas y tracto gastrointestinal. Sin embargo, la primera interrogante que surge es si esta molécula con inmunoreactividad para el glucagón posee o no una serie de características que la

identifiquen con la hormona pancreática.

Con objeto de averiguar esto, realizamos una serie de experimentos diseñados para conocer las características inmunológicas, fisicoquímicas y biológicas del polipéptido que habíamos detectado en órganos extrapancreáticos, estudiando para ello su comportamiento frente a antisueros específicos C - terminales, su comportamiento electroforético y cromatográfico y su capacidad de unión a receptores para glucagón presentes en membranas plasmáticas hepáticas.

Las curvas de dilución inmunológicas obtenidas con el anticuerpo C - terminal 30K (Figs 15 , 16 y 17) proporcionaron una clara evidencia de la similitud en el comportamiento inmunoreactivo del glucagón cristalino, glucagón pancreático y el material presente en tiroides, glándulas suprarrenales, yeyuno y timo de rata y glándulas submaxilares y parótidas de rata y humanos. El hecho de que estas sustancias posean una inmunoreactividad con el 30K igual que el glucagón implica que comparten idénticos determinantes antigénicos en la secuencia de aminoácidos carboxilo terminal de ambas moléculas.

Dada la especificidad de la reacción entre hormona y receptor , el empleo del ensayo de radioreceptor para glucagón - constituye una prueba de garantía para caracterizar la identidad biológica de la hormona de origen extrapancreático. Los aspectos bioquímicos del receptor de glucagón y la adenilato ciclasa asociada con membranas hepáticas de rata, han sido exhaustivamente estudiados, especialmente por Rodbell y col. (RODBELL y LONDON - 1976). Las membranas de hepatocitos de rata poseen receptores - con una alta afinidad para el glucagón. A pesar de que la cinéti-

ca de unión del glucagón pancreático a estos receptores ha sido - muy bien estudiada, aún no está claro si el entero glucagón y el glucagón tipo pancreático interaccionan o no con receptores hepáticos.

Bataille y col (BATAILLE y col.,1974) han mostrado que extractos crudos intestinales pueden interferir con la unión de glucagón marcado a membranas hepáticas de rata ; este efecto - sin embargo no fue observado por otros autores (POHL y CHASE , - 1972). Holst (HOLST , 1975) encontró que el enteroglucagón - porcino se unía a membranas hepáticas pero con mucha menor afinidad que el glucagón estandar cristalino. Estos autores mostraron que para reducir la unión de glucagón marcado en un 50 %, necesitaban cuatro veces más enteroglucagón que glucagón cristalino.

Con objeto de encontrar una preparación adecuada para el ensayo de la actividad biológica del glucagón - tipo - pancreático, localizado en varios órganos extrapancreáticos, elegimos - membranas plasmáticas de hígado de rata, debido fundamentalmente a que el hígado es el órgano diana más importante para la acción fisiológica del glucagón y a que las membranas plasmáticas hepáticas de rata poseen sitios de unión para glucagón de alta afinidad.

Los resultados obtenidos con este sistema (Figs 18 y 20) indican que el glucagón presente en los distintos órganos - extrapancreáticos provoca una inhibición de la unión de glucagón radiactivo a las membranas, proporcional a la concentración y - semejante a los desplazamientos obtenidos con glucagón cristalino estandar. De los análisis de Scatchard (Figs 19 y 21), se puede deducir también que el glucagón tipo pancreático de estos órganos

se une a membranas hepáticas de rata con la misma afinidad que le hace el glucagón pancreático y el glucagón estandar cristalino y que, potencialmente por tanto, puede estimular la adenilato ciclasa y dar origen a todos los efectos metabólicos conocidos del glucagón.

Los estudios de electroforesis con geles de poliacrilamida, indican también (Figs 11 , 12 , 13 y 14) que la movilidad electroforética del glucagón de órganos tales como timo y glándulas submaxilares de rata y glándulas parótidas y submaxilares de humanos, es idéntica a la que presenta el glucagón estandar cristalino. Asimismo en algunos órganos se pudo detectar una sustancia con una movilidad electroforética muy baja que fue encontrada también en los estandar de glucagón cristalino, probablemente una sustancia de un elevado peso moleculalr.

Coincidiendo con estudios realizados en los últimos años, hemos podido observar que en los distintos órganos extra-pancreáticos existen además de la molécula de 3500 dalton , otras sustancias intimamente relacionadas con el glucagón. La primera información referente a la heterogeneidad de las formas inmuno-activas de glucagón circulante fue presentada por Valverde (VALVERDE y col., 1970). Por cromatografía del plasma de humanos y animales de experimentación en columnas de Bio-Gel P-30, estos autores pudieron detectar cuatro fracciones inmuno-activas. La primera de ellas eluyó en el volumen vacío de la columna y la llamaron BPG (" gran glucagón del plasma "). La identidad del BPG ha sido un misterio durante mucho tiempo. Valverde observó que el tratamiento con urea 8 M o ácido acético 1 M no alteraba

el modelo cromatográfico, pero que la incubación del BPG con tripsina conducía a la aparición de una molécula con un peso molecular semejante al glucagón. Una fracción semejante al BPG ha sido observada en extractos de páncreas y parece tener un peso molecular de 160000 dalton. A pesar de la presencia de este material en islotes y en extractos de páncreas, no hay aún evidencia convincente de que el BPG sea secretado por las células A. Información más reciente indica que el BPG tiene una actividad glucogenolítica en hígado que es al menos tan potente como la del glucagón porcino - cristalino.

La segunda fracción localizada poseía un peso molecular de 9000 dalton y parecía ser idéntica a un material encontrado en extractos de tejido pancreático y que ha sido denominado LGI. Estudios relacionados con el LGI indican que posee poca actividad biológica y que su vida media en plasma es doble de la que posee la fracción de 3500 dalton (O'CONNOR y LAZARUS, 1976).

La tercera fracción fue el glucagón de 3500 dalton y la cuarta y última fracción correspondía a un material con un peso molecular de 2000 o menor el cual, probablemente represente productos de degradación del glucagón. La proporción de estos cuatro componentes en la inmunoreactividad total del plasma varía según las condiciones y las diferentes especies animales.

Sin embargo por los resultados presentados en este trabajo, referentes al estudio de los pesos moleculares de los materiales con inmunoreactividad para el glucagón detectados en órganos extrapancreáticos, sugieren que los componentes inmunoreactivos detectados por Valverde y col no son solo de origen pancreático. Las Figs 4 , 5 y 7 , muestran la presencia de varias fraccio-

nes con inmunoreactividad para el glucagón en el timo, yeyuno y glándulas submaxilares de la rata y glándulas submaxilares y parótidas de humanos. El pico observado en el volumen vacío de la columna podría ser similar al BPG, mientras que el material eluido hacia la fracción número 20 parece corresponder en peso molecular a la fracción de 9000 dalton encontrada por aquellos autores. En todos los órganos cromatografiados se obtuvo también un pico inmunoreactivo que corresponde al glucagón de 3500 dalton y picos adicionales de menor peso molecular representando probablemente productos de degradación de las tres fracciones anteriores.

El material presente en el volumen vacío de la columna y el de peso molecular cercano a 9000 dalton, no parecen representar glucagón unido a proteínas ni polimerizaciones de esta hormona, puesto que después de la cromatografía en ácido acético 1 M (Fig 6) , ambos picos retienen su perfil cromatográfico.

Por los estudios de caracterización anteriormente descritos, se puede afirmar que en los distintos órganos extrapancreáticos de la rata y glándulas salivares de humanos , existe una heterogeneidad de sustancias relacionadas con el glucagón, - cuyo comportamiento inmunológico con anticuerpos C - terminales es idéntico al que posee el glucagón pancreático y cuya movilidad electroforética y afinidad por los receptores para esta hormona en membranas plasmáticas de hígado, no presentan tampoco ninguna diferencia con respecto al glucagón secretado por las células A de los islotes pancreáticos.

Parece por tanto un hecho establecido que el material detectado en el tracto gastrointestinal, timo, glándulas suprarre-

nales, tiroides, hipófisis y glándulas salivares representa "auténtico" glucagón y, posiblemente precursores de esta hormona.

Así como los estudios de caracterización del glucagón extrapancreático parecen indicar que se trata de una hormona con idénticas características que el glucagón pancreático, los estudios realizados para caracterizar la inmunoreactividad para la insulina no dieron los mismos resultados. En 1965 se mostró por primera vez (PANSKY y col., 1965) la presencia de un material inmunoreactivo para la insulina en el timo de ratones leucémicos, pero estos autores no aportaron ningún dato que lo identificara. La inmunoreactividad detectada por nosotros en el timo de ratas controles y diabéticas, parece ser distinto de la insulina pancreática por diferentes criterios :

- 1) En ratas hechas diabéticas por la administración intracardíaca de estreptozotocina, los niveles de insulina presentes en el timo no disminuyeron, como ocurrió en el páncreas de animales diabéticos, e incluso experimentaron un ligero incremento.
- 2) La cromatografía de dicho material en columnas de Bio-Gel P-30 produjo dos pequeños picos (Fig 10) pero ninguno coincidente con el lugar de elución del marcador insulina - ¹²⁵I y
- 3) Su movilidad electroforética fue distinta de la que poseía la insulina cristalina de rata y la insulina de extractos pancreáticos.

Hasta ahora, el significado de las distintas fracciones inmunoreactivas para el glucagón encontradas en órganos extrapancreáticos es incierto, su relación con el glucagón pancreático,

respuesta a estímulos e incluso peso molecular, está aún en debate, pero lo que parece evidente es que en todos los órganos donde es posible localizar glucagón tipo pancreático existen también otras formas de alto peso molecular con una casi segura relación con esta hormona en el proceso biosintético de la célula A, tanto pancreática como extrapancreática.

En los últimos años, la biosíntesis de glucagón ha sido objeto de intensos estudios en varios laboratorios, sin embargo es poco lo que se conoce acerca de su mecanismo en los sistemas de mamíferos. Considerando la facilidad con que la insulina es sintetizada en islotes aislados de mamíferos, la biosíntesis de glucagón es extremadamente difícil de conseguir en ellos.

En nuestro sistema de células aisladas de glándulas submaxilares, tanto de rata como humanas, hemos conseguido unas claras y elevadas incorporaciones de triptófano -³H en moléculas con diferentes pesos moleculares. Estudios recientes sobre el mecanismo de la biosíntesis de glucagón han presentado evidencias de la existencia de moléculas de alto peso molecular, entre 69000 y 4500 dalton. (TUNG y col., 1976, TUNG y ZEREGA, 1971, NOE y BAUER 1973 y TUNG, 1973) que pueden ser marcadas con triptófano radiactivo.

Los resultados presentados por nosotros apoyan la idea de que materiales con un peso molecular superior a 3500 dalton están implicados en el proceso biosintético (Figs 22, 23, 24 y 28). La utilización en nuestros estudios de un anticuerpo dirigido específicamente contra la región carboxilo terminal de la molécula de glucagón, frente a la mayoría de los estudios biosintéticos que miden exclusivamente la incorporación de radiactividad



por las células de los islotes pancreáticos, hace posible identificar positivamente como glucagón el material eluido en la zona de 3500 dalton de peso molecular y como moléculas relacionadas con él los componentes que eluyen con anterioridad.

Estos distintos materiales se han encontrado en un cierto número de especies, incluyendo el hombre. Poffenbarger (POFFENBARGER y col., 1971), utilizando islotes aislados de ratón describieron incorporación de leucina - ^3H en una proteína que eluyó con unas características de peso molecular de 20000. Otros autores (PETERSEN y col., 1975) utilizando una mezcla de aminoácidos marcados con ^3H , obtuvieron incorporación en una molécula de aproximadamente 16000 dalton en islotes aislados de ratón, la cual podría ser unida por anticuerpos dirigidos contra el glucagón. Ambos autores sin embargo, no fueron capaces de obtener síntesis de glucagón de 3500 dalton. Tung (TUNG, 1973) utilizando islotes de paloma aislados con colagenasa obtuvieron incorporación de triptófano - ^3H en un material con un peso molecular aparente de 69000 dalton. Si este material y el de 20000 dalton están relacionados es algo que aún es desconocido. Hellertrom y col (HELLERSTROM y col., 1974) obtuvieron incorporación de radiactividad en una molécula de un peso molecular de 18000 dalton. el cual, cuando se fraccionaba a un pH bajo se disociaba en un material con un peso molecular de 9000 dalton.

Aunque hay evidencias que sugieren que estas moléculas mayores pueden servir como intermediarios en la biosíntesis de glucagón, pruebas convincentes sobre una transferencia metabólica de radiactividad de estas moléculas mayores al glucagón de 3500 dalton no han sido aún encontradas. En efecto, como resultado de

un estudio utilizando islotes aislados de paloma (O'CONNOR y LAZARUS, 1974) no se pudo demostrar transferencia metabólica de radiactividad de una molécula de 8000 dalton a la molécula de 3500 dalton .

Con la obtención de una clara incorporación de triptófano - ^3H , en nuestro sistema de trozos de tejido de tiroides y glándulas suprarrenales y células aisladas de timo y glándulas submaxilares, en diferentes proteínas con distintos pesos moleculares y la demostración de la capacidad de unión de estos polipéptidos a anticuerpos C - terminales para el glucagón, ha quedado claramente establecido que estos órganos no son meros depósitos de esta hormona, sino que son capaces de sintetizarla activamente. Debido a la poca información existente acerca de la posible relación entre los componentes con distinto peso molecular separados por cromatografía y la molécula de 3500 dalton , realizamos una serie de experimentos, cuyos resultados se muestran en las Figs 23, 25, 26 y 27, encaminados a esclarecer este hecho. En la Fig 23 se puede observar que , después de la primera hora de incubación de las células, ya se puede detectar un péptido de elevado peso molecular marcado con triptófano - ^3H y con inmunoreactividad para el glucagón. Incrementando el tiempo de incubación, la inmunoreactividad asociada con este pico se mantiene más o menos constante , mientras que vá apareciendo una mayor proporción de ella en zonas anteriores al marcador insuline- ^{125}I y en la zona de 3500 dalton , indicando la conversión a moléculas más pequeñas. La rápida desaparición de la molécula eluída en las fracciones 19-21, parece indicar que sirve como molécula intermediaria en el proceso de biosíntesis.

Existen varios argumentos en favor de que las formas - de alto peso molecular no sean polímeros del glucagón :

- 1) Aparecen al menos 1 hora antes de que se detecte radiactividad en la región del glucagón
- 2) Con incrementos del tiempo de incubación, la cantidad de inmunoreactividad en la zona de peso molecular 3500 vá aumentando en comparación con las cantidades de la molécula aparecida en la - zona precursora.
- 3) La tripsinización del precursor aislado y el fraccionamiento - cromatográfico del digerido triptico (Fig 27) muestran que las moléculas de alto peso molecular pierden inmunoreactividad - mientras que simultáneamente aparece un polipéptido que posee el peso molecular del glucagón y que muestra mucha mayor inmunoreactividad que la molécula de la zona precursora.

Con objeto de averiguar si las formas de alto peso - molecular sintetizadas en las glándulas submaxilares de rata tenían alguna relación precursor - producto, realizamos una serie de experimentos en los que se indujo una inhibición de la síntesis de proteínas en momentos críticos del proceso.

En la Fig 25, panel B, se puede observar una clara inhibición de la incorporación de triptófano ^3H en la molécula de mayor peso molecular después de la adición de cicloheximida al medio, mientras que la inmunoreactividad localizada en este pico - se desplazó de una forma inequívoca hacia una molécula de un peso molecular de 3500 dalton..

La inhibición de la incorporación de triptófano ^3H - en proteínas de alto peso molecular, bien por la adición de ciclo-

heximida o bien por la sustracción de triptófano - ^3H del medio de incubación y la subsecuente aparición de inmunoreactividad en otra molécula más pequeña con un peso molecular idéntico al del glucagón de 3500 dalton, junto con los datos obtenidos después del tratamiento con tripsina y de las incubaciones con triptófano - ^3H a distintos tiempos, parecen indicar que el producto primario de síntesis de la célula A no es la molécula de 3500 dalton, sino una molécula mayor (Figs 25 y 26, fracciones 14 - 19) cuya ruptura metabólica daría origen al glucagón de 3500 dalton, probablemente a través de varios intermedios de conversión.

Por los resultados obtenidos con nuestro sistema de células aisladas con colagenasa de glándulas salivares, se puede deducir que estas células son un excelente sistema para estudiar la biosíntesis de glucagón. Estas células se pueden obtener con gran facilidad por tratamiento con colagenasa y sin que se produzcan alteraciones durante el proceso de aislamiento, lo cual da lugar a altos porcentajes de viabilidad celular. Los datos obtenidos con ellas indican una biosíntesis primaria de una molécula de alto peso molecular y una rotura metabólica de esta para dar glucagón de 3500 dalton a través de moléculas intermedias con diferentes pesos moleculares. Estos hallazgos parecen estar de acuerdo con la existencia de moléculas precursoras comunes para glucagón y GLI (glicentina o materiales semejantes a ella) en las células A pancreáticas y extrapancreáticas.

Algunos autores han sugerido que el GLI puede representar simplemente una familia primitiva de péptidos de los que se pueden haber desarrollado hormonas estructural y biológicamente -

relacionadas, como el glucagón, secretina, VIP y GIP (MOODY y col.,1977), pero cuya actividad biológica especializada se manifiesta solo por los polipéptidos que derivan de ella. Parece evidente sin embargo, que todos los polipéptidos igual que el glucagón del páncreas y órganos extrapancreáticos comparten una ruta biosintética común.

Recientemente se ha aislado de intestino porcino un péptido de 100 aminoácidos, la glicentina, que contiene la secuencia entera del glucagón extendida en 63 aminoácidos en su porción amino terminal y en 8 aminoácidos en su porción carboxilo terminal (SUNDBY y col.,1976). Un péptido de un peso molecular de 4500 ha sido aislado también de páncreas bovino el cual contenía igualmente la secuencia completa del glucagón extendida en 8 aminoácidos en su extremo C - terminal. Posteriormente estudios de inmunofluorescencia, utilizando un antisuero que no une glucagón y dirigido específicamente contra la molécula de glicentina, han mostrado la presencia de este material en las células A del páncreas y estómago y en las células L del intestino (RAVAZZOLA y col.,1979).

Estos y otros estudios relacionados, han proporcionado las bases para la clarificación de las estructuras de los péptidos semejantes al glucagón. Los componentes del IRG poseen la secuencia entera del glucagón extendida solo en su extremo amino terminal, y por tanto , el inmunodeterminante C-terminal del glucagón es accesible a los anticuerpos. Los componentes del GLI también contienen la secuencia entera del glucagón pero extendida también en su extremo C-terminal, con lo cual el inmunodeterminante C-terminal del glucagón no es accesible a los anticuerpos. Rupturas progresivas en la extensión amino terminal del precursor co-

mún de los polipéptidos relacionados con el glucagón, sin extracción de la extensión C-terminal, dá origen al GLI que predomina en el intestino. Por el contrario, la extracción de la extensión C-terminal dá origen a los IRG que predominan en el páncreas.

Parece por tanto evidente que la diferente distribución de los polipéptidos semejantes al glucagón en los tejidos, no es debido a una diferencia en el producto primario del gen de las células endocrinas, sino que es una consecuencia del diferente procesamiento de un único producto (proglucagón) por diversas enzimas proteolíticas de estas células.

Aunque incompletamente conocida, algo más se sabe acerca del control de la secreción de glucagón por las células A del páncreas. Los resultados de las Tablas 10 y 11, obtenidos con células aisladas de timo y glándulas salivares de rata y humanos, incubadas in vitro, indican que, al igual que ocurre con los islotes pancreáticos, la liberación de glucagón parece ser un fenómeno dependiente de la concentración de glucosa en el medio. Altas concentraciones de glucosa inhiben la secreción de glucagón, mientras que esta es estimulada cuando el medio es gluco-pénico. De una forma semejante a lo que ocurre en islotes pancreáticos incubados in vitro, la arginina y la noradrenalina fueron dos potentes estimulantes de la secreción de glucagón al medio de incubación por parte de las células de distintos órganos extrapancreáticos.

Los aparentemente elevados valores de liberación de glucagón observados en la tabla 10 por las glándulas submaxilares de rata, pueden ser explicados en función de su alto contenido en glucagón detectado con el método de extracción ácido - salino.

El efecto de la insulina sobre la liberación de glucagón y su posible modo de acción no es bien conocido. Un efecto inhibitorio de la insulina exógena sobre la liberación de glucagón ha sido presentada " in vivo " e " in vitro " por diferentes autores (MULLER y col.,1971 y PAGLIARA y col.,1975), aunque otros, sin embargo, no han sido capaces de reproducir dicho efecto. La existencia de un sistema regulador entre el glucagón y la insulina endógenos podría explicar este fenómeno.

Numerosas observaciones sin embargo, apoyan el concepto de que la célula A pertenece a la familia de las células sensibles a la insulina (igual que el músculo, adipocitos o glándula mamaria), y que la insulina es necesaria para permitir la entrada de glucosa en la célula A y la subsecuente inhibición de la secreción de glucagón. Se ha postulado la posibilidad de que la insulina provoque supresión de la liberación de glucagón por una facilitación del transporte de glucosa y su metabolización dentro de la célula A. Ostenson y col (OSTENSON y col.,1977) encontraron que el efecto supresivo de la insulina sobre la liberación de glucagón por las células A pancreáticas incubadas " in vitro " era modulado vía un metabolismo estimulado de la célula A.

La célula A pancreática normal, en estrecho contacto dentro de los islotes con células B adyacentes , está normalmente expuesta a altas concentraciones de insulina, por tanto su sensibilidad a la insulina exógena adicional puede ser difícil de demostrar. En este sentido, las células A extrapancreáticas representan un interesante modelo de células A aisladas en un órgano privado de células B adyacentes. Recientemente (LEFEBRE y LUYCKX 1978) se ha mostrado que concentraciones de insulina tan bajas como 5 - 10 μ U/ml ejercen alguna inhibición sobre la liberación

de glucagón de la célula A gástrica canina. Otros autores, sin embargo, no han podido detectar influencia de la insulina exógena sobre la liberación de glucagón extrapancreático.

En nuestro sistema, las células aisladas de glándulas salivares de rata y humanos y timo de rata (Tablas 10 y 11) , no fueron muy sensibles a la acción de la insulina añadida al medio de incubación. Aunque los valores de liberación de glucagón estuvieron por debajo de los valores basales, su diferencia con ellos no llegó a ser significativa.

Ostenson y col., observaron un efecto inhibitorio " in vitro" de la insulina sobre células A pancreáticas, pero después de haberlas aislado de las células B adyacentes y haberlas mantenido en cultivo en ausencia total de insulina antes de comenzar el experimento. En nuestro caso, la menor sensibilidad de la célula A extrapancreática a la acción de la insulina, con respecto a los datos obtenidos por Ostenson y col., podría deberse a que, tanto el timo como las glándulas submaxilares, están muy inervadas y estuvieron expuestas , hasta el momento de realizar el experimento a las concentraciones normales de insulina en plasma.

De cualquier modo, el postulado efecto regulador insulina \rightleftharpoons glucagón, debe aún ser estudiado a fondo.

El papel fisiológico de los GLIs intestinales y del IRG, producidos por órganos distintos del páncreas, no ha sido todavía totalmente establecido, debido principalmente a que el material puro es difícil de obtener y a que los datos de que se disponen sobre los mecanismos de secreción son escasos. Los datos presentados en este estudio parecen indicar que las células A presen-

tes en órganos tales como el tiroides, timo, glándulas suprarrenales y glándulas salivares, siguen un modelo de secreción más o menos similar al que poseen las células A de los islotes.

Si como se ha postulado (WEIR y col.,1976), las altas concentraciones de insulina intra - islote juegan un papel esencial en la supresión de la liberación de glucagón inducida por la glucosa, la ausencia de altos niveles de insulina alrededor de las células A extrapancreáticas podría explicar la persistencia de concentraciones en plasma anormalmente altas de glucagón en pacientes diabéticos recibiendo una terapia convencional de insulina.

De cualquier forma lo que sí parece claro, es que la liberación de glucagón juega un papel importante en el mantenimiento de la gravedad de la hiperglucemia en sujetos diabéticos y hay muchos datos que sugieren que el glucagón extrapancreático puede contribuir a la hiperglucagonemia observada en ciertos tipos de diabetes (DOBBS y col.,1975).

El reciente interés en el conocimiento de la estructura y funcionalidad biológica del glucagón y materiales relacionados con él (IRG y GLI), ha llevado también a la búsqueda de la causa de la amplia distribución de estos materiales, relacionándolos para ello con células entero - endocrinas. Las células entero - endocrinas están distribuidas en el epitelio a través de todo el tracto gastrointestinal, mostrando importantes acumulaciones en la región pilórica y en el duodeno. La mayoría de los tipos celulares endocrinas (cerca de 16) son responsables de la síntesis de varias hormonas entéricas y, algunas células entero -

endocrinas, pueden sintetizar más de una hormona peptídica. Estas células se han clasificado a veces como " células sensoriales " y las hormonas producidas por ellas se han interpretado como equivalentes de sustancias neurotransmisoras. Investigaciones morfológicas sugieren que las células entero - endocrinas están controladas por estímulos químicos y físicos, incluyendo aquellos debidos a la composición del quimo. Las hormonas entéricas pueden actuar directamente influyendo en el medio ambiente más cercano por una ruta " paracrina " o pueden también afectar órganos diana por una ruta endocrina.

Las células entero - endocrinas se han clasificado - junto con células similares del páncreas constituyendo las células endocrinas " gastro - entero - pancreáticas " (sistema endocrino gastro - entero - pancreático). Las características citoquímicas de muchas de estas células han conducido a la definición de la serie de células APUD (ver Introducción , apartado 2). Las características comunes de estas células (en las que están incluidas las células A productoras de IRG y las células L productoras de GLI) han conducido a algunos autores a postular la existencia de unas células progenitoras, comunes para todas ellas, que se originarían de la cresta neural, tubo neural o neuroectodermo, las cuales migrarían durante el desarrollo embrionario temprano a sus localizaciones definitivas en los diferentes órganos. Sin embargo - hasta el presente no se ha presentado una evidencia concluyente - de esta hipótesis y el tema está aún en controversia.

CONCLUSIONES

- 1.- Aunque el polipéptido de 29 residuos aminoácidos, glucagón, ha sido localizado en páncreas, estómago canino y mucosa duodenal del cerdo, la distribución que presenta en la rata es mucho más amplia, pudiéndose detectar su presencia con anticuerpos específicos C-terminales, en todo el tracto gastrointestinal, glándulas salivares, timo, glándulas suprarrenales, tiroides, hipófisis y riñones. Las máximas concentraciones de glucagón extrapancreático se detectaron en el tracto gastrointestinal y glándulas submaxilares.
- 2.- La distribución y contenido de glucagón extrapancreático es específica de cada especie. Mientras que en la rata el tracto gastrointestinal y glándulas submaxilares parecen ser la fuente principal, las glándulas submaxilares del perro solo poseen cantidades trazadoras de esta hormona poseyendo, sin embargo, el tiroides, una importante capacidad secretora de glucagón. Las glándulas submaxilares de humanos, aunque en mucha menor proporción que la rata, poseen una cantidad apreciable de glucagón.
- 3.- La distribución de la inmunoreactividad para insulina parece limitada al páncreas y timo de rata, aunque el péptido localizado en este último órgano no comparte las mismas características de la insulina pancreática.
- 4.- El fraccionamiento cromatográfico de extractos de yeyuno, timo y glándulas submaxilares de rata reveló la presencia en estos órganos de cuatro fracciones inmunoreactivas, determinadas con antisuero C-terminal (30K) similares a las observa-

das en el plasma de humanos y animales de experimentación, las cuales corresponden al glucagón (3500 dalton.) y a moléculas, probablemente precursoras, de mayor peso molecular.

- 5.- El glucagón inmunoreactivo extrapancreático posee la misma afinidad que el glucagón pancreático para los receptores de esta hormona presentes en las membranas hepáticas de rata.
- 6.- Las glándulas submaxilares de rata y humanos y el timo, tiroi-des y glándulas suprarrenales de rata, liberan glucagón en respuesta a los mismos estimulantes que movilizan esta hormo-na a partir de las células A pancreáticas.
- 7.- La elevada secreción de glucagón por las glándulas submaxila-res de rata, tanto en condiciones basales como durante la es-timulación por arginina o por bajas concentraciones de gluco-sa, indica que este órgano puede ser una fuente importante de glucagón en la rata.
- 8.- El modelo de secreción de glucagón por el estómago y tiroides de perro es similar al que posee el páncreas de estos anima-les.
- 9.- En comparación con los animales controles, en los perros dia-béticos se observó una mayor concentración de glucagón circu-lante, en condiciones basales y tras la estimulación con ar-ginina. A esta hiperglucagonemia contribuyeron tanto el pán-creas como el estómago y tiroides.

- 10.- La incubación " in vitro " de células aisladas de timo de - rata y glándulas submaxilares de rata y humanos y trozos de tejido de tiroides y glándulas suprarrenales de rata con - triptófano marcado radiactivamente, produce una incorpora- ción de este aminoácido en proteínas con diferentes pesos - moleculares.
- 11.- Estas proteínas fueron identificadas como glucagón y pépti- dos relacionados con él dada su capacidad de reacción con - anticuerpos C-terminales específicos para glucagón.
- 12.- La aparición de una molécula de tamaño igual al glucagón - después de la tripsinización del pico inmunoreactivo de ma- yor peso molecular, indica que una estructura semejante al glucagón (3500 dalton) está presente dentro de ella.
- 13.- La inequívoca demostración de una transferencia de inmunoreac- tividad desde la molécula de alto peso molecular al producto de 3500 daltons, observada en unas condiciones de inhibición de la síntesis de proteínas por adición de cicloheximida al medio de incubación o por extracción de este del triptófano marcado radiactivamente, indica que el glucagón, al igual que la insulina, es biosintetizado vía un precursor de alto peso molecular que es transformado metabólicamente en glucagón de 3500 daltons.
- 14.- El peso molecular y la corta vida media del pico eluido in- mediatamente después del de mayor peso molecular, parecen in- dicar la existencia de productos intermediarios en el proce- so de biosíntesis del glucagón.

BIBLIOGRAFIA

- ASSAN, R. y N. SLUSHER . Diabetes 21 : 843, 1972.
- ASSAN, R. , G. TCHOBROUTSKY y G. ROSSELIN . Pathol. Biol. 17 : 747, 1969.
- AVRUCH, J y D.F.H. WALLACH. Biochem Biophys. Acta. 233 : 334, - 1971.
- BAETENS, D. , C. RUFENER , B.C. SRIKANT , R. DOBBS , R.H. UNGER y L. ORCI. J. Cell. Biol. 69 : 455, 1976.
- BANTING, F.G. y C.H. BEST. J. Lab. Cli. Med. 7 : 251 , 1922
- BARNES, A.J. y BLOOM, S.R. Lancet 1 : 219, 1976
- BARNES, A.J. , BLOOM, S.R. , K.G.M. ALBERTI , P. SMYTHE , A.P. - ALFORD y D.J. CHISHOLM . N. Engl. J. Med. 296 : 1250 , 1977.
- BATAILLE, D. , P.FREYCHET y G. ROSSELIN . Endocrinology 95 : 713, 1974.
- BATAILLE, D. , N. JARROUSE , N. VANCLIN , C. GESPACH y G. ROSSELIN
En : " Glucagón : Its role in physiology and clinical medicine -
(P.P.Foa, J.S.Bajaj y N.L.Foa, eds.), Springer-Verlag, New York, pp-
255, 1977.
- BEAUPAIN, D. y F. DIETERLEN-LIEVRE. Gen Comp. Endocrinol. 23 : 421 , 1974.
- BENSLEY, R.R. Am. J. Anat. 12 : 297 , 1911.
- BENTLEY, P.J. y B.K.FOLLET. J. Endocrinol. 31 : 127, 1965.
- BERSON, A. y R.S.YALOW. Ann. N. Y. Acad. Sci. 82 : 338, 1959
- BLANCHARD, H.H. y M.V.KING. Biochem. Biophys. Res. Commun. 25 : 298, 1966.

- BLAZQUEZ, E. , L. MUÑOZ-BARRAGAN , G.S.PATTON , R. DOBBS y R.H. UNGER. J. Lab. Clin. Med. 89 : 971 , 1977.
- BLAZQUEZ, E. , L. MUÑOZ-BARRAGAN , G.S. PATTON , L. ORCI , R.E. DOBBS y R.H. UNGER. Endocrinology 99 : 1182 , 1976.
- BLOOM, W. Anat. Record. 49 : 363, 1931.
- BOQUIST, L. , FALKMER, S. y B.K. MEHROTRA. Gen. Comp. Endocrinol. 17 : 236 , 1971.
- BROMER, W.W. , L.G.SINN , A. STAUB y O.K.BEHRENS. J. Am. Chem. Soc. 78 : 3858 , 1956.
- BROWN, M. y W. VALE. Endocrinology 98 : 819 , 1976.
- BUSSOLATI, G. , C. CAPELLA , G. VASALLO y E. SOLCIA. Diabetologia 7 : 181 , 1971.
- CAPELLA, C. y E. SOLCIA. Arch. Histol. Jap. 31 : 1 , 1972.
- CONLON, J.M. , W.K. SAMSON , R.E. DOBBS , L. ORCI y R.H. UNGER. Diabetes 28 : 700 , 1979.
- CARPENTIER, J.L. , F. MALAISSE-LAGAE , W. MULLER y L. ORCI. En : " Glucagón : Its role in physiology and clinical medicine " (P. P.Foà, J.S.Bajaj y N.L.Foà, eds.), Springer Verlag, New York, pp 23, 1977.
- CARRAWAY, R. y S.E. LEEMAN. J. Biol. Chem. 248 : 6858 , 1973.
- CAVALLERO, C. y E. SOLCIA. En : " Proc. 14th Symp. Deutsch.Ges. Endokrinol " , Springer, Berlin, pp 258 , 1968.
- CAVALLERO, C. , G. VASALLO , C. CAPELLA y E. SOLCIA. En : " Advances in gastrointestinal endoscopy" Proc. of 2nd World Congress of gastrointestinal endoscopy, Rome and Copenhagen, Piccin Medical

Books, Padova. pp 449 , 1972.

COLLIP, J.B. Am. J. Physiol. 63 : 391, 1923.

DAVIS, B.J. Annals New York Academy of Sciences 121 : 404 , 1964.

DECONINCK, J.F. , F.A. Van ASSCHE , P.R. POTVLIEGE y W. GEPTS. -
Diabetologia 8 : 326 , 1972.

DIETERLEN-LIEVRE, F. Bull. Biol. Fr. Belg. 49 : 3 , 1965.

DIETERLEN-LIEVRE, F. y D. BEAUPAIN. En : " Evolution of pancreatic
islets " (T.A.I.Grillo, L.Leibson y A.Epple, eds.), Pergamon Press,
Oxford, pp 37 , 1976.

DOBBS, R. , H. SAKURAI , H. SASAKI , G. FALOONA , I. VALVERDE , -
D. BAETENS , L.ORCI y R.H. UNGER. Science 187 : 544 , 1975.

EDWARDS, J.C. , S.L. HOWELL y K.W. TAYLOR. Nature 224 : 808 , 1969.

EDWARDS, J.C. , S.L. HOWELL y K.W. TAYLOR . Biochem. Biophys. Acta
215 : 297 , 1970.

EISENTRAUT, A.M. , N. WHISSEN y R.H. UNGER. Amer. J. Med. Sci. -
225 : 137 , 1968.

ENSINCK, J.W. , C. SHEPARD , R.J. DUDL y R.H. WILLIAMS. J. Clin.
Endocrinol. Metab. 35 : 463 , 1972.

EPPLE,A. Gen Comp. Endocrinol. 9 : 137 , 1967.

ESTERHUIZEN, A.C. y S.L. HOWELL. J. Cell. Biol. 47 : 593 , 1970.

EXTON, J.H. y C.R. PARK. J Biol. Chem. 243 : 4189 , 1968.

FALKMER, S. Ann. Endocrinol. 27 : 321 , 1966.

FELIG, F. , J. WAHREN y R. HENDLER. J. Clin. Invest. 58 : 76, 1976.

FOA, P.P. *Ergeb. Physiol.* 61 : 141 ,1968.

FOA, P.P. En " Handbook of physiology ". *Endocrinology*, Vol.1,Sec.7 (R. Greep y E. Astwood , eds.). American Physiological Society , - Washington, pp 261 , 1972.

FOA, P.P. , S. BERGER , L. SANTAMARIA , J.A. SMITH y H.R. WEINSTEIN. *Science* 117 : 82 ,1953.

FRAZIER, W.A. , R.H. ANGELETTI y R.A. BRADSHAW. *Science* 176 : 482. 1972.

FREYCHET, P. , R. KAHN , J. ROTH y D.M. NEVILLE. *J. Biol. Chem.* - 247 : 3953 , 1972.

FUJIMOTO, W.Y. y J.W. ENSINCK. *Endocrinology* 98 : 259 , 1976.

FUJITA, T. *Arch. Histol. Jap.* 29 : 1 , 1968.

FUJITA, T. En " Gastro - entero - pancreatic endocrine system. A cell biological approach." (Fujita eds.), Georg. Thieme, Stuttgart., 1974.

GERICH, J. En " Glucagón : Its role in physiology and clinical Medicine " (P.P.Foà, J. Bajaj y N.L. Foá , eds.), Springer - Verlag, New York, pp 617 , 1977.

GERICH, J.E. , M.A. CHARLES y G.M. GRODKY. *J. Clin. Invest.* 54 : 833 1974.

GREENWOOD, F.C. , W.M. HUNTER y J.S. GLOVER. *Biochem. J.* 89 : 114, 1963.

GRILLO, T.A.I. *J. Endocrinol.* 31 : 67 , 1964.

GRILLO, T.A.I. En " Organogenesis " (R.L.De Haan y H.Ursprung, eds) New York. pp513 ,1965.



GRIMELIUS, L. , G. CAPELLA , R. BUFFA , J.M. POLAK , A.G.E. PEARSE y E. SOCCIA. Virchows Arch. (Cell Pathol) 20 : 217 , 1976.

GROSS, R. y P. MIALHE. Diabetologia 10 : 277 , 1974.

GUIDOTTI, G. , D. KANAMEISCHI y P.P.FOA. Am J. Physiol. 201 : 863, 1961.

HELLER, H. y K. LEDERIS. En : " Subcelular organization and function in endocrine tissues " (H.Heller y K.Lederis , eds.). Unir Press Cambridge, 1971.

HELLERSTROM, C. , B. HELLMAN , B. PETTERSSON y G. ALM. En : " The structure and metabolism of the pancreatic islets " (S.E.Brolin, B. Hellman y H. Knutson, eds.). Pergamon Press, Oxford. pp 117 - 1964.

HELLERSTROM, C. , S.L. HOWELL y J.C. EDWARDS. Biochem. J. 140 : 13, 1974.

HELLERSTROM, C. , S.L. HOWELL , J.C. EDWARDS y A. ANDERSSON. Febs Letters 27 : 97 , 1972.

HELLERSTROM, C. , S.L. HOWELL , J.C. EDWARDS y A. ANDERSSON. Postgrad. Med. J. 49 : 601 , 1973.

HELLERSTROM, C. , S. L. HOWELL, J.C. EDWARDS , A. ANDERSSON y C.G. OSTENSON. Biochem J. 140 : 13 , 1974.

HOJVAT, G. , J. KIRSTEIN , V. KISLA , V. PALOYAN y A.M. LAWRENCE. En " Glucagón : Its role in physiology and clinical medicine " (P.P.Foà, J.S.Bajaj y N.L.Foà, eds.), Springer Verlag, New York, pp 143, 1977.

HOLST, J.J. Diabetologia 11 : 211 , 1975.

- HOWELL, S.L. , C. HELLERSTROM y M TYHURST. Horm. Metab. Res. 6:267, 1974.
- HUGGETT, A.S.G. y D.A. NIXON. Lancet 2: 368 , 1957.
- HUNTER, W.M. y F.C. GREENWOOD. Nature 194 : 495 , 1962.
- ITO, S. y S. KOBAYASHI. Arch. Histol. Jap. 39 : 193 , 1976.
- JACOBSEN, H. , A. DEMANDT, A.J. MOODY y F. SUNDBY. Biochem. Biophys. Acta. 493 : 452, 1977.
- KENNY, J. J. Clin. Endocrinol. 15 : 865 , 1955.
- KENT, G.C. En : " Comparative anatomy of the vertebrates ", St. Louis Mosby, pp 250 , 1969.
- KOBAYASHI. S. y T. FUJITA. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 100 : 340, 1969.
- KOBAYASHI, S. , T. FUJITA y T. SASAGAWA. Arch. Histol. Jap. 31 :477 1970).
- KOBAYASHI, S. , T. FUJITA y T. SASAGAWA. Arch. Histol. Jap. 32: 428, 1971.
- KNUDSEN, J.B. , J.J. HOLST , S. ASNOES y A. JOHANSEN . Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect A. 83 : 741 , 1975.
- KIIO, J.F. y P. GRFENGARD. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 64 : 1349, - 1969.
- LAGUESSE, M.E. Compt. Rend. Soc. Biol. 45 : 819 , 1893
- LANE, M.A. Am. J. Anat. 7 : 409 , 1907.
- LAWRENCE, A.M. , L. KIRSTEIN , S. HOJVAT , S. RUBIN y V. PALOYAN. Clin. Res. 23 : 563A , 1975.

LAWRENCE, A.M. , S. TAN , S. HOJVAT y L. KIRSTEIN. Science 195:
70, 1977.

LAWRENCE, A.M. , S. TAN, S. HOJVAT , L. KIRSTEIN y J. MITTON.
Metabolism 25 : 1405, 1976.

LARRSON, L.I. , J. HOLST , R. HAKANSON y F. SUNDLER. Histochemis-
try. 44 : 281 , 1975

LECLERCQ,- MEYER, V. , J. MARCHAND y W.J. MALAISSE. Diabetologia
12 : 531 , 1976.

LE DOUARIN, N.M. y M.B. TEILLET. J. Embryol. Exp. Morph. 30 : 31,
1973.

LEFEBVRE, P. En : " Glucagón:molecular physiology,clinical and thera-
peutic implications" (P.Lefebvre y R.H.Unger, eds.). Pergamon Press,
Oxford, pp 109,1972.

LEFEBVRE, P. y A.S. LUYCKX. Endocrinology 103 : 1579 , 1978.

LEMAIRE, S. , G. PELLETIER y F. LABRIE. J. Biol.Chem. 246 : 7303,
1971.

LIKE, A.A. y L. ORCI. Diabetes 21 : 511 , 1971.

LINN, M.C. , D.W. WRIGHT , V.J. HRUBY y M. RODBELL. Biochemistry
14 : 1559 , 1975a.

LINN - HSIANG, M. y E. POTTER. Arch. Path. 74 : 439 , 1962.

LINDSEY, C. , G. FALOONA y R.H. UNGER. JAMA 229 : 1771 , 1974.

LUYCKX, A.S. y P. LEFEBVRE. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133 : 524,
1970.

MACHINO, M. , T. ONDE y H. SAKUMA. Electron Micr. 15 : 249, 1966.

MAENO, H. , E.M. JOHSON y P. GREENGARD. J. Biol. Chem. 246:134
1971.

- MAKMAN, M.H. y E.W. SUTHERLAND. *Endocrinology*. 75 : 127, 1964.
- MALETTE, L.E. , J.H. EXTON y C.R. PARK. *J. Biol. Chem.* 244 : 5713, 1969.
- MARKUSSEN, J. y F. SUNDBY. En " *Protides of the biological fluids*". (H. Peeters, ed.). Pergamon Press, Oxford. pp 471, 1970
- MASHITER, K. , P.E. HARDING , M. CHOU , G.D. MASHITER, J. STOUT , D.D. DIAMON y J.B. FIELD. *Endocrinology* 96 : 678, 1975.
- MATSUYAMA, T. y P.P. FOA. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 147 : 97, 1974.
- MATSUYAMA, T. , W. HOFFMAN , J. DUNBAR, N.L. FOA y P.P. FOA. *Horm Metab. Res.* 7 : 452, 1975.
- Mc GARRY, J.D. y D.W. FOSTER. *Am. J. Med.* 61 : 9, 1976.
- Mc LEAN, P. y F. NOVELLO. *Biochem. J.* 94 : 410 , 1965.
- MILLER, M.R. *Diabetes* 9 : 318, 1960.
- MISUGI, K. , N. MISUGI , J. SOTOS y B SMITH. *Arch. Pathol.* 89 : 208, 1970.
- MOODY, A.J. , H. JACOBSEN y F. SUNDBY. En : " *Gut hormones*" (S.R. Blomm, ed,). Churchill Livingstone, Edinburgh. pp 369, 1977.
- MULLER, M. , G.R. FALOONA y R.H. UNGER. *J. Clin. Invest.* 50 : 1992, 1971.
- MULLER, M. , G.R. FALOONA y R.H. UNGER. *Am J. Med.* 54 : 52, 1973.
- MUNGER, B.L. *Lab. Invest.* 11 : 885, 1962.
- MUÑOZ-BARRAGAN, L. , E. BLAZQUEZ , G.S. PATTON , R.E. DOBBS y R.H. UNGER. *Am. J. Physiol.* 231 : 1057, 1976

- MUÑOZ-BARRAGAN, L. , C. RUFENER , C.B. SRTKANT , R.E. DOBBS , W.A. SHANON, Jr. , D. BAETENS y R.H. UNGER. Horm. Metab. Res. 9 : 37, 1977.
- MURLIN, J.R. , H.D. CLOUGH , C.B.F. GIBBS y A.M. STOKES. J. Biol. Chem. 56 : 253, 1923.
- NOE, B.D., C.A. BASTE y G.E. BAUER. J. Cell. Biol. 74 : 589, 1977.
- NOE, B.D. En : " Glucagón : Its role in physiology and clinical medicine " (P.P.Foà, J.S.Bajaj y N.L. Foà, eds.). Springer- Verlag, New York. pp 31 , 1977.
- NOE, B.D. y G.E. BAUER. Endocrinology 89 : 642, 1971.
- NOE, B.D. y G.E. BAUER. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142 : 210, 1973.
- NOE, B.D. y G.E. BAUER. Endocrinology 97 : 868, 1975.
- NOE, B.D. , G.E. BAUER , M.W. STEFFES , D.E.R. SUTHERLAND y J.S. NAJARIAN. Horm. Metab. Res. 7 : 314, 1975.
- NONAKA, K. , H. TOYOSHIMA , T. YOSHIDA , T. MATSUYAMA , S. TARUI y M. NISHIKAWA. En : "Glucagón : Its role in physiology and clinical medicine " (P.P.Foà, J.S.Bajaj y N.L.Foà, eds.). Springer Verlag, New York, pp 663, 1977.
- NOTTEY, J.J. y G. ROSSELIN. C.R.Acad.Sci. (Paris) 273 : 2118, 1971.
- O'CONNOR, K.J. , A. GAY y N.R. LAZARUS. Biochem J. 134 : 473, 1973.
- O'CONNOR, K.J. y N.R. LAZARUS. Diabetologia 10 : 381, 1974.
- O'CONNOR, K.J. y N.R. LAZARUS. Biochem. J. 156 : 279, 1976.
- OPPENHEIMER, J.H. , H.L.SCHWARTZ , W. DILLMAN y M.I. SURKS. Biochem. Biophys. Res. Com. 55 : 544, 1973.
- ORCT, L. , D. BAETENS , M. RAVAZZOLA , F. MALAISSE - LAGAE , M. AMHERDT y C. RUFENER. En : " Endocrine gut and pancreas " (F. Fujita, ed.)

Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, pp 73, 1976.

ORCI, L. ,MALAISSE - LAGAE, M. AMHERDT , M. RAVAZZOLA , A. WEISSWANG
GE , R.E. DOBBS , A. PERRELET y R.H. UNGER. J. Clin. Endocrinol. Me-
tab. 41 : 841 , 1975.

ORCI, L. , F. MALAISSE - LAGAE , M. RAVAZZOLA , C. ROUILLER , A.E.
RENOLD , A. PERRELET y R.H. UNGER. J. Clin. Invest. 56 : 1066, 1975.

ORCI, L. , R.H. UNGER y A.E. RENOLD. Experientia 29 : 1015, 1973.

OSTENSON, C.G. , A. ANDERSSON , S.E. BROLIN , B. PETTERSSON y C.
HELLERSTROM. En : " Glucagón : Its role in physiology and clinical
medicine " (P.P.Fôa, J.S.Bajaj y N.L.Foà , eds.), Springer Verlag,
New York, pp 243, 1977.

PAGLIARA, A.S. , S.N. STILLINGS , M.W. HAYMOND , R.A. HOVER y F.M.
MATSCHEFSKY. J. Clin. Invest. 55 : 244, 1975

PANSKY,B., E.L. HOUSE y L.A.CONE. Diabetes , 14 : 325, 1965.

PARK, C.R. y J.H. EXTON. En: " Glucagón:molecular physiology.clinical
and therapeutic implications". (P.Lefebvre y R.H.Unger, eds.). Per-
gamon Press, Oxford. pp 77, 1972.

PARRILLA, R. , J. GOMEZ-ACEBO y J.L.R.CANDELA. J. Ultrastr. Res. 26:
1, 1969.

PEARSE, A.G.E. Vet. Rec. 79 : 587, 1966b.

PEARSE, A.G.E. J. Histochem. Cytochem. 17 : 303, 1969.

PEARSE, A.G.E. En: " Subcellular organization and function in endo-
crine tissues " (H.Heller y K.Lederis, eds.). Univ. Press., Cambrid-
ge, pp543, 1971.

- PEARSE, A.G.E. , J.M. POLAK y C.M. HEATH. Diabetologia 9 : 120, 1973.
- PENHOS, J.C. , J. DAUNAS , M. REITMAN y R. LEVINE. Diabetes 15: 740, 1966.
- PENHOS, J.C. , M. EZEQUIEL y A. LEPP. Diabetes. 24 : 634, 1975.
- PETERSEN, K.G. , P. HEILMEYER y L. KERP. Diabetologia 11 : 21 . 1975.
- PICTET, R. , W.R. CLARK , W.J. RUTTER y R.H. WILLIAMS. Diabetes 18 ; Suppl. 1 : 321, 1969.
- POFFENBARGER, P.F. , W.C. CHICK , R.L. LAVINE , J.S. SOELDNER y J.H. FLEWELLING. Diabetes 20 : 677, 1971.
- PEARL, S.L. y L.R. CHASE. Excerpta Médica. International Congress Series. 256 : 201, 1972.
- POLAK, J.M. , I. COULLING , S.R. BLOOM y A.G.E. PEARSE. Scand. J. Gastroenterol. 6 : 739 , 1971b.
- RAVAZZOLA, M. , A. SIPERSTEIN , A.J. MOODY, F. SUNDBY , H. JACOBSEN y L. ORCI. Endocrinology 105 : 499, 1979.
- RAVAZZOLA, M. , A. SIPERSTEIN , A.J. MOODY , F. SUNDBY y H. JACOBSEN. Life Science 25 : 287, 1979.
- RAVAZZOLA, M. , A. SIPERSTEIN , A.J. MOODY , F. SUNDBY y H. JACOBSEN. Endocrinology. 105 : 499, 1979.
- RENOLD, A.E. Diabetes 21 , Suppl. 2 : 619, 1971.
- RHOTEN, W.B. Gen Com. Endocrinol. 20 : 474, 1973.
- RODBELL, M. , L. BIRNBAUMER , S.L. POHL y F. SUNDBY. Proc. Natl. Acad Sci. USA. 68 : 909 ,1971d.

- RODBELL, M. , H.H.J. KRANS , S.L. POHL y L. BIRNBAUMER. J. Biol. Chem. 246 : 1872 , 1971a.
- RODBELL, M. y C. LONDON. -Metabolism 25 (Suppl 1) : 1347, 1976.
- RUBIN, C.S. , J.A. ERLICHMAN y O.M. ROSEN. J. Biol. Chem. 247 : 36 , 1972.
- RUBIN, C.S. y O.M. ROSEN. Ann. Rev. Biochem. 44: 831 , 1975.
- SAGGERSON, E.D. , S.R. SOORANNA y R.D. HARPER. Biochem. Soc. Trans. 5 : 900 , 1977.
- SAKATA, K. , S. HAYANO y H.A. SLOUITER. Am. J. Physiol. 204 : 1127, 1963.
- SAMUELS, H.H. , J.S. TSAI y R. CINTRON. Science 181 : 1253 , 1973.
- SHIBASAKI, S. y T. ITO. Arch. Histol. Jap. 31 : 119 , 1969.
- SHIMAZU, T. y A. AMAKAWA. Biochem Biophys. Acta . 165 : 335, 1968.
- SILVERMAN, H. y J.C. DUNBAR. Bull. Sinai Hosp., Detroit. 22 : 192, 1974.
- SMITH, P.H. Gen. Comp. Endocrinol. 26 : 310 , 1975.
- SOLCIA, E. , G. VASALLO y C. CAPELLA. En : "Origin, chemistry, physiology and pathophysiology of the gastrointestinal hormones " (W. Crentzfeldt, ed.). Schattauer, Stuttgart, pp 3 , 1970.
- SOMAN, V. y P. FELIG. Clin. Res. 25 : 401A, 1975
- STARKEY, R.H. , S. COHEN y D.N. ORTH. Science 189 : 800, 1975.
- STAIB, A. , L. SINN y O.K. BEHRENS. Science 117 : 628 , 1953.
- STAUB, A. , L. SINN y O.K. BEHRENS. J. Biol. Chem. 214 : 619, 1955.
- SUNDLER, F. , J. ALUMETS , J. HOLST , L.I. LARRSON y R. HAKANSON. Histochemistry 50 : 33, 1976.

- SUNDBY, F. , H. JACOBSEN y A.S. MOODY. Horm. Metab. Res. 8 : 366, 1976.
- SUTHERLAND, E.W. y C. De DUVE. J. Biol. Chem. 175 : 633, 1948.
- SWANN, J.C. y G.G. HAMMES. Biochemistry 8 : 1, 1969.
- TAGER, H.S. y J. MARKESE. J. Biol. Chem. 254 : 2229, 1979.
- TAGER, H.S. y D.F. STEINER. Proc. Natl. Acad. Sci. 70 : 2321 , - 1973.
- TAGER, H.S. y D.F. STEINER. Annu. Rev. Biochem. 43 : 509, 1974.
- TANIZAWA, Y y H. FUJITA. Arch. Histol. Jan. 26 : 535 , 1966.
- TATEUCHI, T. , T. TAKEMOTO , T. TANI y T. MIWA. Lancet 2 : 920, 1973.
- THOMAS, T.B. Anat. Record. 76 : 1, 1940.
- TOMBES, A.S. En: " An introduction to invertebrate endocrinology" New York, Acad. Press, pp 1, 1970.
- TRAKATELLIS, S. , K. TADA , K. YAMAJI y P. GARDIKI - KOUIDOU. Biochem. 14 : 1508 , 1975.
- TUNG, A.K. Horm. Metab. Res. 5 : 416, 1973.
- TUNG, A.K. Can. J. Biochem. 52 : 1081 , 1974.
- TUNG, A.K. , S.A. ROSENZWEIG y P.P. FOA. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 153 : 344 , 1976.
- TUNG, A.K. y F. ZEREGA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 153 : 344, 1976.
- UNGER, R.H. En : " Glucagón, molecular physiology, clinical and therapeutic implications " (P.Lefebvre y R.H.Unger, eds.), Pergamon

Press, New York. pp 245 , 1972.

UNGER, R.H. En : " Methods in investigative and diagnostic endocrinology " (S.A.Berson y R.S. Yalow, eds.). North Holland Publishing Co., Amsterdam. Vol. 28 , pp 906 , 1973.

UNGER, R.H. Metabolism. 23 : 581 , 1974.

UNGER, R.H. Diabetes 25 : 136 , 1976.

UNGER, R.H. , A.M. EISENTRAIT , S. KELLER , H.C. LANZ y L.L. MADISON. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 102 : 621 , 1959.

UNGER, R.H. , H. KETTERER , J. DUPRE y A.M. EISENTRAIT. J. Clin. Invest. 46 : 630 , 1967.

UNGER, R.H. , H. KETTERER y A.M. EISENTRAIT. Metabolism 15 : 865, 1966.

VALVERDE, I. , D. RIGOPOULOU , J. MARCO , G.R. FALOONA y R.H. UNGER. Diabetes 19 : 614 , 1970.

VASALLO, G. , C. CAPELLA y E. SOLCIA. Z. Zellforsch. 118 : 49 , 1971.

VAUGHAN, M. y D. STEINBERG. J. Lip. Res. 4 : 193 , 1963.

VON DENFFER, H. Histochemie. 21 : 338 , 1970.

VRANIC, M. , S. PEK y R. KAWAMORI. Diabetes 23 : 905 , 1974.

VRANIC, M. , C. YIP , K. DOI , L. LICKLEY , S. MORITA y G. ROSS. En : " Glucagón : Its role in physiology and clinical medicine " (P.P.Foa, J.S.Bajaj y N.L.Foa, eds.). Springer Verlag, New York. pp403, 1977.

WADDELL, W.R. , W.R. COPPINGER y R.W. LOUGHRY. Ann. Surg. 168 : 641, 1968.

- WALSH, D.A. , J.P. PERKINS y E.G. KREBS. J. Biol. Chem. 243 : 3763 , 1968.
- WALTON, G.M. y G.N. GILL. Biochemistry 12 : 2604 , 1973.
- WEIR, G.C. , S.S. KNOWLTON , R.F. ATKINS , K. Mc KENNAN y D.B. MARTIN. Diabetes 25 : 275 , 1976.
- WELLMANN, K.F. , B.W. VOLK y P. BRANCATO. Lab. Invest. 25 : 97, 1971.
- WERNER, P.L. y J.P. PALMER. Diabetes 27 : 1005 , 1978.
- WILLIAMSON, D.H. En : " Diabetes " (W.J.Malaisse y J.Pirart, eds.) Elsevier, New York , pp 271 , 1974.
- WILLIAMSON, J.R. , E.T. BROWNING , R.G. THURMAN y R. SCHOLTZ. J. Biol. Chem. 244 : 5055 , 1969.
- WRIGHT, M. , T. MAKULU y D. POSEY. Diabetes 17 : 513 , 1968.
- WUNCH, E. , E. JAEGER y R. SCHARF. Chem. Ber. 101 : 3664 , 1968.
- YANAIMARA, N. , C. YANAIMARA , T. NISHIDA. , T. HIRAIWA. , T. KANETO y K. IMAGAWA. Second International Symposium on hormonal receptors in digestive tract physiology. Montpellier, Francia. Mayo 3-5, 1979.
- YAMAMOTO, K.R. y B.M. ALBERTS. Ann. Rev. Biochem. 45 : 721 , 1976.