

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la secreción hormonal y metabolismo de la
glucosa en Islotes de Langerhans aislados durante el ayuno
prolongado : efecto del ácido 2-bromoesteárico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Elena Vara Ameigeiras

DIRECTOR:

Jorge Tamarit

Madrid, 2015



VAN
est

ESTUDIO DE LA SECRECIÓN HORMONAL Y METABOLISMO
DE LA GLUCOSA EN ISLOTES DE LANGERHANS AISLADOS
DURANTE EL AYUNO PROLONGADO.
EFECTO DEL ACIDO 2-BROMOESTEARICO.

TESIS DOCTORAL



Elena VARA AMEIGEIRAS
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Madrid - 3

R. 26.425

V.º B.º

Jamain

E. Var. Vare

Quiero expresar mi sincero agradecimiento:

- Al Dr.D. Jorge Tamarit-Rodriguez, director de este trabajo, cuyas aportaciones y estimulo constante lo han hecho posible.
- Al Profesor Dr. D. Jorge Tamarit Torres, por las enseñanzas que de él he recibido y por su ejemplo.
- Al Profesor Dr. D. Angel Martín Municio, por su amabilidad al aceptar la ponencia de esta tesis.
- A Mary Cruz Garcia Martín e Isabel Roncero, por su colaboración y amistad.
- A Isabel Esteban, por el trabajo de mecanografía.
- A Xurxo Fernández Brea, por la realización de las gráficas.

INDICE

	Pag.
Introducción	1
Hipótesis de trabajo	22
Planteamiento experimental	26
Material y métodos	28
Resultados	101
Discusión	152
Conclusiones	160
Bibliografía	163

INTRODUCCION

I) Hipotesis sobre mecanismos de secreción.

A) Insulina.

La célula B de los islotes de Langerhans del páncreas endocrino ejerce la función específica de responder a la concentración extracelular de diversos metabolitos con un incremento de la secreción de insulina. Esta respuesta insulinosecretora está limitada cualitativamente, dado que sólo unos pocos metabolitos son universalmente reconocidos como estimuladores directos ("iniciadores") de la secreción: D-glucosa, D-manosa, D-gliceraldehído, dihidroxiacetona, D-N-acetil-glucosamina, D-glucosamina, L-leucina e inosina (Hedekov, 1980; Ashcroft, 1980). La D-glucosa (denominada glucosa en adelante) es el metabolito de mayor potencia insulinosecretora y de mayor importancia fisiológica.

La respuesta insulinosecretora está también limitada cuantitativamente: la relación entre concentración extracelular de glucosa y la velocidad de secreción de la insulina sigue una curva sigmoide con un valor umbral a 4-5 mM. La K_m de este proceso secretor es 6-8 mM y la velocidad máxima de secreción alrededor de 20-27 mM (Ashcroft y cols, 1972; Hellman y cols, 1974; Malaisse y cols, 1967).

Existen agentes que no son capaces por sí mismos de estimular la secreción de insulina pero potencia el efecto de la glucosa disminuyendo K_m o aumentando V_m como D-fructosa, L-arginina, glucagón, D-N-acetil-glucosamina, etc (Ashcroft y cols, 1973; Hedekov, 1980)

Estos hechos sugieren la existencia de un mecanismo complejo

responsable del mecanismo de secreción de insulina que puede desglosarse teóricamente en tres procesos:

- 1.- Reconocimiento del estímulo.
- 2.- Sistema de acoplamiento entre estímulo y secreción.
- 3.- Liberación de insulina.

1.- El proceso de reconocimiento de la concentraciones extracelulares de glucosa por la célula B se interpreta actualmente en base a dos hipótesis fundamentales, sobre las que se encuentra una discusión detallada en revisiones recientes (Malaise y cols, 1979; Hedekov, 1980; Ashcroft, 1980) y de las que hacemos un resumen a continuación:

a) Modelo del centro regulador. La glucosa es considerada como un modificador alostérico de un supuesto "glucorreceptor", probablemente situado en la membrana celular y de naturaleza proteica. La combinación de la glucosa con el receptor induciría un cambio conformacional en este que iniciaría todos los mecanismos englobados en el sistema de acoplamiento entre estimulo y secreción (variaciones de la permeabilidad de la membrana celular al K^+ y Ca^{2+} y las consiguientes alteraciones del potencial de membrana, activación del sistema adenil-ciclasa, etc.)

Esta hipótesis surgió de la observación de que los niveles intracelulares de diversos metabolitos de la glucosa (via glicolitica) en las células B permanecen inalterados minutos después de que la secreción de insulina hubiera sido significativamente estimu

lada por glucosa (Matschinsky y cols., 1971). Estos resultados no han podido ser reproducidos por otros autores (Hedeskov, 1980), pero estimularon la búsqueda (hasta hoy infructuosa) de un análogo de la glucosa que estimulara la secreción de insulina sin ser metabolizado por las células B o que inhibiera la secreción, estimulada por glucosa, sin inhibir su metabolismo.

La evidencia experimental más importante en favor de este modelo proviene de estudios recientes sobre la especificidad anómerica de diferentes efectos de la glucosa sobre la célula B y es discutido ampliamente en una revisión actual (Niki y Niki, 1980). El anomero α de la glucosa es un estimulador más potente de la secreción de insulina que el anomero β pero también el anomero α es más rápidamente metabolizado debido a la preferencia anómerica α de la fosfoglucosa isomerasa. Sin embargo, la α -D-manosa es más potente estimulador de la secreción de insulina que el anomero β aunque la fosfomanosa isomerasa favorecería teóricamente (no demostrado en células B) el metabolismo del anomero β . Este último resultado apoya la existencia de un receptor específico para los monoglicidos iniciadores de la secreción, concediendo un valor secundario al metabolismo de los azúcares en el proceso de reconocimiento de los mismos por la célula B. Esta evidencia experimental es sin embargo pequeña en comparación con la avalancha de resultados experimentales coleccionados en los últimos diez años en favor del modelo alternativo que se expone a continuación.

b) Modelo del centro para un sustrato. El metabolismo de la

glucosa en las células B proporcionaría las señales intracelulares (aumento específico de intermediarios y/o cofactores de la vía glicolítica) que pondrían en marcha el proceso de acoplamiento entre estímulo y secreción. En este modelo, el "glucorreceptor" estaría constituido por un enzima o sistema enzimático que catalizaría la etapa limitante del metabolismo en la célula B y que no sería necesariamente el mismo para todos los monosacáridos o derivados capaces de iniciar la secreción (Ashcroft, 1980; Hedekov, 1980).

Esta hipótesis, cronológicamente más antigua, fue enunciada como consecuencia de la observación experimental de que solo estimulaban significativamente la secreción de insulina aquellos monosacáridos más fácilmente metabolizados por los tejidos, como glucosa y manosa (Grotsky y cols., 1963). Esta abstracción ha sido ampliamente confirmada en estudios paralelos de la capacidad insulinosecretora y metabólica de monosacáridos y derivados y el efecto de inhibidores metabólicos específicos, que se recogen en las referencias de revisión ya citadas. En el caso de la glucosa, la relación entre su concentración extracelular y velocidad de metabolismo (utilización u oxidación) es de tipo sigmoide, con valores de K_m y V_m similares a los encontrados para la cinética de secreción de insulina anteriormente referida (Malaisse y cols., 1979).

Esta hipótesis, originalmente enunciada para explicar la capacidad insulinosecretora de los monosacáridos y derivados mediante la producción de un metabolito específico (glicolisis), ha sido

do posteriormente ampliada para abarcar el mecanismo de la secreción estimulada por otro tipo de metabolitos como la L-leucina, ácido ceto-isocaproico, etc. En general, el resultado metabolico producido por agentes iniciadores de la secreción, sería el aumento del poder reductor en el citoplasma (NAD(P)H) o la generación de hidrogeniones (Malaisse y cols., 1979; Ashcroft, 1980), que supuestamente modificarían la permeabilidad de la membrana celular en último término con los consiguientes movimientos iónicos, especialmente de calcio, que desencadenarían la liberación de insulina.

2.- El sistema de acoplamiento entre estímulo y secreción parece ser común para una gran variedad de sistemas secretores y se interpreta, por analogía con el acoplamiento entre estímulo y contracción muscular, como el conjunto de mecanismos reguladores que conducen a la elevación de la concentración de calcio en algún compartimiento (citoplasma ?) fundamental para el desencadenamiento de la descarga hormonal (Douglas, 1968; Rubin, 1970).

El estudio de los flujos de entrada y salida de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ por islotes aislados, así como la medida del contenido del isotopo o de $^{40}\text{Ca}^{2+}$ en el equilibrio demuestra que la glucosa aumenta el contenido neto de calcio del tejido (Malaisse y cols., 1978; Tamarit-Rodríguez, 1978). No está claro si este aumento se debe a un incremento en la velocidad de entrada de calcio, a una disminución de su salida o a una redistribución intracelular. Sin embargo, se postula que en cualquier caso se produciría un aumento del

calcio citoplasmico que desencadenaria el proceso de liberación de insulina (Malaisse y cols., 1978).

El potasio parece también estar directamente implicado en el proceso de acoplamiento entre estímulo y secreción. Brevemente, la glucosa parece disminuir la permeabilidad de la membrana celular al potasio (Sehlin y Täljedad, 1975), contribuyendo a una despolarización parcial de la misma hasta un valor determinado desde el que se producen variaciones rápidas y transitorias (picos o "spikes") atribuibles a la apertura de canales de calcio dependientes del potencial de membrana (Boschero y Malaisse, 1979; Herchuelz y cols., 1980; Ribalet y Beigelman, 1980).

El efecto específico de la glucosa sobre los movimientos iónicos referidos no es reproducible por análogos estructurales no metabolizables (L-glucosa; 3-O-metil-glucosa), es bloqueado por inhibidores metabólicos (D-manoheptulosa) y muestra una buena correlación con el contenido celular en NAD(P)H en diversas situaciones experimentales (Malaisse y cols, 1978; Ashcroft, 1980). Por todo ello se ha postulado que el NAD(P)H generado en el metabolismo de la glucosa podría modificar los sistemas "ionofóricos" de la membrana de las células B responsables del transporte mediado pasivo del calcio o potasio.

Otra alternativa para el calcio consistiría en la regulación de su concentración citoplasmica mediante un transporte mitocondrial activo, modulado por algunos metabolitos de la glucosa (Ashcroft, 1980).

La glucosa estimula la producción de AMP cíclico (cAMP) en las células de los islotes, efecto que depende de la presencia de calcio extracelular y de la integridad del metabolismo de la glucosa (Hedeskov, 1980). Sin embargo, el hecho de que el cAMP exógeno no sea capaz de iniciar la secreción ni de reproducir los efectos de la glucosa sobre los flujos de calcio constituye evidencia en contra del cAMP como mensajero intracelular fundamental de la glucosa en el proceso de acoplamiento entre estímulo y secreción (Malaisse y cols., 1979). Pero el cAMP puede constituir una señal importante para la ampliación o potenciación del efecto propio de la glucosa ya que su administración exógena (dibutiril-cAMP) potencia la respuesta insulinosecretora iniciada por el monosacárido (Malaisse y cols., 1979).

3.- El proceso de liberación de insulina se realiza mediante el mecanismo de exocitosis, consistente en el desplazamiento de los granulos de secreción hacia la membrana celular, su fusión con esta y posteriormente una "fisión" localizada de la membrana con expulsión del contenido granular al exterior. Se discute el papel que los microtubulos y microfilamentos pueden tener en el desplazamiento de los granulos hacia la membrana celular y no se conoce claramente el efecto del calcio y cAMP sobre sus proteínas componentes (tubulina y actina ?) que podría producirse por acción de proteína: quinasas específicas (Hedeskov, 1980).

B- GLUCAGON

Esta hormona es sintetizada por las células A de los islotes de Langerhans. Su escasa representación en el islote (25%) hizo difícil el estudio correlativo de su metabolismo y secreción. Recientemente, la obtención de islotes ricos en células A mediante tratamiento de ratas y cobayas con estreptozotocina hizo más fácil este estudio.

Las células A responden a una elevación de la concentración extracelular de glucosa con una disminución de su secreción "basal" (concentraciones 0-5 mM de glucosa). Esta respuesta requiere la presencia de células B o la adición exógena de insulina y va acompañada de un aumento de la velocidad de utilización de glucosa y de la concentración de ATP (Östenson y cols., 1979; Matschinsky y cols., 1976).

La secreción de glucagón puede ser modificada por distintos inhibidores metabólicos. El malonato, yodoacetato y dinitrofenol disminuyen los niveles de ATP y aumenta la velocidad de secreción de glucagón por islotes ricos en células A (Östenson y cols., 1980). Todos estos datos sugieren que la respuesta de las células A es mediada de alguna forma por las células B próximas a ellas en los islotes de Langerhans. La presencia de insulina estimularía el metabolismo de la glucosa provocando un aumento de la concentración de ATP que, a su vez, directa o indirectamente, regularía la velocidad de secreción. Parece existir una correlación inversa entre la velocidad de secreción y el metabolismo de la glucosa,

contrariamente a lo que ocurre en la célula B.

La presencia de ácidos grasos, tales como palmitato y octanoato, inhibe la secreción de glucagón; esta inhibición puede ser abolida por la adición de malonato ó 2,4, dinitrofenol que impiden la producción de energía a partir de ácidos grasos (Edwards y Taylor, 1970). Por otra parte, la secreción de glucagón inducida por arginina es inhibida cuando se añade octanoato al medio de incubación (Edwards y Taylor, 1970). Estos datos sugieren que los ácidos grasos también pueden jugar un papel importante en la secreción de glucagón.

C- SOMATOSTATINA

La somatostatina es un tetradecapeptido aislado en primer lugar en el hipotálamo (Brazeau y cols., 1973). Posteriormente se demostró su presencia en otras partes del sistema nervioso central y periférico, así como en células endocrinas, sugiriendo se un doble papel como hormona y como modulador de funciones nerviosas. Recientemente se ha descrito, mediante técnicas de inmunofluorescencia y radioinmunológicas, que la somatostatina es tá presente en las células D de los islotes de Langerhans (Luft y cols., 1979; Arimura y cols., 1975; Vale y cols., 1975; Orci y cols., 1975), alcanzando concentraciones superiores a las encontradas en el hipotálamo al menos en lo que se refiere a la rata (Patel y Reichlin, 1978) y que es segregada al espacio extracelular en respuesta a determinados estímulos (Hermansen, 1980).

El porcentaje de células D en los islotes de Langerhans es todavía menor que el de células A (10%) y esto, unido a su reciente descubrimiento, hace que no dispongamos de ningún dato característico sobre su metabolismo que permita sacar alguna conclusión sobre su mecanismo de secreción.

Diversos autores estudiaron la secreción de somatostatina por páncreas aislado y perfundido de rata o por islotes aislados y perfundidos. De forma general puede afirmarse que la secreción pancreática de somatostatina es estimulada por todos aquellos metabolitos que estimulan también la secreción de in

ulina (Hermansen, 1980).

La distribución de los distintos tipos celulares dentro del islote no es aleatoria (Orci y Unger, 1975; Orci y cols., 1976). Las células A se localizan en una capa periférica constituida por una ó tres hileras celulares; por dentro de esta se encuentra una capa incompleta de células D y el núcleo del islote está constituido por una masa homogénea de células B.

La presencia en los islotes pancreáticos de células D, en yuxtaposición a las células B y en especial a las células A, plantea la posibilidad de que esta hormona ejerza una acción local (paracrina) sobre las secreciones de insulina y glucagón. Larsson y cols. (1979) sugieren que la célula D podría regular las secreciones de las células vecina a través de la secreción de somatostatina.

Se hicieron diversos estudios "in vivo" neutralizando hormonas pancreáticas mediante anticuerpos; los resultados obtenidos indican que la neutralización de una de las hormonas pancreáticas modifica la secreción de las otras hormonas, lo que parece indicar la existencia de un sistema paracrino que controlaría los procesos de secreción dentro del islote (Arimura y cols., 1978; Patel y cols., 1979).

METABOLISMO DE LIPIDOS EN LOS ISLOTES

1.- Capacidad de oxidación de ácidos grasos exógenos.

Recientes estudios demostraron que los ácidos grasos pueden jugar un papel importante en el metabolismo celular de los islotes pancreáticos, pero su papel en el metabolismo oxidativo total de la célula B es poco conocida.

Se demostró en el islote la presencia de distintos enzimas importantes en la síntesis de lípidos, como glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, ATP citrato liasa, isocitrato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa (Brolin y Berne, 1967; Berne, 1975). Por otra parte Hammar y Berne (1970) demostraron cuantitativamente la presencia en los islotes de 3 hidroxiacil CoA deshidrogenasa, enzima necesario para la degradación de los ácidos grasos.

Islotes aislados de ratones obesos hiperglicémicos son capaces de oxidar ácidos grasos y cuerpos cetónicos (Berne, 1975) y su velocidad de oxidación sugiere que estos sustratos pueden tener un papel importante en el metabolismo energético total del islote.

La velocidad de oxidación de los ácidos grasos depende de su concentración en el medio. Cuando la concentración de palmítico se aumenta, su velocidad de oxidación aumenta gradualmente siendo mayor este incremento a concentraciones de palmítico menores de 1mM (Berne, 1975). Analogamente, la oxidación de octanoato también aumenta significativamente cuando se aumenta su concentra

ción de 0,5 a 5 mM (Berne, 1975).

Los ácidos grasos no modifican la velocidad de oxidación de la glucosa (Berne, 1975). Esto parece contradecirse con el hecho de que se detectase en los islotes una fosfofructoquinasa capaz de inhibirse por citrato y ATP (Matschinsky y cols., 1968) sugiriendo un posible ciclo glucosa-ácidos grasos en las células del islote (Randle y cols., 1965). Sin embargo, la concentración global de citrato en los islotes no parece ser afectada por los ácidos grasos (Hellman e Idahl, 1972; Matschinsky y cols., 1968).

2.- Efecto de la glucosa sobre el metabolismo de lípidos.

Como ya se vió, los ácidos grasos no modifican la velocidad de oxidación de la glucosa; por el contrario, cuando la concentración de esta en el medio se eleva, la velocidad de oxidación del palmitato se inhibe significativamente. El mecanismo de esta inhibición puede explicarse en parte, por el hecho de que concentraciones altas de glucosa estimulan la incorporación de palmitato a lípidos (Berne, 1975). Puede pensarse en una posible competencia entre los mecanismos de oxidación y esterificación, de forma análoga a lo que ocurre en otros tipos celulares (Ontko, 1972; Spector y Steinberg, 1965).

Parece que en situaciones de hiperglicemia la glucosa es preferida por los islotes como sustrato para la oxidación; los ácidos grasos son almacenados como triglicéridos o utilizados para incrementar la biosíntesis de fosfolípidos (Berne, 1981).

La tasa de incorporación de glucosa a lípidos representa una parte muy pequeña, aproximadamente un 3% de la cantidad de glucosa oxidada; altas concentraciones de glucosa estimulan la incorporación a lípidos totales en el islote a partir de ($U-^{14}C$) glucosa o ($U-^{14}C$) palmitato. El 96% de la radiactividad original incorporada a partir de ($U-^{14}C$) glucosa, lo hizo en forma de glicerol (Berne, 1975).

Cuando la concentración de glucosa en el medio es alta, tanto la glucosa como el palmitato se incorporan en forma de fosfolípidos y, en menor proporción, de triglicéridos (Berne, 1975). Esto está de acuerdo con las observaciones de Lenmark y Fex (1972) que encuentran una incorporación gradual de (^{32}P) a fosfolípidos estimulada por glucosa.

EFFECTO DEL AYUNO Y ACIDOS GRASOS SOBRE LA SECRECION DE INSULINA,
GLUCAGON Y SOMATOSTATINA.

A- INSULINA

1. Efecto del ayuno

Durante el ayuno las células B de los islotes de Langerhans se alteran perdiendo su respuesta insulinosecretora tanto "in vivo" como "in vitro". La secreción de insulina, en respuesta a la glucosa, se inhibe significativamente tras 24, 48 ó 72 horas de ayuno (Howell y cols., 1973; Idahl y cols., 1974; Hedekov y Capito, 1974; Levy y cols., 1976; Wolters y cols., 1977; Joost y cols., 1980) y desaparece completamente a los 5 ó 6 días (Matschinsky y cols., 1971).

El metabolismo de la glucosa también es afectado por el ayuno. La velocidad de oxidación disminuye tras 48 ó 72 horas de ayuno según algunos autores (Gerrit y cols., 1977; Malaisse y cols., 1976) o no se modifica tras 24 ó 48 horas según otros (Hedekov y Capito, 1975; Gerrit y cols., 1977). La utilización de glucosa está claramente disminuida tras 48 ó 72 horas (Hedekov y Capito, 1974; Wolters y cols., 1977) pero no tras 24 horas (Gerrit y cols., 1977). Sin embargo, cuando la concentración extracelular de glucosa es muy alta (70-100 mM) no hay diferencia en su utilización por islotes de ratas ayunadas o alimentadas, sugiriendo que el ayuno aumenta la K_m para la utilización de glucosa, pero la V_m no varia (Hedekov y Capito, 1974).

La secreción de insulina, inhibida durante el ayuno, puede

ser restaurada mediante inhibidores de la fosfodiesterasa (Hedeskov y Capito, 1974; Hedeskov y Capito, 1975; Howelly cols., 1973) lo que sugiere que las alteraciones de la secreción se deben a una disminución de la concentración de cAMP en la célula B (Hedeskov y Capito, 1975).

Los datos obtenidos respecto a las concentraciones iniciales de cAMP en el islote son contradictorios; algunos autores encuentran que durante el ayuno disminuyen los niveles basales de cAMP en islotes aislados de rata o ratón (Selawry y cols., 1973; Lavine y cols., 1975). Sin embargo, Gerrit y cols (1977) encuentran que el ayuno no parece afectar el contenido inicial de cAMP en islotes de rata y lo mismo encuentran Capito y Hedeskov (1974) en islotes de ratón.

Diversos autores demostraron que glucosa 16,7 mM induce un aumento de cAMP en islotes de ratas alimentadas (Bouman y cols., 1975; Capito y Hedeskov, 1975) pero esta respuesta de cAMP a la glucosa se inhibe en islotes de ratas ayunadas 48 horas (Bouman y cols., 1979; Gerrit y cols., 1979; Capito y Hedeskov, 1974), lo que sugiere que el defecto insulinoscretor durante el ayuno se debe a una disminución en la producción de cAMP. Sin embargo, el hecho de que el cAMP exógeno no sea capaz de iniciar la secreción contradice esta hipótesis (Malaisse y cols., 1979).

Por otra parte Gerrit y cols (1977) encuentran que en islotes de ratas ayunadas 24 horas el aumento de cAMP, en respuesta a la glucosa, está retrasado pero los niveles máximos de cAMP no varían a pesar de que la secreción de insulina está inhibida.

En resumen, no está claro si la inhibición de la secreción

de insulina durante el ayuno se debe a alteraciones en el metabolismo de la glucosa y/o a la concentración de cAMP ó a algún otro factor.

2. Efecto de los ácidos grasos

Los datos que se tienen sobre el efecto de los ácidos grasos sobre la secreción de insulina son contradictorios. Howell(1968) no encuentra ningún efecto del palmitato sobre la secreción de insulina en trozos de páncreas de rata; por el contrario, Montague y cols. (1968) demuestran un efecto estimulante del octanoato sobre la secreción de insulina en islotes aislados de rata. Malaisse y cols. (1968) demuestran este mismo efecto en páncreas aislado utilizando palmitato o β -hidroxibutirato, pero la secreción de insulina no se estimula cuando utilizan octanoato.

Por otra parte, Goberna y cols. (1974), utilizando páncreas perfundido de rata encuentran que el β -hidroxibutirato, acetoacetato y palmitato son capaces de estimular la secreción de insulina de forma transitoria, a bajas concentraciones de glucosa (5,5 mM), lo que está de acuerdo con los resultados de Campillo y cols. (1979) que encuentran que el ácido oleico produce un aumento rápido de la secreción de insulina en páncreas perfundido de rata, en ausencia de glucosa extracelular, volviendo rápidamente la secreción a niveles basales.

B-GLUCAGON

El ayuno origina una serie de cambios hormonales que afectan el metabolismo celular con vistas a la obtención de los sustratos necesarios para la producción de energía. Estos cambios en el metabolismo, directa o indirectamente, pueden alterar la secreción pancreática de glucagón.

Algunos autores sugieren que los ácidos grasos ejercen un papel regulador sobre la secreción de las células A "in vivo" tanto en animales (Luycks y cols., 1970) como en el hombre (Gerich y cols., 1974). Durante el ayuno los niveles de ácidos grasos están aumentados y estos podrían actuar como fuente de energía para la célula A (Luycks y cols., 1970).

Los datos experimentales obtenidos son contradictorios; por una parte Gerich y cols. (1974) encuentran que, en hombre, la secreción de glucagón en respuesta a arginina disminuye al aumentar los niveles de ácidos grasos; por el contrario, Andrews y cols. (1975) encuentran que la secreción de glucagón no se modifica al aumentar los niveles de ácidos grasos y triglicéridos en plasma, y lo mismo encuentra Muller (1976) en perros.

Los resultados obtenidos sobre el efecto del ayuno también son contradictorios. Buchanan y cols. (1969) usando ratas ayunadas 72 horas no encuentran diferencia significativa en la secreción de glucagón respecto a los controles y lo mismo le sucede a Oliver y cols. (1973). Por el contrario, Aguilar-Parada y cols. (1969) encuentran que la secreción de glucagón aumenta durante el ayuno

tanto en hombre como en rata y hamster (Merliss y cols., 1970; Vanlan y cols., 1974; Malaisse y cols., 1967)

Todos estos datos indican que la forma en que los ácidos grasos o el ayuno influyen sobre la secreción de glucagón permanece desconocida.

C-SOMATOSTATINA

Se sabe que el ayuno altera la secreción de somatostatina, aunque este fenómeno está poco estudiado.

Schusdziarra y cols. (1978) encuentran que el ayuno eleva significativamente los niveles de somatostatina en plasma, en perros. Sin embargo, otros autores (Kuzumi y cols., 1980; Shapiro y cols., 1979) encuentran que los niveles de somatostatina en plasma están disminuidos en ratas ayunadas sugiriendo que la actividad secretora de la célula D disminuye durante el ayuno.

Por otra parte Schauders y cols. (1979) observan que la secreción de somatostatina en islotes de rata, en respuesta a glucosa 10 ó 25 mM, no es alterada significativamente por el ayuno, pero la secreción en respuesta a glucosa 3,3 mM aumenta significativamente. Esto se contradice con los resultados obtenidos por Seino y cols. (1980) que encuentran que la secreción basal de somatostatina, en respuesta a glucosa 4 mM, en páncreas perfundido de rata, disminuye tras 48 horas de ayuno aunque la secreción en respuesta a arginina parece aumentar.

No está claro, hasta el momento, el mecanismo exacto por el cual se altera la secreción de somatostatina durante el ayuno. Dada la posible interrelación funcional entre los distintos tipos celulares (acción paracrina) del islote, las alteraciones en la secreción de somatostatina durante el ayuno, podrían deberse a variaciones en la secreción de insulina o de glucagón, o viceversa.

HIPOTESIS DE TRABAJO

HIPOTESIS DE TRABAJO

Durante el ayuno, la secreción de insulina en respuesta a la glucosa está alterada pero los mecanismos responsables de esta alteración no son bien conocidos.

Es bien conocido que durante el ayuno se incrementa la movilización de ácidos grasos del tejido adiposo tanto "in vivo" como "in vitro". En la célula muscular los ácidos grasos inhiben la glicolisis; se acepta generalmente que el mecanismo responsable de esta alteración es una inhibición de la fosfofructoquinasa y piruvato deshidrogenasa por el ácido cítrico y acetyl CoA producidos en exceso durante la oxidación de ácidos grasos (Newsholme y Start, 1973).

Es posible que en el ayuno las células de los islotes tengan una mayor dependencia de los ácidos grasos como sustratos metabólicos. Un aumento en la oxidación de ácidos grasos conduciría a una inhibición de la glicolisis (via ácido cítrico) y de la oxidación de la glucosa lo que implicaría una disminución en la secreción de insulina de acuerdo con la teoría metabólica (ver introducción, mecanismo de secreción).

Se sabe que los 2-bromoacil-derivados inhiben la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga (Chase y Tubbs, 1972); el 2-bromoestearato es capaz de restaurar el metabolismo de la glucosa en músculo de corazón de rata diabética (Randle, 1969) e inhibe la oxidación de ácidos grasos en islotes aislados (Berne, 1975). La inhibición de la oxidación de ácidos grasos con 2-bro

moestearato normalizaría el metabolismo de la glucosa en islotes de ratas ayunadas, lo que debería conducir a la restauración de la respuesta insulinosecretora durante el ayuno.

Los ácidos grasos estimulan de forma transitoria la secreción de insulina por páncreas de rata, en presencia de concentraciones subestimulantes de glucosa (Malaisse y cols., 1969; Goberna y cols., 1974; Campillo y cols., 1979) lo que aparentemente contradice la primera hipótesis. Se estudió el efecto del 2-bromoestearato sobre la acción insulino-trópica del ácido palmítico para investigar si este efecto transitorio se debe a alguna inhibición que pueda ser bloqueada por el 2-bromoestearato.

Las células A de los islotes de Langerhans responden a los aumentos en la concentración extracelular de glucosa, con una disminución de la secreción basal. Esta respuesta requiere la presencia de insulina y va acompañada de un aumento del metabolismo de la glucosa, existiendo una correlación inversa entre metabolismo de la glucosa y secreción.

Es posible que el aumento de la concentración de ácidos grasos durante el ayuno alteren el metabolismo de la glucosa en las células A haciendo desaparecer su efecto inhibitor sobre la secreción de glucagón. La restauración del metabolismo de la glucosa por el 2-bromoestearato normalizaría la respuesta de la célula A a la glucosa durante el ayuno.

Por otra parte, la demostración de la biosíntesis y secreción de somatostatina por las células D de los islotes de Langerhans

sugirió una posible acción reguladora local de esta hormona (acción paracrina) sobre la secreción de insulina y glucagón (Orci y Unger, 1975). Ello requiere que sea segregada en respuesta a estímulos fisiológicos y que su orden cronológico de respuesta sea distinto de las otras hormonas. Para intentar poner de manifiesto una posible acción paracrina entre las hormonas pancreáticas, se estudió simultáneamente la secreción de insulina, glucagón y somatostatina en islotes de ratas alimentadas y ayunadas 48 horas, así como su modificación por el 2-bromoestearato y los ácidos grasos.

PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

1. Estudio de la secreción de insulina, estimulada por glucosa, en islotes de ratas alimentadas y ayunadas 48 horas. Efecto del 2-bromoestearato y su comparación con el ácido esteárico.
2. Efecto de ácido palmítico sobre la secreción de insulina en islotes de ratas alimentadas en respuesta a distintas concentraciones de glucosa. Efecto del 2-bromoestearato sobre el efecto insulinosecretor del palmítico.
3. Estudio de la velocidad de oxidación de glucosa en islotes de ratas alimentadas y ayunadas 48 horas. Efecto del 2-bromoestearato.
4. Estudio de la velocidad de glicolisis en islotes de ratas alimentadas y ayunadas. Efecto del 2-bromoestearato.
5. Estudio de la secreción simultánea de insulina, glucagón y somatostatina en islotes de ratas alimentadas y ayunadas 48 horas. Efecto del 2-bromoestearato.
6. Efecto del ácido palmítico sobre la secreción de insulina, glucagón y somatostatina en respuesta a glucosa 6 mM. Efecto del 2-bromoestearato sobre la acción secretora del ácido palmítico.
7. Estudio del contenido de insulina, glucagón y somatostatina en islotes de Langerhans de ratas ayunadas y alimentadas.

MATERIAL Y METODOS

I. PERIFUSION DE ISLOTES DE LANGERHANS.

Se conocen una serie de técnicas "in vitro" que permiten el estudio de la secreción endocrina pancreática, como la perfusión de páncreas (Anderson y Long, 1947; Grodsky y cols., 1963) y la incubación o perfusión de trozos de páncreas (Light y Simpson, 1956; Candela 1961; Coore y Randle, 1962), o islotes de Langerhans aislados (Lacy y Kostinovsky 1967; Hellerstrom, 1964).

Lacy y Kostianosvky (1967) describieron un método para aislar los islotes de Langerhans, consistentes en la digestión del páncreas con colagenasa. Este enzima hidroliza el colageno liberando los islotes del tejido exocrino, que pueden entonces separarse uno a uno mediante una micropipeta y con la ayuda de un microscopio de disección (x35). Los islotes así aislados permiten estudiar su función secretora endocrina con independencia de la exocrina y constituyen la única preparación posible para realizar estudios metabólicos.

A. Aislamiento de islotes de Langerhans.

Se utilizaron ratas macho, raza Wistar Albino, con un peso aproximado de 250 g: procedentes de nuestro propio criadero y que fueron alimentadas con una dieta estandar.

Los animales fueron inyectados con una solución acuosa de pilocarpina al 4% (0,1 ml./100 g: de peso corporal) por via intraperitoneal una-dos horas antes de comenzar el experimento.El

objetivo de este tratamiento es provocar una secreción exocrina masiva de enzimas (gránulos de zimógeno) con el citado agente colinérgico para disminuir al máximo la presencia de enzimas proteolíticos durante el proceso de aislamiento de los islotes. Se ha descrito que este tratamiento con pilocarpina no altera la función endocrina y aumenta el rendimiento en la obtención de islotes (Kuo y col., 1973)

1) Solución de Hanks:

Es la solución salina fisiológica utilizada en el proceso de aislamiento de los islotes, cuya composición es la siguiente:

NaCl	136,89 mM
KCl	5,36 mM
Na ₂ HPO ₄ H ₂ O	0,34 mM
KH ₂ PO ₄	0,44 mM
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,8 mM
CaCl ₂ 2H ₂ O	1,27 mM
C ₆ H ₁₂ O ₆	5,85 mM

El pH es ajustado a 7,4 con una solución de NaHCO₃ al 8,4%.

2) Procedimiento:

- a) Tras anestesiar al animal con éter se sacrifica por de capitación.

- b) Se expone la cavidad abdominal tras una incisión abdominal media y se recorta rápidamente el páncreas.
- c) En una placa de Petri conteniendo solución de Hanks se limpia el páncreas de tejido adiposo y se trocea finamente a temperatura ambiente.
- d) Los trozos de páncreas se llevan a un volumen de 5 ml. de solución de Hanks en un vial de centelleo hermeticamente cerrado que contiene 15 mg. de colagenasa (tipo I de Worthington).

El vial se agita vigorosamente en un baño de agua termotatizado a 37°C durante un tiempo que oscila entre 3 y 4 minutos según el lote de colagenasa.

La duración del tiempo de digestión con colagenasa ha de ser cuidadosamente controlado tomando muestras cada cierto tiempo que son observadas al microscopio (x 35) para determinar el momento en que los islotes son liberados.

Una prolongación excesiva de 1 ó 2 minutos de tiempo de digestión puede dar como resultado la obtención de islotes no funcionales metabólicamente o desde el punto de vista secretor.

- e) La digestión se detiene trasvasando la "papilla pancreática" a un vial grande (50 ml.) donde se diluye con un gran volumen (45 ml.) de solución de Hanks a temperatura ambiente.

Tras 10 minutos de reposo para permitir que se sedimenten los islotes liberados, en el fondo del vial, se aspira el sobrenadante y se vuelve a repetir el lavado un par de veces mas.

- f) Tras aspirar el sobrenadante en el último lavado se van tomando alicuotas del volumen residual que son analizadas en una pequeña placa de Petri bajo el microscopio de disección (Zeiss, modelo DV-4) con luz transmitida.

Los islotes aparecen como corpusculos redondeados u ovoidales de coloración amarilla intensa y superficie homogénea, diferenciándose bien del resto de tejido exocrino, que aparece como una fina granulación. Los islotes se retiran de la placa mediante una pipeta capilar y se trasladan a otra placa de Petri con solución de Hanks, desde donde se tomaran posteriormente en un número determinado para trasvasarlos a la cámara del sistema de perifusión o a los viales para estudios metabólicos.

B. Sistema de perifusión.

1.- Medio de perifusión:

NaCl	115,01 mM
KCl	4,7 mM
CaCl ₂	2,5 mM
KH ₂ PO ₄	5,2 mM
MgSO ₄ 7H ₂ O	1,19 mM

NaHCO_3 24 mM

El pH se ajusta a 7,4 burbujeando una mezcla de $\text{CO}_2:\text{O}_2$ (5%; 95%) a 20°C.

Finalmente se disuelve albúmina bovina (Instituto Behring) hasta una concentración final de 0,5 ó 1% y glucosa (Merck) según la concentración deseada.

2.- Solubilización de ácidos grasos y derivados en el medio de perfusión. Los ácidos palmítico, esteárico y 2-bromosteárico fueron adquiridos de Serva.

Tras ser convertidos en sus sales sódicas por tratamiento con cantidades equimolares de NaOH a 80° C se transfirió una alícuota al medio de perfusión conteniendo albúmina, para conseguir la concentración deseada (0,25 ó 0,5mM). La concentración real de ácido esteárico medido en el líquido de perfusión (Duncombe 1964) fué un 93,01% de la concentración teórica deseada (0,5mM), con una relación molar esteárico/albúmina de 3,45. El contenido de ácidos grasos de una solución de albúmina bovina al 1% fué 0,1 mM.

3.- Aparato de perfusión (Fig. 1).

Consta de dos reservorios de medio de perfusión, gaseados continuamente con 95% O_2 + 5% CO_2 a presión (1,5mmHg) y temperatura (20°C) constantes, conectados mediante tubo de cloruro de polivinilo (3 cm. de longitud y 2,54 mm

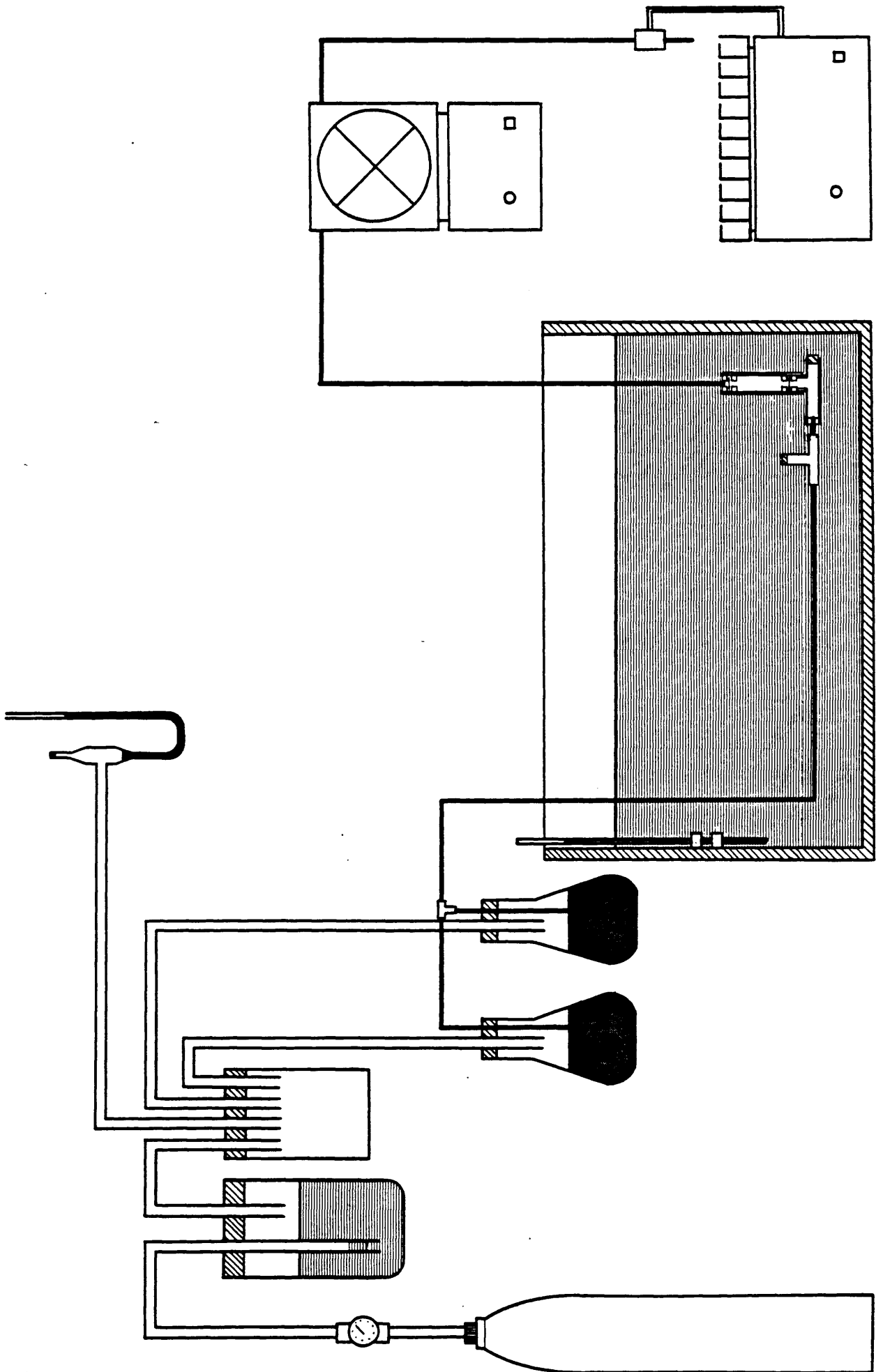


Fig. 1

de diametro interno) con dos pequeños filtros de nylon en sus extremos y colocada en un baño termostatzado a 37°C. El tubo de conexi3n entre los reservorios y la cámara de perifusi3n que se sumergi3 en el baño a 37°C tenia la longitud necesaria para permitir al medio de perifusi3n circulante alcanzar una temperatura de 37°C antes de llegar a la cámara, comprobandose con un termopar provisto de una microsonda de acero-constantano.

La cámara se conecta con otro tubo de cloruro de polivinilo a una bomba peristáltica (modelo Multiperpex LKB) que se regula a un flujo constante de 0,5 6 1 ml./min.. El pH del medio de perifusi3n se midi3 en la cámara al final de cada experimento, estando comprendido entre 7,35 y 7, 45.

4.- Patrones de Perifusi3n:

En todos los experimentos se perfundieron los islotes con glucosa 3mM durante un periodo de 30-45 minutos (periodo de estabilizaci3n).

A continuaci3n se perifunde con un éstimolo durante 30 minutos (periodo de estimulaci3n).

En algunos experimentos se continu3 perifundiendo con glucosa 3mM durante 15 minutos más.

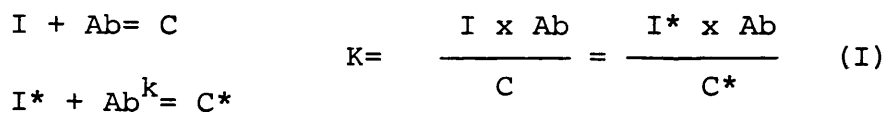
II.- DETERMINACION DE INSULINA.

Para la determinaci3n de la concentraci3n de insulina en las

muestras del líquido de perfusión se utilizó un método radioinmunológico, descrito originalmente por Yalow y Bergson (1956, 1959, 1960, a y b).

El fundamento de este método consiste esencialmente en una reacción de competición entre la insulina de la muestra ("insulina fría") y una cantidad constante de insulina marcada con ^{125}I ("insulina caliente"), para combinarse con un anticuerpo específico para ellas.

La combinación de la insulina marcada con el anticuerpo se cuantificó midiendo la radiactividad en la fracción de insulina libre, no combinada con el anticuerpo. Este parámetro es influenciado por la concentración de insulina fría. Suponiendo que el anticuerpo tenga un centro de unión para los dos tipos de insulina, con la misma afinidad para ambas, podemos plantear los siguientes equilibrios:



siendo:

I : concentración de insulina fría libre.

I* : concentración de insulina ^{125}I libre.

C : concentración del complejo anticuerpo-insulina fría.

C* : concentración del complejo anticuerpo-insulina ^{125}I .

Ab : concentración de anticuerpo libre.

k : constante del equilibrio para la disociación del complejo anticuerpo-insulina.

I_0 : concentración total de insulina fría, que varía de unas muestras a otras.

I_0^* : concentración total de insulina- ^{125}I , que es una constante del radioinmunoensayo. A todas las muestras se les añade la misma cantidad.

De la ecuación (1) podemos deducir:

$$C^* = \frac{I^*}{I} C \quad (2)$$

La concentración total de insulina fría y marcada se distribuye en dos términos constituidos por la insulina que queda libre y la que se une al anticuerpo:

$$\begin{aligned} I_0 &= I + C & ; & \quad I = I_0 - C \\ I_0^* &= I^* + C^* & ; & \quad I = I_0^* - C^* \end{aligned} \quad (3)$$

Sustituyendo estos valores de I y I^* en la ecuación (2) tendremos:

$$C^* = \frac{I_0^* - C^*}{I_0 - C} C$$

Quitando denominadores y agrupando términos

$$C^* I_0 - C^* C = C I_0^* - C C^*$$

$$C^* I_0 = C I_0^*$$

y podemos deducir

$$C^* = \frac{I_o^*}{I_o} C \quad (4)$$

Como puede observarse un aumento de la insulina fría (I_o) puede disminuir la cantidad de insulina marcada unida al anticuerpo (C^*), aunque de forma no lineal ya que también influye el factor (C); podemos deducir de (2):

$$\frac{C^*}{I^*} = \frac{C}{I} = \frac{B}{F} \quad (5)$$

siendo B la hormona marcada ligada al anticuerpo y F la hormona libre. Los cocientes B/F para la hormona marcada y para la hormona no marcada han de ser siempre iguales. Además el cociente C^*/I^* disminuye al aumentar la concentración de insulina fría I_o porque disminuye C^* y aumenta I^* ($C^* + I^* = I_o^* = \text{cte}$). Numerosos autores utilizan esta relación existente entre el cociente B/F de la hormona marcada y la concentración total de insulina fría (I_o) para calcular esta última en las muestras. Nosotros hemos utilizado la relación existente entre radiactividad (CPM) en la fracción de hormona libre (I^*) o combinada al anticuerpo (C^*) y la cantidad total de insulina fría para calcular la concentración de esta última en las muestras.

A continuación describimos la preparación de cada uno de los elementos necesarios para la puesta en marcha de la determinación radioinmunológica de insulina:

A.- RADIOYODACION DE INSULINA CON ^{125}I Na.

Se utilizó insulina porcina cristalina (Novo Research Institute) libre de glucagón, y la técnica de radioyodación de Hunter Greenwood (1962). Esta técnica se basa en la oxidación por la cloramina T del yoduro radiactivo a yodo atómico, que se introduce en uno de los carbonos del anillo bencénico de alguno de los cuatro restos de tirosina de la cadena A (restos 14 y 19) ó B (restos 16 y 26) de la insulina. La acción oxidante de la cloramina T se detiene al cabo de 30 segundos mediante la adición de metabisulfito. La insulina marcada se separa de los demás productos de la reacción por cromatografía de filtración en gel.

1.- Material:

- Tampón fosfato 0,5M a pH 7,5. Se preparará mezclando una solución 0,5M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y otra solución 0,5M de KH_2PO_4 hasta conseguir un pH 7,5.
- Tampón fosfato 0,05M. Se preparó por dilución 1/10 de la solución anterior.
- Cloramina T (merck). Se pesaron 35 mg. y se disolvieron en 10 ml. de tampón fosfato 0,005M.
- Yoduro potásico (Merck). Se pesaron 100 mg. y se disuelven en 10 ml. de tampón fosfato 0,05M.
- Metabisulfito sódico (Merck). Se pesan 24 mg. de metabisulfito sódico y se disuelven en 10 ml. de tampón fosfato 0,05M.
- Tampón glicina (merck) 0,20M, pH 8,8. Se disuelven 15 g. de glicina en unos 900 ml. de agua destilada. Se ajusta a pH 8,8

- con NaOH 1M y se completa hasta un litro..
- Albúmina humana (Instituto Behring) al 20%. Se disuelven 2,4 g de albúmina en 12 ml. de tampón glicina 0,2M, pH 8,8.
 - Insulina cristalina de cerdo. Se pesan 2 mg. de insulina (Novo) que se disuelven en 2 ml de HCl 0,03 M, y se distribuyen en alícuotas de 10 μ l que se almacenan a -20°C .
 - Ácido tricloroacético (Merck) al 20%. Se disuelven 20 g de ácido tricloroacético en 100 ml. de agua destilada.
 - Sephadex G-25 y G-75 (Pharmacia Fine Chemicals).
 - Columnas de cromatografía (Pharmacia Fine Chemicals), de 1,5 cm. de diámetro interno por 30 cm. de altura. Se utilizaron como soporte gel de Sephadex G-25 ó G-75 que previamente se hidrataron con agua destilada durante 24 horas. Después se llenó la columna con gel hasta una altura de 25 cm. y se la vó durante una hora con tampón glicina 0,2M, pH 8,8. A continuación se añadieron 0,2 ml de albúmina bovina al 20% para saturar el vidrio, con objeto de que durante la cromatografía de la insulina marcada, esta no se adsorba a las paredes de la columna.

2.- Método de radioyodación.

Se realizó añadiendo sucesivamente y en el orden indicado los siguientes reactivos:

25 μ l de tampón fosfato 0,5M, pH 7,5

5 μ l (5 μ g) de insulina

10 μ l de cloramina T

1 mCi de ^{125}I (Radiochemical Center Amersham)

Se agitó el tubo suavemente durante 30 segundos, al cabo de los cuales se adicionaron sucesivamente:

50 μl de metabisulfito sódico
100 μl de yoduro potásico
100 μl de albúmina bovina al 20%

Para el cálculo de la actividad específica de la hormona radioyodada se tomaron 5 μl de la mezcla que se diluyeron en 5 ml. de buffer glicina 0,2M, pH 8,8.

El resto de la mezcla de radioyodación (300 μl) se añadió a la superficie de una columna de Sephadex G-25 y se lavó el vial con 0,1 ml. de albúmina al 20% que se transfiere también a la columna. Se eluyó a continuación con tampón glicina 0,2M (pH 8,8), recogiendo 100 fracciones de 0,7 ml. con la ayuda de un colector (LKB, modelo 7000 Ultrorac). El contaje de la radiactividad en cada una de las fracciones nos permitió identificar la insulina radioyodada y el yodo libre. Como corresponde a su peso molecular (6000) el volumen de elución de la insulina coincide con el volumen de exclusión de la columna, eluyendo por tanto antes que el yodo. (Fig. 2).

Las fracciones correspondientes al pico de insulina radioyodada se guardan a -20°C hasta el día de su utilización.

3.- Cálculo de la actividad específica de la hormona.

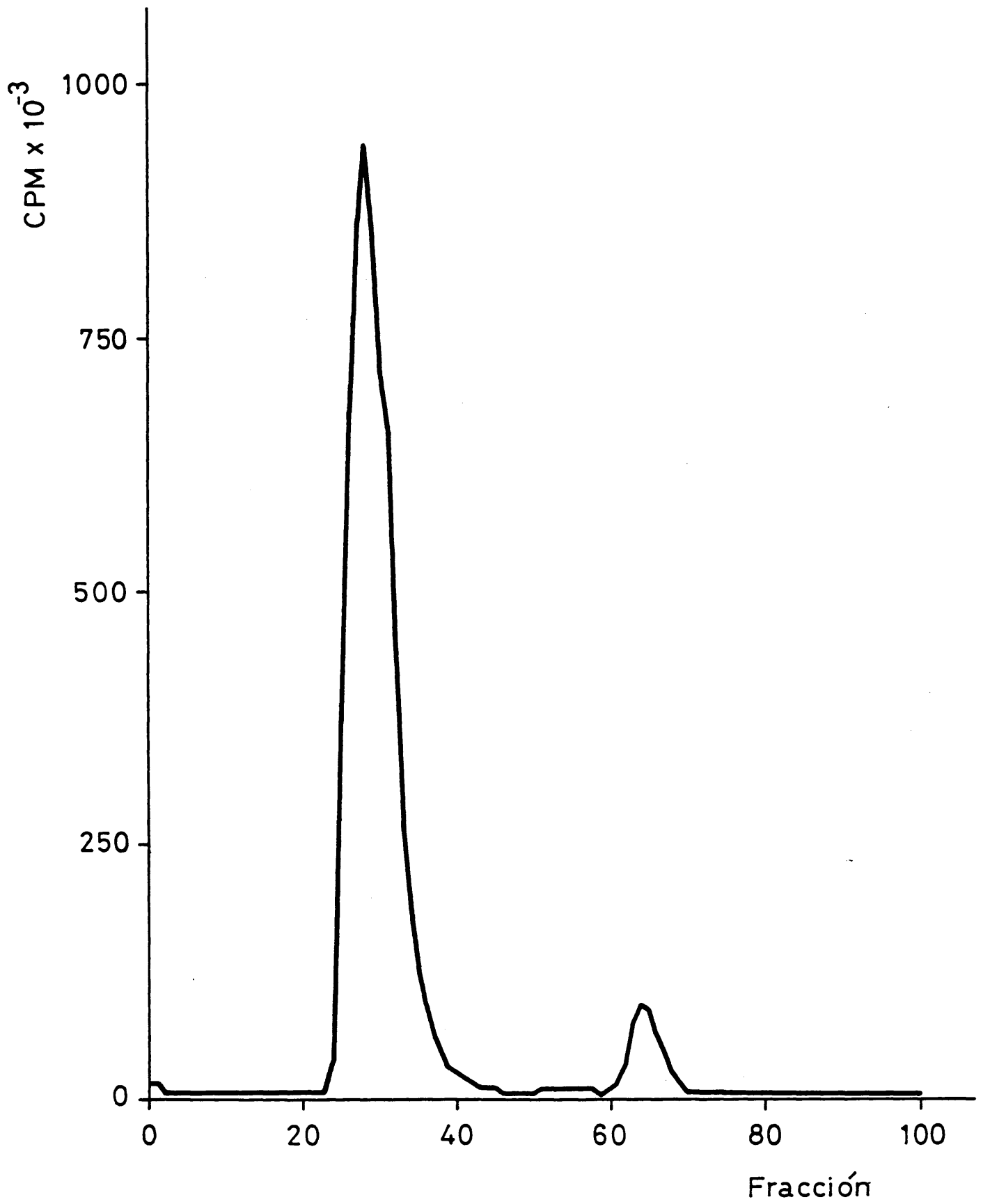


Fig. 2

Aplicando la propiedad del ácido tricloroacético (TCA) de precipitar las proteínas se puede calcular el % de incorporación isotópica en la radioyodación.

Una alícuota de 5 μ l del vial de radioyodación se diluye en 5 ml. de tampón glicina 0,2M, pH 8,8. A 0,1 ml. de esta mezcla se le añaden 0,8 ml. de tampón glicina 0,2M, pH 8,8 y 0,1 ml. de albúmina bovina al 10%; se agita y se añade 1 ml. de TCA al 20%. Nuevamente se agita y se deja reposar durante 15 minutos a 4°C. A continuación se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos y se aspira el sobrenadante. Comparando la radiactividad del precipitado con la inicial puede calcularse el % de incorporación de ^{125}I a la insulina durante la radioyodación.

Podemos calcular la actividad específica de la hormona radioyodada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\% \text{ incorporación} \times \mu\text{Ci } ^{125}\text{I}}{\mu\text{g: hormona}}$$

4.- Purificación de la insulina.

Las fracciones de ^{125}I -insulina obtenidas de la cromatografía en columna de Sephadex G-25 fueron posteriormente repurificadas en Sephadex G-75 (1,5 x 30 cm) eluyendo con buffer glicina 0,2M (pH 8,8) y recogiendo 100 fracciones de 0,7 ml. Como se observa en la Figura 3, se obtuvieron dos picos radiactivos. El primero de ellos, cuyo volumen de elución coincide con el de exclusión de la columna corresponde a insulina inmunológicamente inactiva

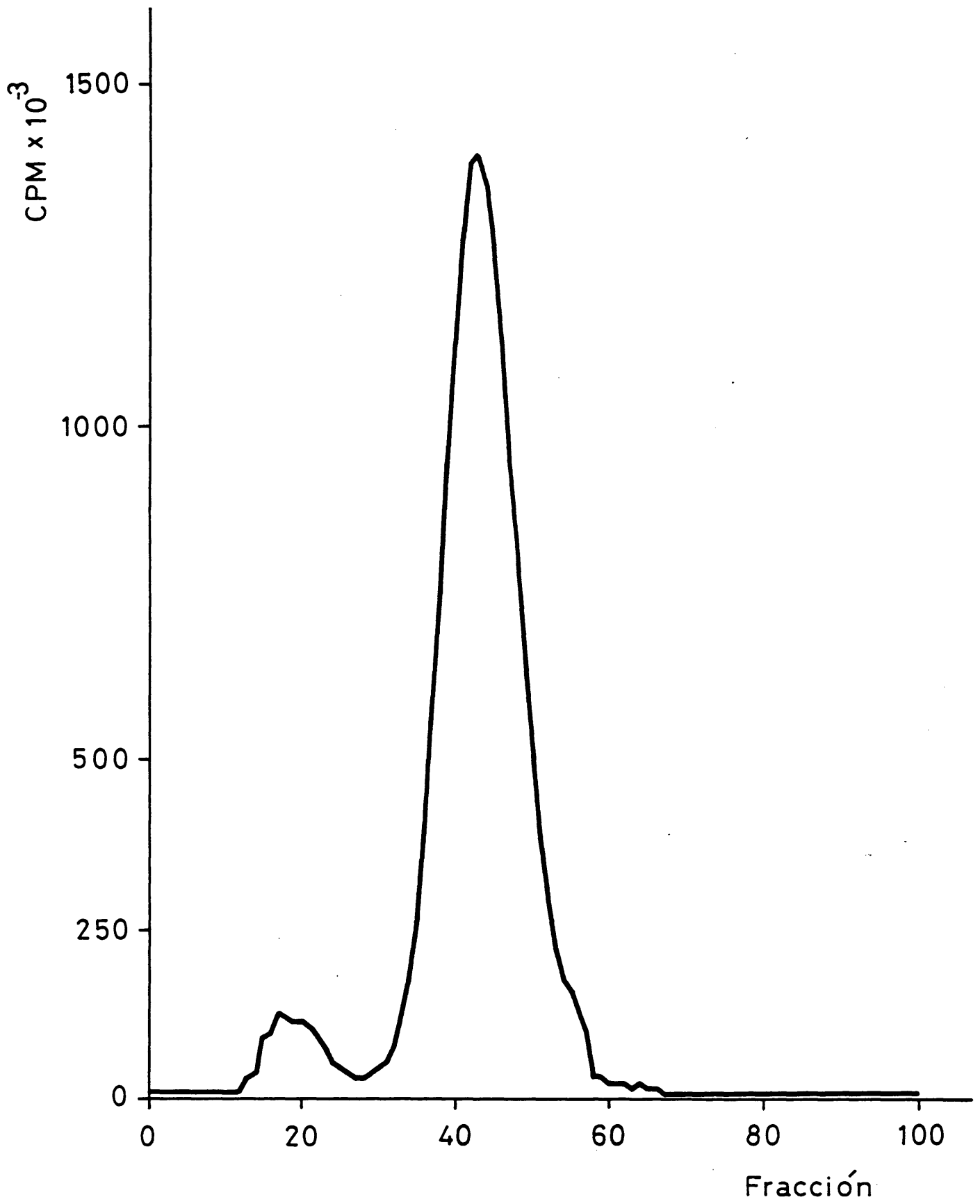


Fig. 3

utilizandose el segundo para la preparación del trazador para el radioinmunoensayo.

B.- ANTICUERPO ANTI-INSULINA.

Se ha utilizado el mismo anticuerpo anti-insulina en todas las determinaciones a una dilución final de 1/200000 que combina aproximadamente un 60% de insulina ^{125}I en ausencia de insulina fría según se recomienda en la literatura. Este anticuerpo nos fué gratuitamente cedido por el Departamento de Histología de la Universidad de Umea (Prof. B. Hellman).

C.- PRACTICA DEL RADIOINMUNOENSAYO.

Se utilizó como tampón para el radioinmunoensayo una solución de glicina 0,2M, pH 8,8, conteniendo 1% de suero de carnero (Difco) y 0,25% de albúmina humana (Instituto Behring).

1.- Preparación de la dilución de anticuerpo.

Se partió siempre de una dilución inicial del anticuerpo al 1/100. Como el volumen total de incubación es de 1 ml. y el anticuerpo se añade en 0,2 ml. (se diluye 5 veces) se prepara una dilución 5 veces mas concentrada (1/40000) que la deseada en la mezcla final de la incubación (1/200000).

El volumen total a preparar depende del número de pruebas.

$$\frac{x}{v_t} = \frac{1}{400} ; \quad x = \frac{V_t}{400} \text{ ml}$$

x ml. de la dilución de anticuerpo 1/100 se diluyen hasta Vt ml. con tampón glicina 0,2M, pH 8,8. De esta solución se pipetea 0,2 ml. a cada tubo.

2.- Preparación de la insulina ^{125}I .

A cada tubo del radioinmunoensayo se le añade 45 pg. de insulina ^{125}I contenidos en 0,6 ml. de tampón de radioinmunoensayo cuya radiactividad (CPM) variará según la actividad específica de la hormona radioyodada.

El volumen total a preparar dependerá del número de pruebas (n):

$$V_t = (n \times 0,6) \text{ ml.}$$

3.- Preparación de la curva estandar.

Nos sirve para calcular la relación entre insulina ^{125}I ligada al anticuerpo (C*) y la insulina fría total de las muestras (I_0).

La curva estandar consiste en preparar una serie de diluciones conocidas de insulina de rata (Novo Research Institute) que se harán reaccionar con el anticuerpo en presencia de una cantidad constante de insulina radioyodada.

Las diluciones se preparan a partir de una solución stock a una concentración de 500 ng./ml. en ClH 0,03N, almacenada a -20°C en alicuotas. A partir de ella se realizan las siguientes diluciones:

1 ml	(500ng/ml)	+ 9 ml	tampón glicina	50 ng/ml
1,2 ml	(50 ng/ml)	+ 0,8 ml	tampón glicina	30 ng/ml
0,8 ml	(50 ng/ml)	+ 1,2 ml	tampón glicina	20 ng/ml
0,4 ml	(50 ng/ml)	+ 1,6 ml	tampón glicina	10 ng/ml
0,8 ml	(50 ng/ml)	+ 7,2 ml	tampón glicina	5 ng/ml
1,6 ml	(50 ng/ml)	+ 0,4 ml	tampón glicina	4 ng/ml
1,2 ml	(5 ng/ml)	+ 0,8 ml	tampón glicina	3 ng/ml
0,8 ml	(5 ng/ml)	+ 1,2 ml	tampón glicina	2 ng/ml
0,4 ml	(5 ng/ml)	+ 1,6 ml	tampón glicina	1 ng/ml
0,2 ml	(5 ng/ml)	+ 1,8 ml	tampón glicina	0,5ng/ml

Cada dilución de la curva estandar se pipeteó por triplicado según el siguiente esquema:

0,2 ml	dilución curva estandar
0,6 ml	insulina ^{125}I
0,2 ml	anticuerpo dilución 1/40000
<u>1,0 ml</u>	

Se preparan además 5 tubos que contienen solamente 0,6 ml. de insulina ^{125}I , que se rotulan como AT que nos permitirán conocer la cantidad total real de insulina ^{125}I añadida a cada tubo, y 5 tubos en los que el anticuerpo se sustituye por tampón glicina (rotulados A) y que nos servirán para medir la eficacia del método de separación.

4.- Preparación de las muestras.

Análogamente a los tubos de la curva estandar se pipetearon

en el siguiente orden:

0,2 ml muestra

0,6 ml insulina ^{125}I

0,2 ml anticuerpo

1,0 ml

Una vez pipeteados los tubos de la curva y las muestras se incubaron en cámara fría a $+4^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.

5.- Separación de la insulina libre de la ligada al anticuerpo.

Se utiliza como método de separación carbón (Sigma) recubierto de dextrano (Pharmacia Fine Chemicals) que adsorbe la insulina libre dejando en solución el complejo antígeno-anticuerpo (Herbert, 1965).

Se prepara una suspensión de carbón-dextrano (3% carbón y 0,25% dextrano) en tampón glicina 0,2M, pH 8,8.

Se añaden 0,5 ml de esta mezcla a todos los tubos (excepto a los rotulados como AT) y se mantienen a -4°C durante 45 minutos, luego se centrifugan a 3000 rpm durante 10 minutos. A continuación se aspira el sobrenadante de cada uno de los tubos, midiendo la radiactividad del precipitado en un contador gamma (modelo Nuclear Chicago).

6.- Ajuste de la curva de calibración.

Se ha encontrado un ajuste satisfactorio de la relación entre radiactividad (CPM) medida en el complejo antígeno-anti

cuerpo e insulina fría a la ecuación general de una hipér
bola: $(y - b) (x + a) = K$

$y = \text{CPM } (C^*)$

$x = \text{ng/ml de } I_0$

El ajuste de los valores experimentales de x e y de la curu
va de calibración a esta función se realizó por el proceu
dimiento utilizado por el Prof. J. Tamarit (1965) que se
basa en el método de mínimos cuadrados.

Se calculan a , b y k de forma que la expresión

$$\left[(y - b) (x + a) - K \right]^2 \text{ sea mínima}$$

7.- Cálculo de la concentración de insulina en las muestras.

Una vez conocidos los parámetros a , b y K se pueden calcuu
lar los ng. de insulina de las muestras mediante la expreu
sión:

$$x \text{ (ng/ml)} = \frac{K}{y - b} - a$$

En todos los experimentos se expresó la secreción de insuu
lina en ng. insulina/minuto/islote.

D.- ESTADISTICA.

1.- Validación.

Consideramos como validación la determinación del error en

la medida de la concentración de hormona en las muestras en las condiciones en las que realizamos el radioinmunoensayo. Se han aplicado los criterios de validación a una curva estandar representativa (Fig. 4).

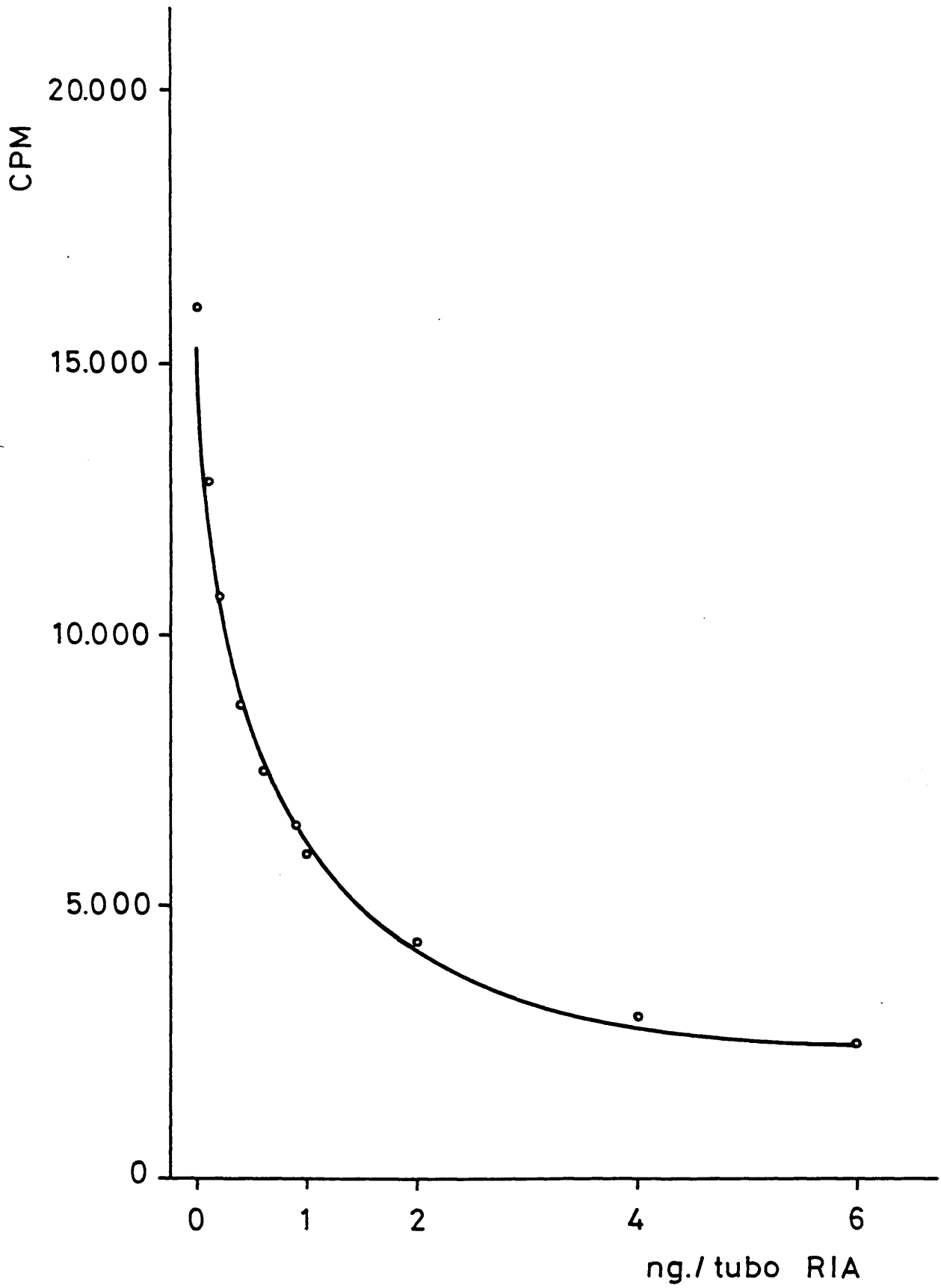


Fig. 4

a) Curva estandar de insulina

Tabla 1

	CPM/ 10^3	s	$\sum(\bar{y}-\bar{y})^2$	$\sum(\bar{y}-y)^2$	L_n	$1/L_n$
AT	25,5510	0,0715	0,01025	41,79480	2	0,5
A	25,4650	0,1022	0,02089	40,69024	2	0,5
0	9,4013	0,3234	0,20925	93,79496	2	0,5
0,1	12,7290	0,4722	0,44605	40,41285	2	0,5
0,2	14,9473	0,1059	0,02245	17,12950	2	0,5
0,4	16,9853	0,1434	0,04118	4,41340	2	0,5
0,6	18,1423	0,1244	0,03095	0,89072	2	0,5
0,8	19,0560	0,4725	0,44664	0,00091	2	0,5
1	19,5913	0,1288	0,03319	0,25491	2	0,5
2	21,2123	0,1041	0,02167	4,52081	2	0,5
4	22,2490	0,1983	0,07867	10,00387	2	0,5
6	23,01433	0,1461	0,04270	15,43091	2	0,5
			1,40389	269,33789	24	6

b) Análisis de la varianza.

Hemos aplicado este método estadístico para comprobar si existe una diferencia significativa entre los valores medios de CPM de la fracción de insulina libre correspondientes a las distintas concentraciones de insulina fría de la curva estándar. Ello nos da una idea global sobre el poder discriminador del radioinmunoensayo. Se basa en la siguiente descomposición de la varianza de la CPM:

$$\sum (\bar{x} - x_{FC})^2 = F \sum (\bar{x} - \bar{x}_c)^2 + \sum (\bar{x}_c - x_i)^2$$

número de libertades $L = CF - 1$

\bar{x} : media general de todos los valores del parámetro CPM.

\bar{x}_c : media de CPM correspondientes a la fracción de insulina libre para cada concentración de insulina fría.

x_i : valores individuales del parámetro medido (CPM)

CF : número total de observaciones.

El primer sumando nos indica la variabilidad del parámetro CPM entre las distintas concentraciones de insulina fría.

número de libertades $L = C - 1$

C = número de concentraciones

El segundo sumando se refiere a la variabilidad del parámetro CPM dentro de cada concentración.

número de libertades $L_i = C (F - 1)$

C= número de concentraciones

F= número de observaciones dentro de cada concentración.

Si la variación en las CPM se debiese al azar, las varianzas entre concentraciones (primer sumando) e intra concentraciones (segundo sumando) serian iguales. En nuestro caso concreto (Tabla 1) vemos que la varianza entre concentraciones es mucho mayor que la varianza intra concentraciones lo que indica que el ensayo es válido y sirve para apreciar las distintas concentraciones de la curva.

Las varianzas entre e intra concentraciones se relacionan por la F de Fischer:

$$F = \frac{\text{varianza entre concentraciones}}{\text{varianza intra concentraciones}}$$

En las tablas de Geigy encontramos el número crítico (teniendo en cuenta el número de libertades) por debajo del cual no podemos considerar válido el ensayo.

TABLA 2

Concepto	Suma de cuadrados	L	Varianza (s)
General	809,4179879	35	23,126228
Entre concentraciones	808,0142991	11	73,455845
Intra concentraciones	1,39925487	24	0,058302

F= 1259,91981

Valor crítico= 3,09

p= 0,01

c) Test de Bartlett.

Nos indica si la varianza de las CPM en la fracción de in sulina libre para las distintas concentraciones de hormona fria es homogénea.

Calculamos el estadístico de Bartlett (EB) mediante las si guientes expresiones:

$$E.B. = 2,306 \times \frac{L_i \log s_i^2 - \sum L_n \log s_n^2}{K}$$

$$K = 1 + \frac{\frac{1}{\bar{L}_n} - \frac{1}{\bar{L}_i}}{3(n-1)}$$

$$S_i = \frac{(\bar{x}_c - x_i)^2}{L_i}$$

(ver análisis de la varianza)

$$L_i = C(F - 1)$$

s_n : desviación estandar en la medida de las CPM para cada con cen tración.

L_n : grados de libertad en cada concentración ($L_n = \text{numeros de re}$ plicados - 1)

En nuestro caso concreto:

	L_i	$1/L_i$	$L_i \log s_i^2$	$\sum L_n$	$\sum 1/L_n$	$\sum L_n \log s_n^2$
2	24	1/24	-29,6236	24	6	-37,64604

$K = 1,18056$

$E.B. = 6,79545$

$L = \text{número de columnas} - 1$

valor crítico = 31,264 ($p = 0,001$)

Luego se puede concluir que la varianza de las CPM en la fracción de insulina libre es la misma para las distintas concentraciones de insulina fria de la curva estandar.

d) Test de Duncan.

Nos va a servir para comprobar que hay una diferencia significativa entre todos los valores medios de CPM, de la fracción de insulina libre correspondientes a las distintas concentraciones de la curva estandar.

Se ordenande menor a mayor los valores medios de CPM correspondientes a las distintas concentraciones y se calcula el límite superior de los valores por encima del cual no hay diferencia significativa.

Calculamos en primer lugar el error estandar de la media:

$$\text{Error estandar: } \frac{\text{varianza intraconcentraciones}}{\text{número replicados}}$$

En las tablas encontramos los valores w que se multiplican por el error estandar. Restando este producto a los valores médios de las CPM calculamos el límite superior de los valores por

enzima del cual no hay diferencia significativa respecto a la me
dia.

Grados de libertad para w = número total de observaciones -
número de columnas.

En nuestro caso concreto (tabla 3):

Test de Duncan.

$L = 24$

Error estandar = 0,1394

TABLA 3

x	CPM	Límite ($2\alpha < 0,01$)	Limite ($2\alpha < 0,05$)
0	9,40133		
0,1	12,729	12,17695	12,3220
0,2	14,94733	14,3702	14,5194
0,4	16,98533	16,3984	16,5462
0,6	18,14233	17,5387	17,6935
0,8	19,0560	18,4440	18,5988
1	19,5913	18,9723	19,1299
2	21,21233	20,5863	20,7467
4	22,2490	21,6175	21,7792
6	23,01433	22,3772	22,5432
A	25,4650	24,82373	24,9910
AT	25,5510	24,90694	25,0756

Vemos que no hay diferencia significativa entre A y AT, y

que nuestro ensayo diferencia todos los puntos de la curva para $2\alpha < 0,05$ y que no diferencia 0,8 y 1 para $2\alpha < 0,01$.

e) Perfil de precisión.

Se define como la relación entre el error en la determinación de una concentración y su valor teórico. Se comprobó anteriormente, mediante el test de Bartlett, que la varianza del parámetro que se mide en el radioinmunoensayo (CPM) es homogénea en el intervalo de concentraciones de insulina fría de la curva de calibración; sin embargo, la varianza de las distintas concentraciones no es homogénea porque depende de la pendiente de la curva en cada punto.

El cociente entre la varianza del parámetro CPM de la insulina libre correspondiente a las distintas concentraciones de la curva de calibración y el correspondiente valor de la pendiente de la curva nos permite determinar la varianza de la concentración correspondiente a cada punto:

$$s_x = \frac{s_y}{tg} \quad tg = \frac{y}{x} = \frac{-K}{(x+a)^2}$$

$$s_x = \frac{s_y (x+a)^2}{K}$$

s_y = desviación estandar del parámetro y (CPM)

s_x = desviación estandar del parámetro x (concentración).

x = concentración de insulina fría correspondiente a cada punto de la curva estandar (ng/ml.).

k y a= parámetros calculados al ajustar la curva estandar a la ecuación general de la hipérbola (métodos de mínimos cuadrados): $(y - b) (x + a) = K$.

En la tabla 4 indicamos los errores absolutos y relativos correspondientes a las distintas concentraciones de insulina de una curva estandar.

TABLA 4

x	s_x	s_x/x	$s_x/x (\%)$
0	0,001937714		
0,1	0,002887668	0,028876685	2,888
0,2	0,004026114	0,020130569	2,013
0,4	0,006870069	0,017175172	1,718
0,6	0,010469401	0,017449002	1,745
0,8	0,014824111	0,018530138	1,853
1	0,019936031	0,019936031	1,994
2	0,056820517	0,0284102259	2,841
4	0,187230770	0,046807693	4,681
6	0,393183976	0,065530663	6,553

Representando el error (en %) correspondiente a cada punto de la curva estandar frente a la concentración teórica en cada punto, se obtiene el perfil de precisión de la curva estandar (Fig. 5).

Como se observa en la figura 5, el intervalo de mínimo error

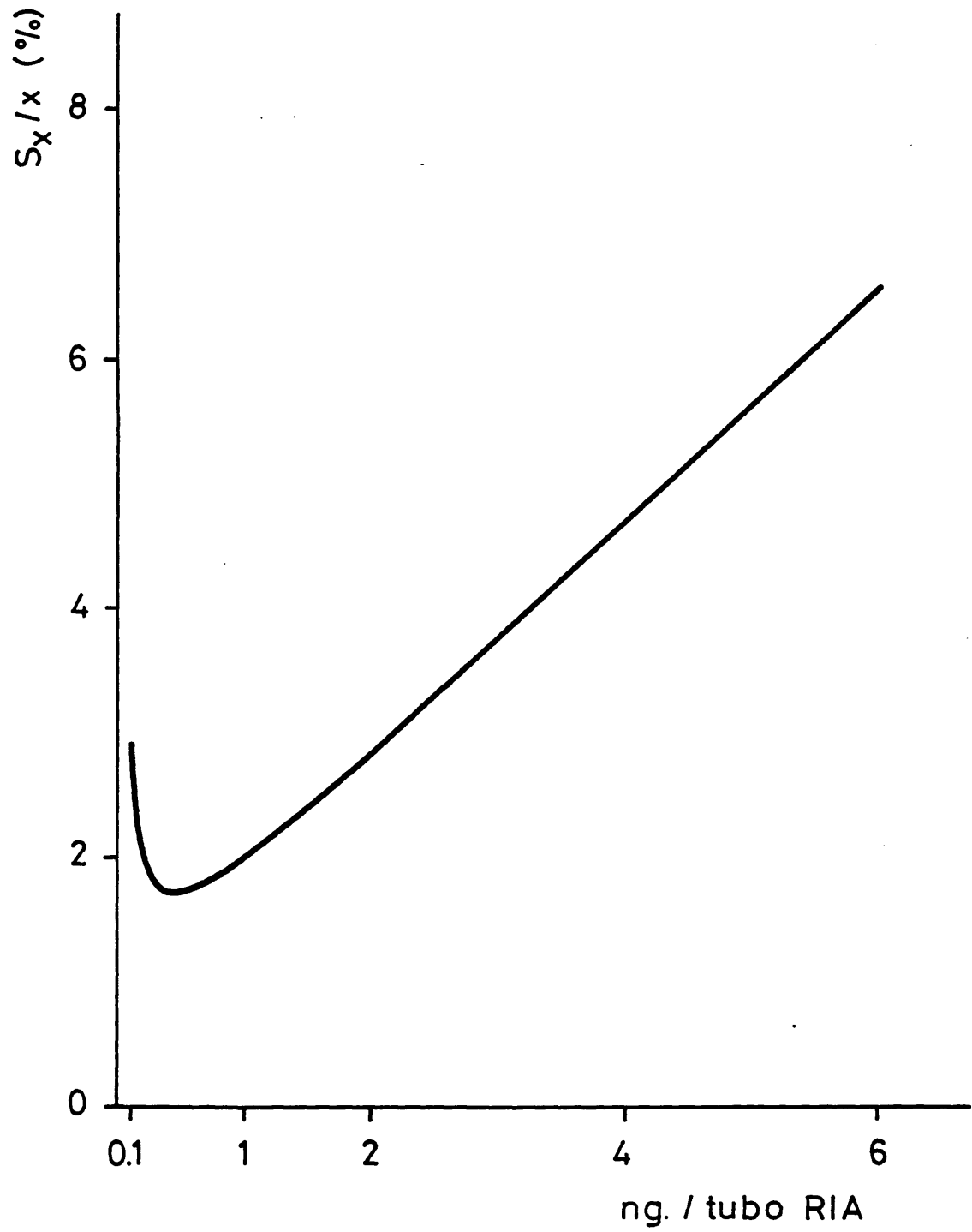


Fig. 5

corresponde al rango de concentraciones comprendido entre 0,2 y 1 ng/tubo, que incluye los niveles de insulina encontrados en nuestras muestras.

La varianza de la concentración "cero" se define como la sensibilidad del método radioinmunológico y nos indica la concentración mínima de hormona detectable, que en nuestro caso resultó ser 0,0019 ng/tubo.

2.- Comparación estadística entre experimentos.

Los distintos experimentos se compararon aplicando el test estadístico de la "t" de Student para pequeño número de casos y muestras no apareadas.

3.- Determinación de glucagón.

Para determinar la concentración de glucagón en las muestras del líquido de perfusión utilizamos el método radioinmunológico descrito por R.H. Unger (1959). Su fundamento es el mismo que el descrito anteriormente para la determinación de insulina.

A.- RADIOYODACION DE GLUCAGON CON ^{125}I Na

Se utilizó glucagón porcino cristalino (Novo Research Institute), y la técnica de radioyodación de Hunter y Greenwood (1962) cuyo fundamento explicamos en la radioyodación de insulina.

1.- Material:

- Tampón fosfato 0,5M. pH 7,5. Se preparó mezclando una solución 0,5M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y otra solución 0,5M de KH_2PO_4 hasta conseguir un pH 7,5

- Tampón fosfato 0,05M. Se preparó por dilución 1/10 de la solución anterior.
- Cloramina T (Merck). Se pesan 35mg. y se disuelve en 10ml. de tampón fosfato 0,05M.
- Yoduro potasico (Merck). Se pesan 100mg. y se disuelven en 10ml. de tampón fosfato 0,05M.
- Metabisulfito sódico (Merck). Se pesan 24mg. y se disuelven en 10ml. de tampón fosfato 0,05M.
- Tampón glicina 0,2M, pH 8,8 (Merck). Se disuelven 15g. de glicina en 900ml. de agua destilada, se ajusta a pH 8,8 con NaOH 1M y se completa hasta un litro.
- Albúmina humana al 20% (Instituto Behring). Se disuelven 2,4 g. de albúmina en 12ml. de tampón glicina 0,2M, pH 8,8.
- Glucagón cristalino de cerdo (Novo Research Institue). Se pe san 2mg. de glucagón porcino cristalino que se disuelven en 4ml. de HCl 0,03M (0,5mg/ml) y se distribuyen en alicuotas de 10 ul (5ng) que se almacenan a -20°C.
- Acido tricloroacético al 10% (Merck). Se disuelven 10gr. de ácido tricloroacético en 100ml. agua destilada.
- NaOH 1M (Merck). Se disuelven 4gr. de NaOH en 100ml agua des tilada.
- Columna de celulosa CF-11 (Whatman) 20 x 12 mm.

2.- Método de radioyodación.

La radioyodación del glucagón se realiza en un tubo de plástico al que se añade sucesivamente y en el orden indicado los siguientes reactivos:

- 30 ul de tampón fosfato 0,5M
- 10 ul (5 ug.) de glucagón

10 μ l de cloramina T
2 mCi de ^{125}I (Radiochemical Center, Amersham)

Se agita el tubo suavemente durante 20 segundos, al cabo de los cuales se añaden sucesivamente:

50 μ l de metabisulfito sódico
100 μ l de yoduro potásico
1,66 ml de glicina 0,2M, pH 8,8, 0,25% de albúmina humana.

La mezcla de radioyodación se transfiere a la columna de celulosa CF-11 para su purificación.

3.- Purificación del glucagón.

Una jeringa de plástico de 5 ml. se llena con celulosa Whatman CF-11 hasta 2,5 ml. y se lava con tampón glicina 0,2M, pH 8,8. A continuación se añade a la mezcla de radioyodación (1,99 ml.) 1 ml. de suero de carnero (Difco) y se trasvasa todo a la columna. Esta se lava con 30 ml. de tampón glicina 0,2M, pH 8,8 para eluir el ^{125}I .

El glucagón ^{125}I adsorbido a la celulosa se eluyó en 3 tubos, en cada uno de los cuales se realizó el siguiente esquema de elución:

- a) Se añaden a la columna 0,5 ml. de una solución de albúmina humana al 0,5% y se ejerce presión. A continuación añadimos 1 ml. de tampón glicina 0,2M, pH 8,8, ejerciendo nuevamente presión.

- b) Igual que a.
- c) Se añaden a la columna 0,5 ml. de suero de carnero y se ejerce presión. A continuación se añade 1 ml de tampón glicina 0,2M, pH 8,8 y se ejerce de nuevo presión.
- d) Igual que c.

4.- Cálculo de la actividad específica.

El cálculo de la actividad específica se basa en la precipitación de la hormona radioyodada y otras proteínas añadidas ("carrier") por el ácido tricloroacético.

Se toma una alícuota de cada uno de los tubos recogidos en la purificación y del vial de radioyodación y se diluye con tampón glicina 0,2M, pH 8,8. A 0,1 ml. de cada dilución se añaden:

0,8 ml tampón glicina 0,2M, pH 8,8

0,1 ml de albúmina bovina al 15%.

4 ml ácido tricloroacético al 10%.

se agitan, y se dejan 10 minutos en reposo a 4°C. Después se centrifuga durante 15 minutos a 4000 rpm, se aspira el sobrenadante y el precipitado se redisuelve con NaOH 1M. Se cuenta su radiactividad, comparandola con controles que llevan 0,1 ml. de muestra sin precipitar con tricloroacético y 1 ml. de NaOH y se calcula el tanto por ciento de incorporación de ^{125}I a la hormona.

Se calcula la actividad específica mediante la siguiente fórmula:

$$Ae = \frac{\% \text{ de incorporación} \times 2000 \times F}{100 \times \mu\text{g hormona}} \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$$

F= Factor de decrecimiento temporal de la radiactividad.

La actividad específica oscila entre 350 y 400 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$

B.- ANTICUERPO ANTI-GLUCAGON.

En todas las determinaciones se ha utilizado el anticuerpo 30 K específico para glucagón pancreático, (Dr. R.H. Unger Dallas) a una dilución final 1/125000.

C.- PRACTICA DEL RADIOINMUNOENSAYO.

Utilizamos como tampón para el radioinmunoensayo una solución de glicina 0,2M, pH 8,8 que contiene 1% de suero de carnero y 0,25% de albúmina humana.

1.- Preparación de la dilución de anticuerpo.

Se ha utilizado el anticuerpo 30 K a una dilución final de 1/125000. Se partió siempre de una dilución inicial del anticuerpo al 1/100. Como el volumen total de incubación es de 1,2 ml. y el anticuerpo se añade en 0,4 ml. (se diluye 3 veces) se prepara una dilución 3 veces mas concentrada (1/41666,6667) que la deseada en la mezcla final de incubación. El volumen total a pre

parar depende del número de pruebas.

2.- Preparación del glucagón ^{125}I .

A cada tubo del radioinmunoensayo se le añaden 15 pg de glucagón ^{125}I contenidos en 0,5 ml. de tampón de radioinmunoensayo cuya radiactividad (CPM) dependerá de la actividad específica de la hormona radioyodada.

El volumen total a preparar dependerá del número de pruebas.

3.- Preparación de la curva estandar.

Las diluciones se preparan a partir de una solución stock de glucagón (10 $\mu\text{gr/ml}$) almacenada en alicuotas:

0,1 ml (10 $\mu\text{gr/ml}$) + 0,9 ml tampón glicina: 1000ng/ml

0,1 ml (1000ng/ml) + 0,9 ml tampón glicina: 100 ng/ml

0,1 ml (100 ng/ml) + 0,9 ml tampón glicina: 10 ng/ml

0,5 ml (10 ng/ml) + 2 ml tampón glicina: 2000pg/ml

1,5 ml (2000pg/ml) + 1,5 ml tampón glicina: 1000pg/ml

1 ml (1000pg/ml) + 1 ml tampón glicina: 500 pg/ml

0,5 ml (1000pg/ml) + 1,5 ml tampón glicina: 250 pg/ml

0,1 ml (1000pg/ml) + 0,9 ml tampón glicina: 100 pg/ml

0,1 ml (1000pg/ml) + 1,9 ml tampón glicina: 50 pg/ml

Cada dilución de la curva estandar se pipeteó por triplicado según el siguiente esquema, cuyo volumen final es de 1,2 ml.:

0,2 ml dilución curva estandar.

0,5 ml glucagón ^{125}I .

0,1 ml trasylol (Bayer).

0,4 ml anticuerpo dilución 1/41666,6667

1,2 ml

Se preparan además 5 tubos que contienen solamente glucagón ^{125}I , que se rotulan como AT, que nos permitirán conocer la cantidad real de glucagón ^{125}I añadida a cada tubo, y 5 tubos en los que el anticuerpo se sustituye por tampón glicina (rotulados A) que nos servirán para medir la eficacia del método de separación.

4.- Preparación de las muestras.

Para la determinación de glucagón en las muestras del líquido de perfusión, se recogen alicuotas que se diluyen con tampón glicina 0,2M, pH 8,8 al que previamente se añadió trasylol.

Análogamente a los tubos de la curva estandar se pipetearon en el siguiente orden:

0,2 ml muestra.

0,5 ml glucagón ^{125}I .

0,1 ml trasylol.

0,4 ml anticuerpo

1,2 ml

Una vez pipeteados los tubos de la curva y las muestras se incubaron en la cámara fría a +4°C durante cuatro días.

5.- Separación del glucagón libre del ligado al anticuerpo.

Se prepara una suspensión de carbón-dextrano (0,5% carbón y 0,25% dextrano) en tampón glicina 0,2M, pH 8,8.

Se añaden 0,5 ml. de esta suspensión a cada tubo (excepto a los rotulados como AT) y se mantienen a +4°C durante 45 minutos, pasados los cuales se centrifugan a 3000 rpm durante 10 minutos. A continuación se aspira el sobrenadante de cada uno de los tubos, midiendo la radiactividad del precipitado en un contador gamma.

6.- Ajuste de la curva de calibración.

Como en el caso de la insulina, se ajustaron las variables x (pg glucagón frío) e y (CPM) a la ecuación general de una hipérbola (J. Tamarit, 1965):

$$(y - b) (x + a) = K$$

El ajuste de los valores experimentales a esta función, se realizó por el método de mínimos cuadrados.

Se calcula a , b y k de forma que la expresión

$$\sum \left[(y - b) (x + a) - k \right]^2 \text{ sea mínima}$$

7.- Cálculo de la concentración de glucagón en las muestras.

Una vez conocidos a , b y k se puede calcular la concentración de glucagón en las muestras mediante la siguiente expresión:

$$x \text{ (pg/ml)} = \frac{k}{y - b} - a$$

a) Curva estandar de glucagón

Tabla 5

	CPM/ 10^3	s	$\sum (\bar{y} - \bar{y})^2$	$\sum (\bar{y} - \bar{y})^2$	L_n	$1/L_n$
AT	8,5072	0,21741	0,07228	5,18951	2	0,5
A	7,5946	0,1452	0,05370	1,86445	2	0,5
0	4,48267	0,07336	0,01076	3,05019	2	0,5
10	4,65333	0,15791	0,04987	2,48321	2	0,5
20	5,19033	0,09935	0,01974	1,07983	2	0,5
50	5,519	0,1065	0,02269	0,50431	2	0,5
100	5,8365	0,11243	0,01264	0,15417	2	0,5
200	6,7433	0,21914	0,09604	0,26435	2	0,5
400	7,17133	0,07267	0,01056	0,88770	2	0,5

En todos los experimentos se expresó la secreción de glucagón en pg glucagón/minuto/islote.

D.- ESTADISTICA.

1.- Validación.

Como en el caso de la insulina se aplicaron los criterios de validación a una curva estandar representativa (Fig. 6).

b.- Análisis de la varianza.

Se descompone la varianza igual que en el radioinmunoensayo de insulina.

TABLA 6

Concepto	Suma de cuadrados	L	S
General	46,78146	26	1,79929
Entre concentraciones	46,43316	8	5,80415
Intra concentraciones	0,34828	18	0,01935
F= 299,97330 valor crítico= 5,25 P= 0,01			

Como se ve la varianza entre concentraciones es mayor que la varianza intra concentraciones, lo que indica que el ensayo es válido.

c.- Test de Bartlett.

Como en el caso de la insulina aplicamos este test para com

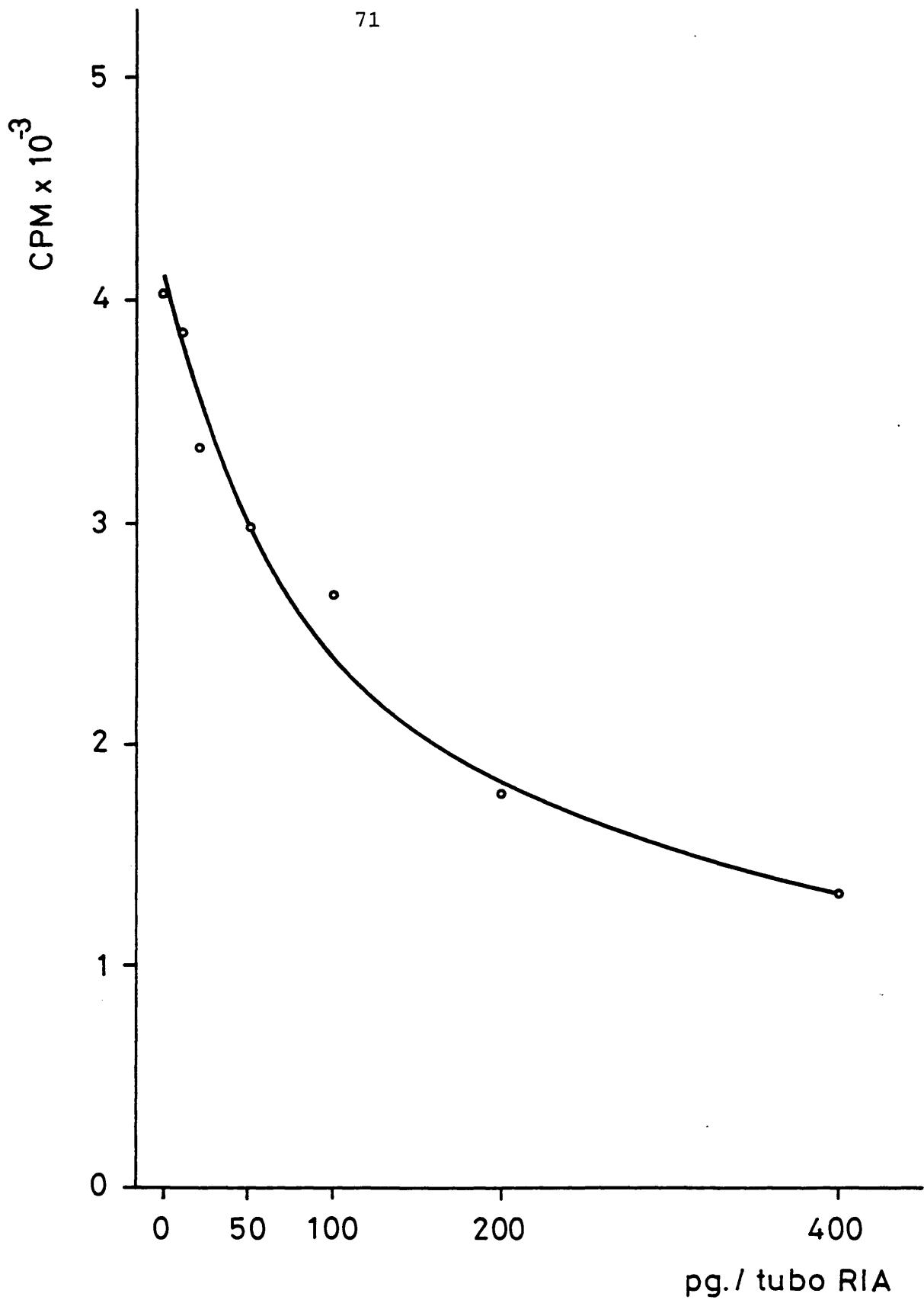


Fig. 6

probar que la varianza de las CPM en la fracción de glucagón L_i bre para las distantas concentraciones de glucagón frío es homogénea.

$$E.B. = 2,306 \times \frac{L_i \log s_i^2 - \sum L_n \log s_n^2}{K}$$

$$K = 1 + \frac{\sum \frac{1}{L_n} - \frac{1}{L_i}}{3(n-1)}$$

L_i	$1/L_i$	$L_i \log s_i^2$	$\sum L_n$	$\sum 1/L_n$	$\sum L_n \log s_n^2$
18	1/18	-30,83167	18	4,5	-32,63763

$$K = 1,185185 \quad L = 8$$

$$E.B. = 3,51385 \quad \text{valor crítico} = 26,1240 \quad P = 0,001$$

Por lo tanto la varianza del parámetro medido (CPM) correspondiente a las distintas concentraciones de glucagón frío de la curva estandar es homogénea.

d.- Test de Duncan.

TABLA 7

Error estandar de la media = 0,08031

x	CPM	$2\alpha < 0,01$	Límite
0	4,48267		
10	4,65333	2,97	4,41481
20	5,19033	3,12	4,93976
50	5,51900	3,21	5,26120

100	5,83650	3,27	5,67389
200	6,74330	3,32	6,47667
400	7,17133	3,35	6,90229
A	7,59460	3,37	7,32396
AT	8,50720	3,39	8,23495

Vemos que diferencia todas las concentraciones de glucagón. frio de la curva estandar excepto 0 y 10 pg/tubo.

e.- Perfil de precisión.

En la tabla 8 indicamos los errores absolutos y relativos correspondientes a las distintas concentraciones de glucagón de una curva estandar representativa.

TABLA 8

x	s_x	s_x/x	s_x/x (%)
0	0,83012		
10	0,86910	0,08619	8,619
20	0,86910	0,04471	4,471
50	0,99502	0,01990	1,990
100	1,17485	0,01175	1,175
200	1,57930	0,00790	0,790
400	2,56735	0,01284	1,284

Sensibilidad= 0,83012

En la figura 7 se representa el perfil de precisión de la

curva. La zona de mínimo error del radioinmunoensayo correspon
de al intervalo de concentraciones comprendido entre 50 y 200
pg/tubo.

2.- Comparación estadística entre experimentos.

Los distintos experimentos se compararon aplicando el test
estadístico de la "t" de Student para pequeño número de casos
y muestras no apareadas.

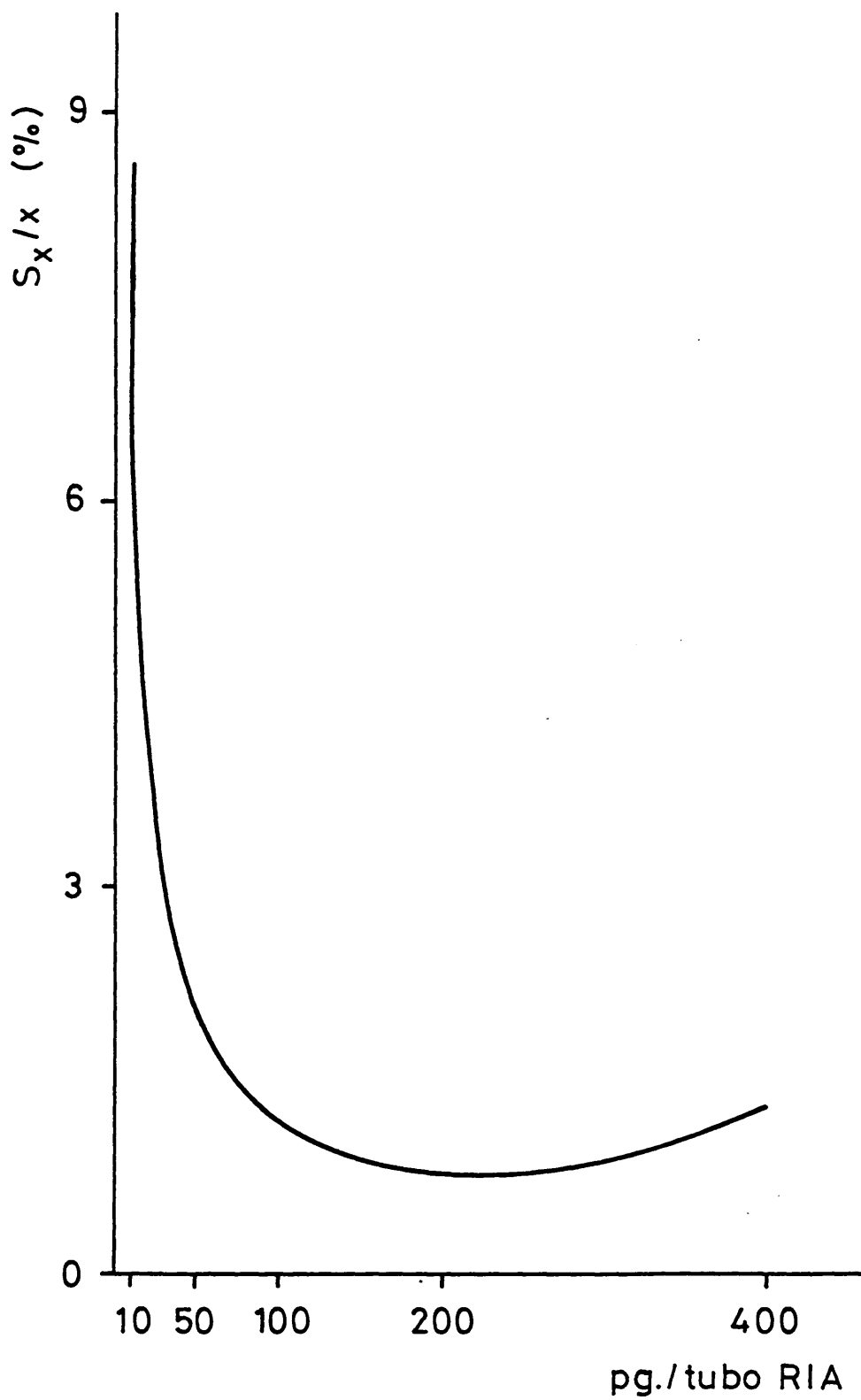


Fig. 7

IV.- DETERMINACION DE SOMATOSTATINA.

Para determinar la concentración de somatostatina en las muestras del líquido de perfusión se utilizó un método radioinmunológico descrito por Arimura y cols., 1975. Su fundamento es el descrito anteriormente en la determinación de insulina.

A.- RADIOYODACION DE SOMATOSTATINA CON ^{125}I Na.

Se utilizó Tir¹ somatostatina (U.C.B. Bruselas) y la técnica de radioyodación descrita por Thorell y Johansson (1971). Esta técnica se basa en la oxidación por H_2O_2 en presencia de lactoperoxidasa del yoduro radiactivo en yodo atómico, que se introduce en uno de los carbonos del grupo tirosilo de la molécula. La acción de la lactoperoxidasa se detiene al cabo de 4 minutos por dilución con una solución de albúmina bovina al 1%. La somatostatina radioyodada se separa de los demás productos de la reacción por cromatografía en celulosa.

1.- Material

- Acetato amónico 0,2M. Se prepara disolviendo 15,416 g. de acetato amónico en 500 ml. de agua destilada. Se ajusta a pH 4,4 con ácido acético al 100% y se completa hasta un litro.
- Acetato amónico 0,002M. Se prepara por dilución 1/100 de la solución anterior.
- H_2O_2 . Se diluye 1 μg de H_2O_2 al 30% (Foret) en 10 ml. de agua destilada.

- Lactoperoxidasa (Sigma). Se diluye 5 μ l de lactoperoxidasa (25 μ g) en 500 μ l de agua destilada.
- Albúmina bovina al 5% (Instituto Behring). Se disuelven 150 mg de albúmina bovina en 3 ml de acetato amónico 0,002M, pH 4,4
- Albúmina bovina al 1%. Se prepara por dilución 1/5 de la solución anterior.
- Tir¹ somatostatina. Se pesan 0,5 mg. de Tir somatostatina (UCB Bruselas) que se disuelven en 0,5 ml de ácido acético 0,1N (1 mg/ml) y se distribuyen en alicuotas de 10 μ l que se almacenan a -20°C.
- Tampón fosfato 0,5M pH 7,5. Se prepara mezclando una solución 0,5M de CH_2PO_4 , con otra solución 0,5M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, hasta conseguir un pH 7,5.

2.-Método de radioyodación.

Se realizó añadiendo sucesivamente y en el orden indicado los siguientes reactivos:

- 5 μ l (5 μ g) de Tir somatostatina.
- 25 μ l de tampón fosfato 0,5M, pH 7,5
- 5 μ l (0,5 mCi) de ^{125}I (Radiochemical Center Amersham)
- 10 μ l de lactoperoxidasa
- 1 μ l H_2O_2 dilución 1/10000 en agua destilada.

Se dejó reaccionar 4 minutos a temperatura ambiente, añadiendo a continuación 1 ml. de albúmina bovina al 1% en acetato amónico 0,002M, para detener la reacción.

3.- Purificación de la somatostatina.

La mezcla de radioyodación se transfirió a una columna (0,9 x 5 cm) de carboximetil celulosa CM-50 (Whatman) que se conecta a una bomba peristáltica (modelo Multiperpex LKB) que gradúa el flujo a 1 ml/min. La bomba se conecta a un reservorio de tampón acetato 0,002M, que a su vez va conectado a otro reservorio de tampón acetato 0,2M de forma que se establezca un gradiente lineal de concentraciones (Fig. 8).

Terminada la cromatografía se cuenta la radiactividad de todas las fracciones. Como se ve en la figura 8 se separan dos picos; el primero corresponde al ^{125}I y el segundo a la hormona marcada que va a ser utilizada en el radioinmunoensayo.

B.- ANTICUERPO ANTISOMATOSTATINA.

En la determinación de somatostatina se utilizaron dos anticuerpos diferentes.

Parte de los experimentos se determinaron con el anticuerpo 141C gratuitamente cedido por el Dr. S. Efendic (Departamento de Endocrinología. Instituto Karolinska. Suecia) a una dilución final 1/56000.

Para determinar el contenido de somatostatina en islotes, utilizamos un anticuerpo obtenido en nuestro Laboratorio, que trabaja también a una dilución final 1/56000.

1.- Producción de anticuerpos. Inmunización.

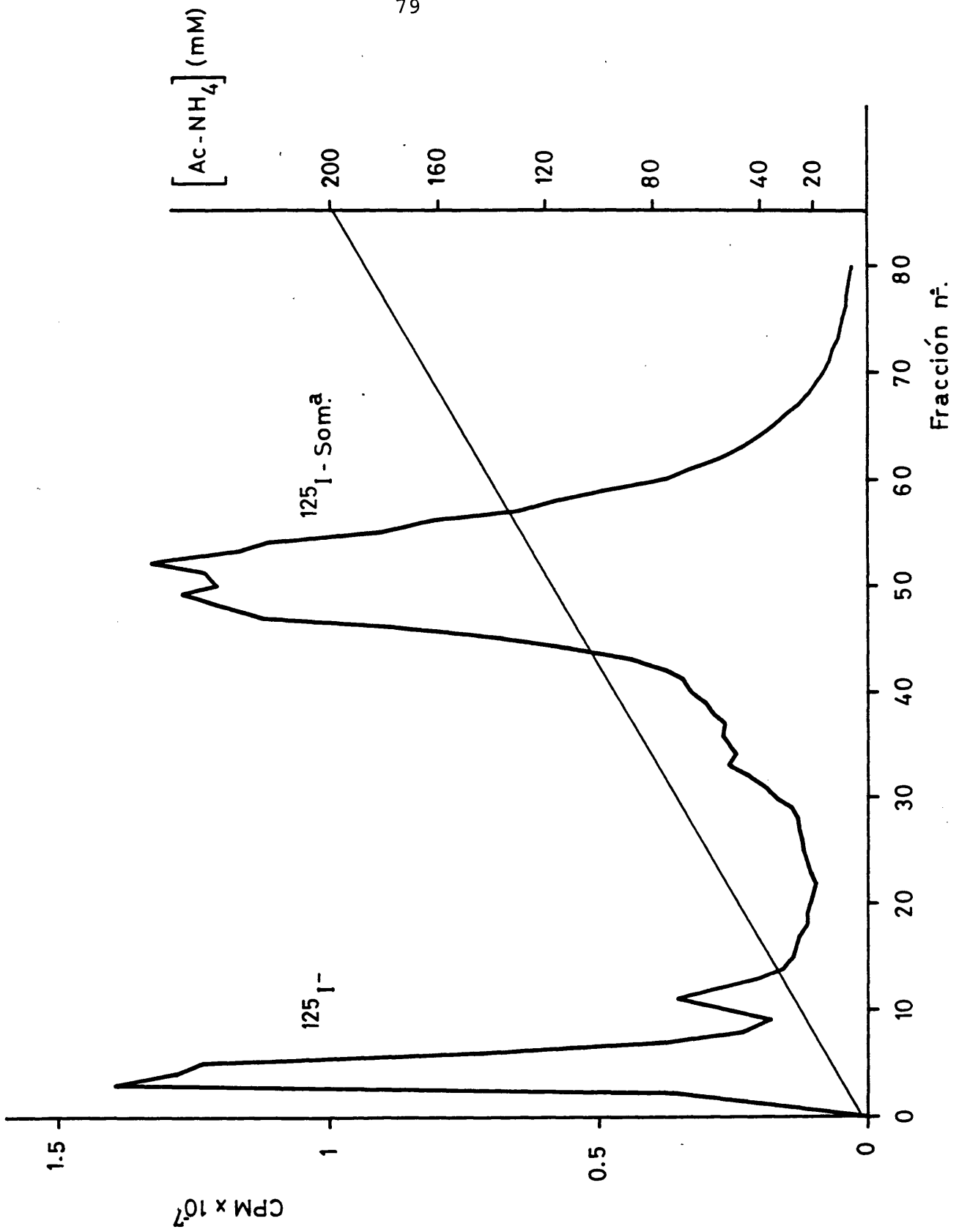


Fig. 8

Se sigue el método descrito por Efendic y cols., 1978. La somatostatina cíclica se acopla con hemocianina mediante la carbodiimida para hacerla antigénica e inmunizar conejos de raza Neozelandes-California.

Preparación del inmunógeno.

Se disolvieron 10 mg. de somatostatina cíclica (Sigma) y 50mg. de hemocianina (Sigma) en 3 ml. de agua destilada. Se añaden 400 mg. de carbodiimida (OTT Chemical Co.) en 1 ml. de agua durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción de condensación se terminó por dialisis frente a una solución isotónica de NaCl, cambiándolo 3 veces en 48 horas, a 4°C.

La solución del inmunógeno se divide en fracciones conteniendo 1 y 0,5 mg de la somatostatina añadida inicialmente. Cada una de las fracciones se emulsiona con un volumen igual de adjuvante completo de Freund (Difco). La primera inmunización se realizó inyectando subcutáneamente en el lomo de los conejos y en múltiples puntos, una fracción equivalente a 1 mg. de somatostatina acoplada. Al cabo de 30 días los conejos fueron inmunizados con la mitad de la dosis inicial del inmunógeno, y esta operación se repetió dos veces más con intervalos de 30 días.

A los diez días de la última reinmunización se sangraron los conejos mediante punción de la vena marginal de la oreja. Los sueros obtenidos fueron analizados a diluciones crecientes para estudiar su capacidad de combinación de tir^1 somatostatina ^{125}I . Se obtuvo un antisuero cuya capacidad de combinación de hormona radioyodada se re

presenta en la figura 9. Se seleccionó la dilución 1/56000 que combina alrededor de un 70% de hormona y con la que se obtienen unos buenos niveles de precisión como se demuestra en el apartado de Estadística.

C.- PRACTICA DEL RADIOINMUNOENSAYO.

Se realizó siguiendo el método de Efendic y cols. (1978), modificación del método de Arimura y cols. (1975).

Se ha utilizado una solución tampón de la siguiente composición: 0,04M Na_2HPO_4 , 0,14M NaCl , 0,025M EDTA; pH 7,4 que contiene 1% de albúmina bovina.

1.- Preparación de la dilución de anticuerpo.

Como ya dijimos, utilizamos anticuerpo a una dilución final 1/56000. Se partió de una dilución inicial del anticuerpo al 1/100. Como el volumen total de incubación es de 0,7 ml. y el anticuerpo se añade en 0,1 ml. (se diluye 7 veces), preparamos una dilución 7 veces más concentrada (1/8000) que la deseada en la mezcla final de incubación.

El volumen total a preparar dependerá del número de pruebas.

2.- Preparación de la somatostatina ^{125}I .

A cada tubo del radioinmunoensayo añadimos 0,5 ml. de somatostatina ^{125}I con una radiactividad aproximada de 5000 CPM.

El volumen total a preparar dependerá también del número de

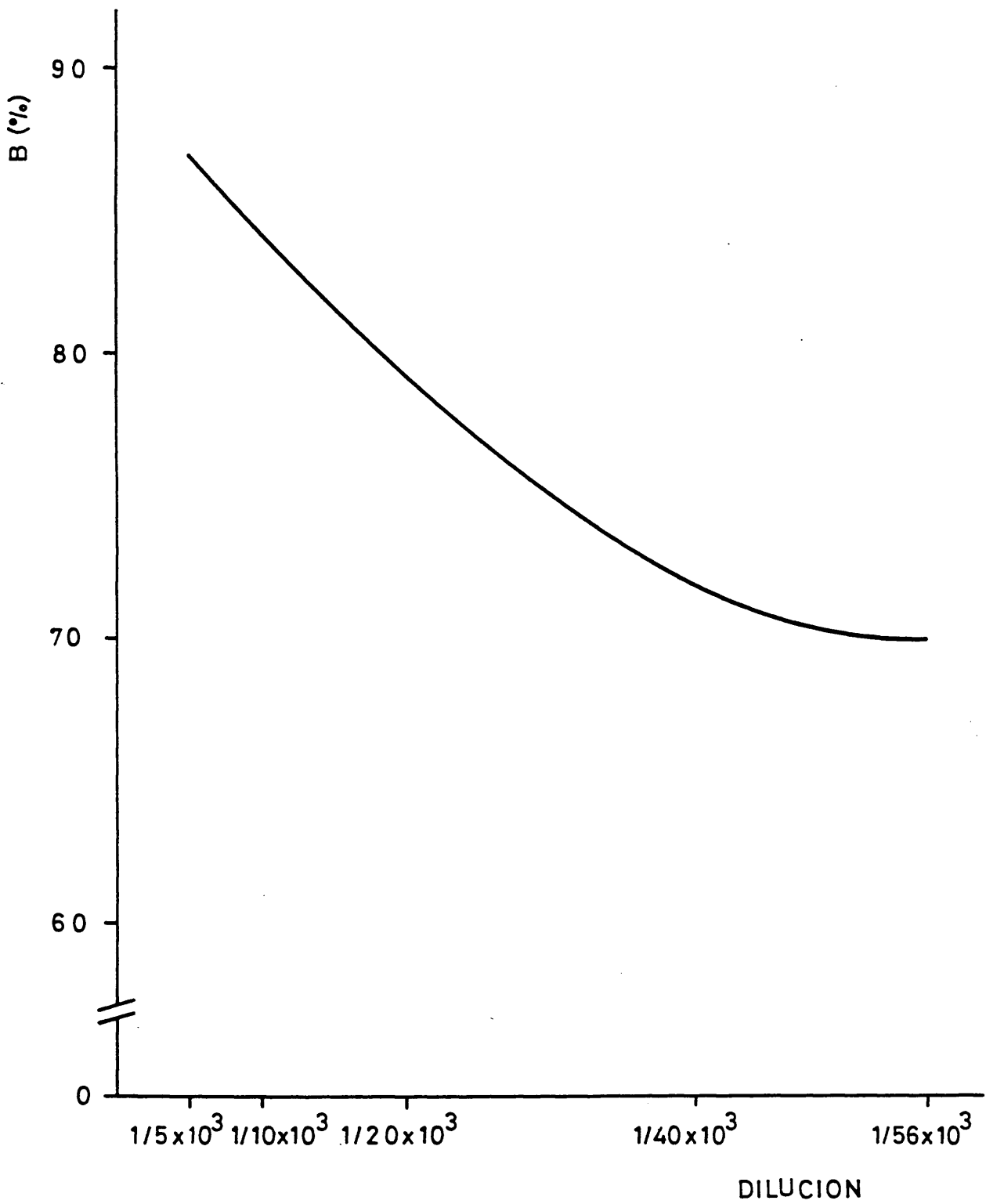


Fig. 9

pruebas.

$$V_t = (n \times 0,5) \text{ ml.}$$

3.- Preparación de la curva estandar.

a) Solución stock: Se disuelve 1 mg de somatostatina cíclica en 10 ml. de ácido acético 0,1M (10^5 ng/ml).

0,1 ml. de esta solución se diluyen hasta 100 ml. con ácido acético 0,1M, conteniendo 0,1% de albúmina bovina, quedando a una concentración de 100 ng/ml.

b) 0,1 ml. de la solución de 100 ng/ml se diluyen con 3 ml. de tampón de radioinmunoensayo, conteniendo albúmina bovina al 1%. Obtendremos una solución que tiene 320 pg/0,1 ml, que se almacena en fracciones de 0,4 ml. a -20°C y a partir de la cual se prepara la curva estandar según el siguiente esquema:

0,4 ml (320 pg/0,1 ml)	+ 0,4 ml tampón	160 pg/0,1 ml
0,5 ml (160 pg/0,1 ml)	+ 0,5 ml tampón	80 pg/0,1 ml
0,5 ml (80 pg/0,1 ml)	+ 0,5 ml Tampón	40 pg/0,1 ml
0,5 ml (40 pg/0,1 ml)	+ 0,5 ml tampón	20 pg/0,1 ml
0,5 ml (20 pg/0,1 ml)	+ 0,5 ml tampón	10 pg/0,1 ml
0,5 ml (10 pg/0,1 ml)	+ 0,5 ml tampón	5 pg/0,1 ml
0,5 ml (5 pg/0,1 ml)	+ 0,5 ml tampón	2,5 pg/0,1 ml
0,5 ml (2,5 pg/0,1 ml)	+ 0,5 ml tampón	1 pg/0,1 ml

Cada dilución de la curva estandar se pipeteó por triplicado según el siguiente esquema, cuyo volumen final es de 0,7 ml.:

0,1 ml dilución curva estandar
 0,5 ml somatostatina ^{125}I
 0,1 ml anticuerpo dilución 1/8000
 ———
 0,7 ml

Se preparan además 5 tubos que solo contienen somatostatina ^{125}I , rotulados como AT, y 5 tubos en los que el anticuerpo se sustituye por tampón de radioinmunoensayo, rotulados como A, que nos servirán para medir la eficacia del método de separación.

4.- Preparación de las muestras.

0,1 ml. de las muestras del líquido de perfusión se recogen con trasylol (Bayer) y se almacena a -20°C hasta su determinación.

De forma análoga a la curva estandar, se pipetearon en el siguiente orden:

0.1 ml muestra
 0,5 ml somatostatina ^{125}I
 0,1 ml anticuerpo dilución 1/8000

Una vez pipeteados los tubos de la curva y las muestras se incubaron en la cámara fría a $+4^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.

5.- Separación de la somatostatina libre de la ligada al anticuerpo.

Se prepara una suspensión de carbón-dextrano (0,25% carbón y 0,025% dextrano) en tampón fosfato que contiene 0,9% de ClNa.

Se añade 1 ml. de esta suspensión a cada tubo, excepto los rotulados como AT, y se mantienen a +4°C durante 45 minutos, pasados los cuales se centrifugan durante 15 minutos a 3000 rpm. A continuación se aspira el sobrenadante de cada uno de los tubos, midiendo la radiactividad del precipitado en un contador gamma.

6.- Ajuste de la curva de calibración.

Se ajustaron las variables x (pg somatostatina fría) e y (CPM) a la ecuación general de una hipérbola (J. Tamarit, 1965):

$$(y - b) (x + a) = k$$

El ajuste de los valores experimentales a esta función se realizó por el método de mínimos cuadrados.

7.- Cálculo de la concentración de somatostatina en las muestras.

Una vez calculados los parámetros a, b y k se puede calcular la concentración de somatostatina en las muestras mediante la siguiente expresión:

$$x \text{ (pg/ml)} = \frac{k}{y-b}$$

En todos los experimentos se expresó la secreción de somatostatina en pg/min./islote.

D.- ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO.

Para estudiar la especificidad del anticuerpo se hicieron curvas de calibración en las que se sustituyó la somatostatina fría por los análogos B-167 y B-172 a distintas concentraciones:

- 1.- Equimolar con la concentración de somatostatina cíclica.
- 2.- Diez veces más concentrada.
- 3.- Mil veces más concentrada.

Como se observa en la figura 10 el análogo B-172 llega a desplazar la Tir¹ somatostatina ¹²⁵I de su combinación con el anticuerpo a concentraciones mil veces superiores a las requeridas de somatostatina cíclica. La figura 11 demuestra que el análogo B-167 no es capaz de desplazar la Tir¹ somatostatina ¹²⁵I a concentraciones mil veces superiores a las de somatostatina cíclica. Ello indica que el antisuero está dirigido contra la secuencia de aminoácidos: Fen-Fen-Trip.

Esta especificidad es análoga a la descrita para el antisuero 141C (Arimura y cols., 1978).

También se demuestra que el anticuerpo no presenta reacciones cruzadas con insulina ni glucagón cuando se realizan curvas estandar de somatostatina en presencia de 100 pg/tubo de cualquiera de estas hormonas (Fig. 12).

E.- ESTADISTICA

1.- Validación.

Como en el caso de la insulina y glucagón, aplicamos los criterios de validación a una curva estandar representativa (Fig.13).

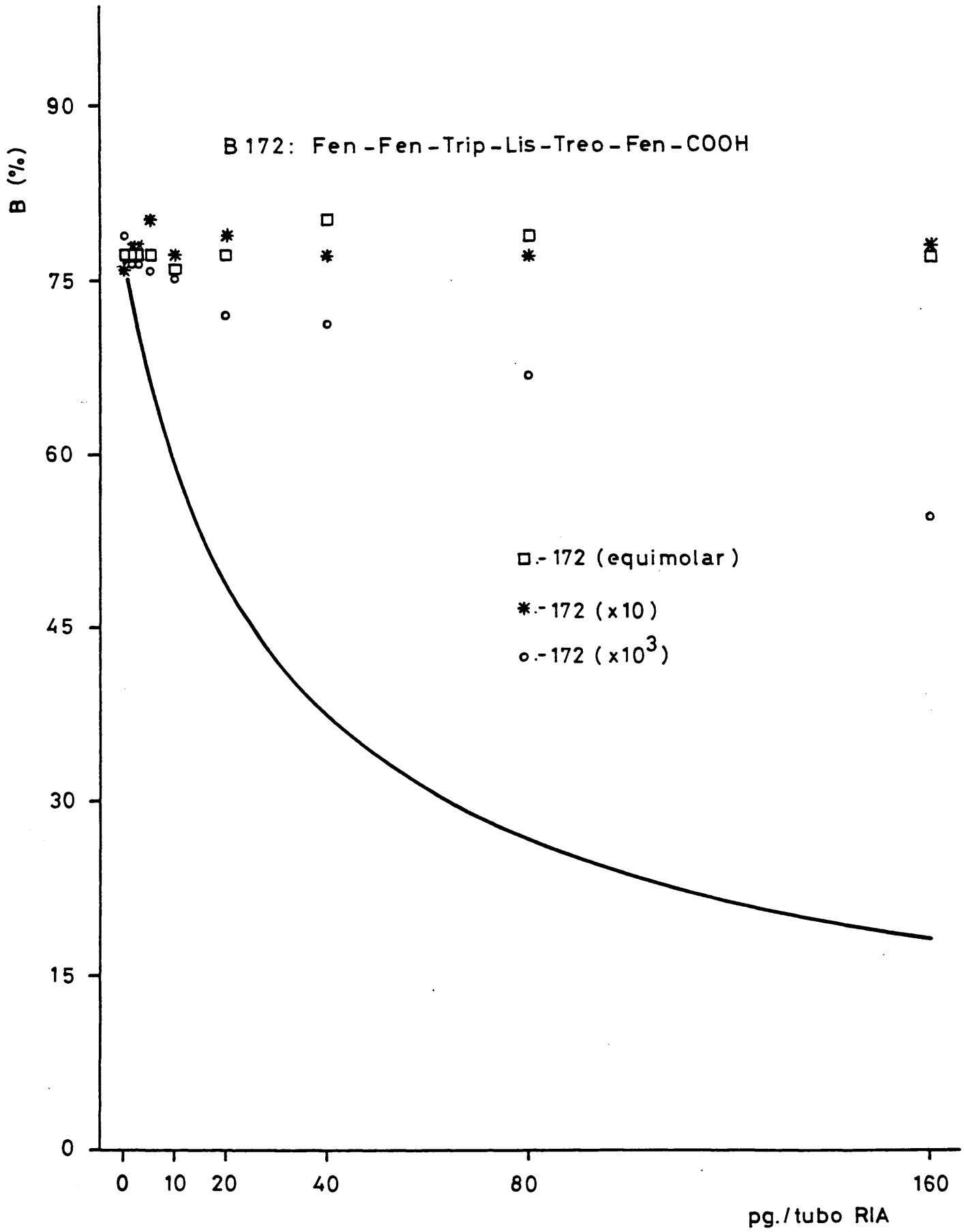


Fig. 10

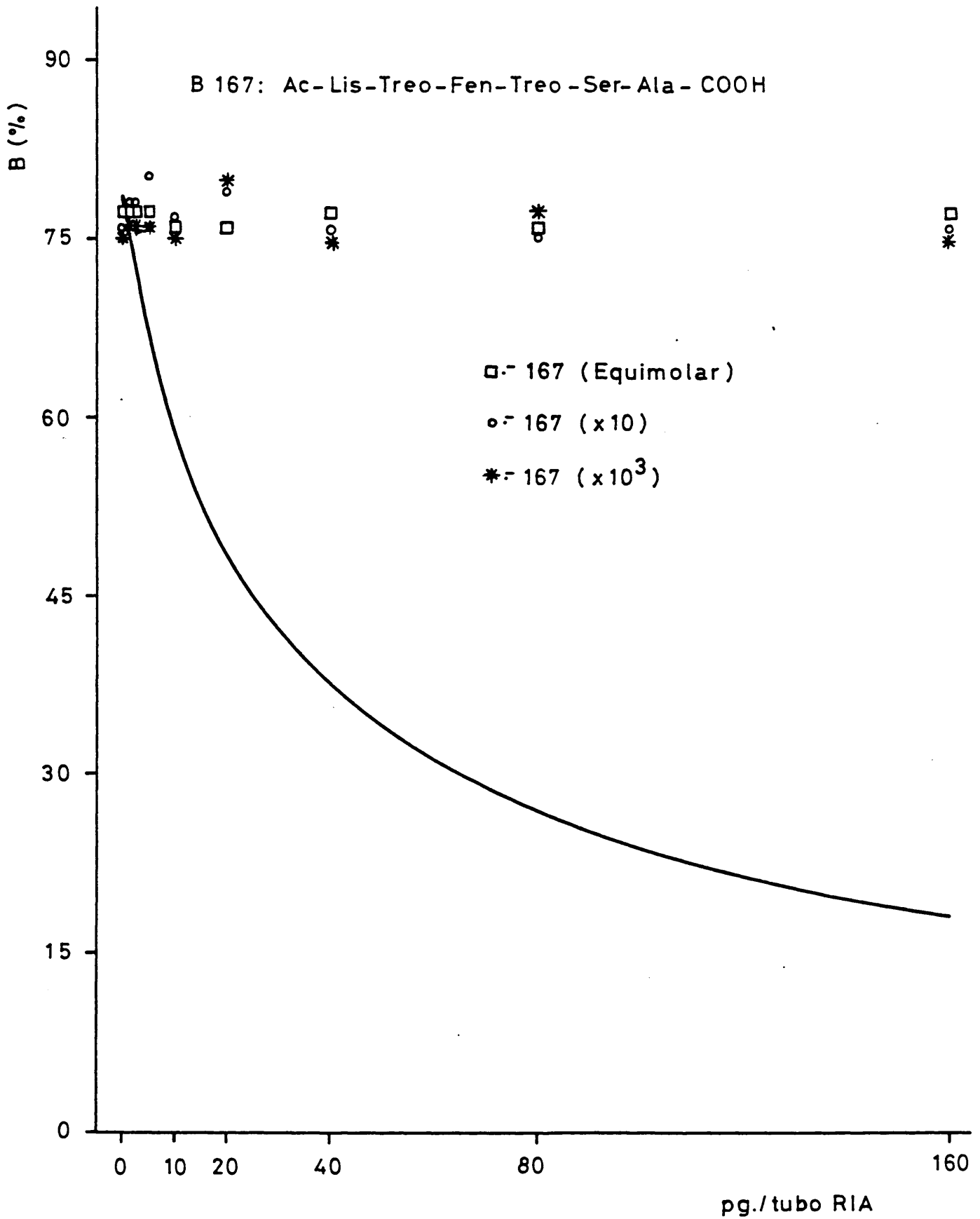


Fig. 11

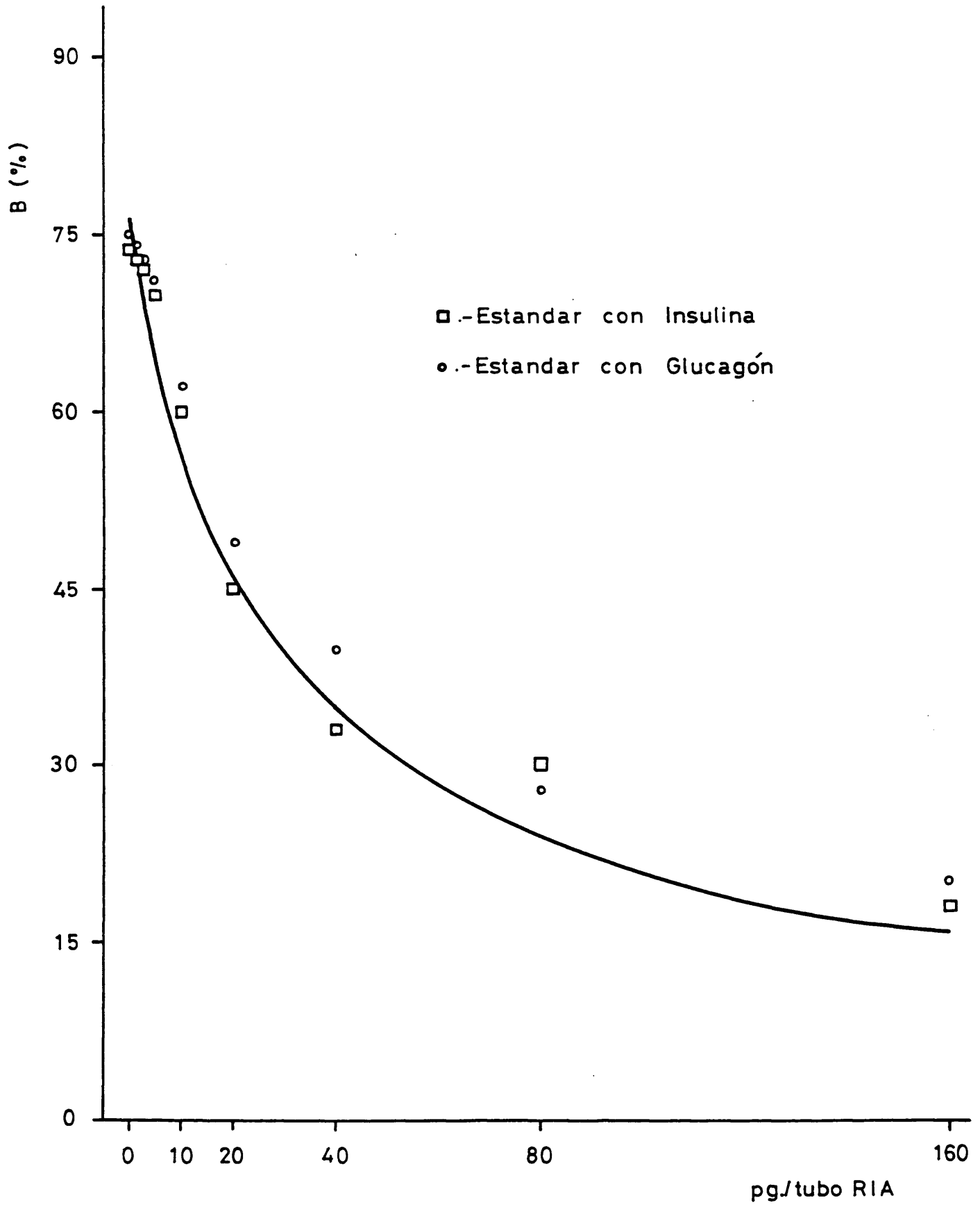


Fig. 12

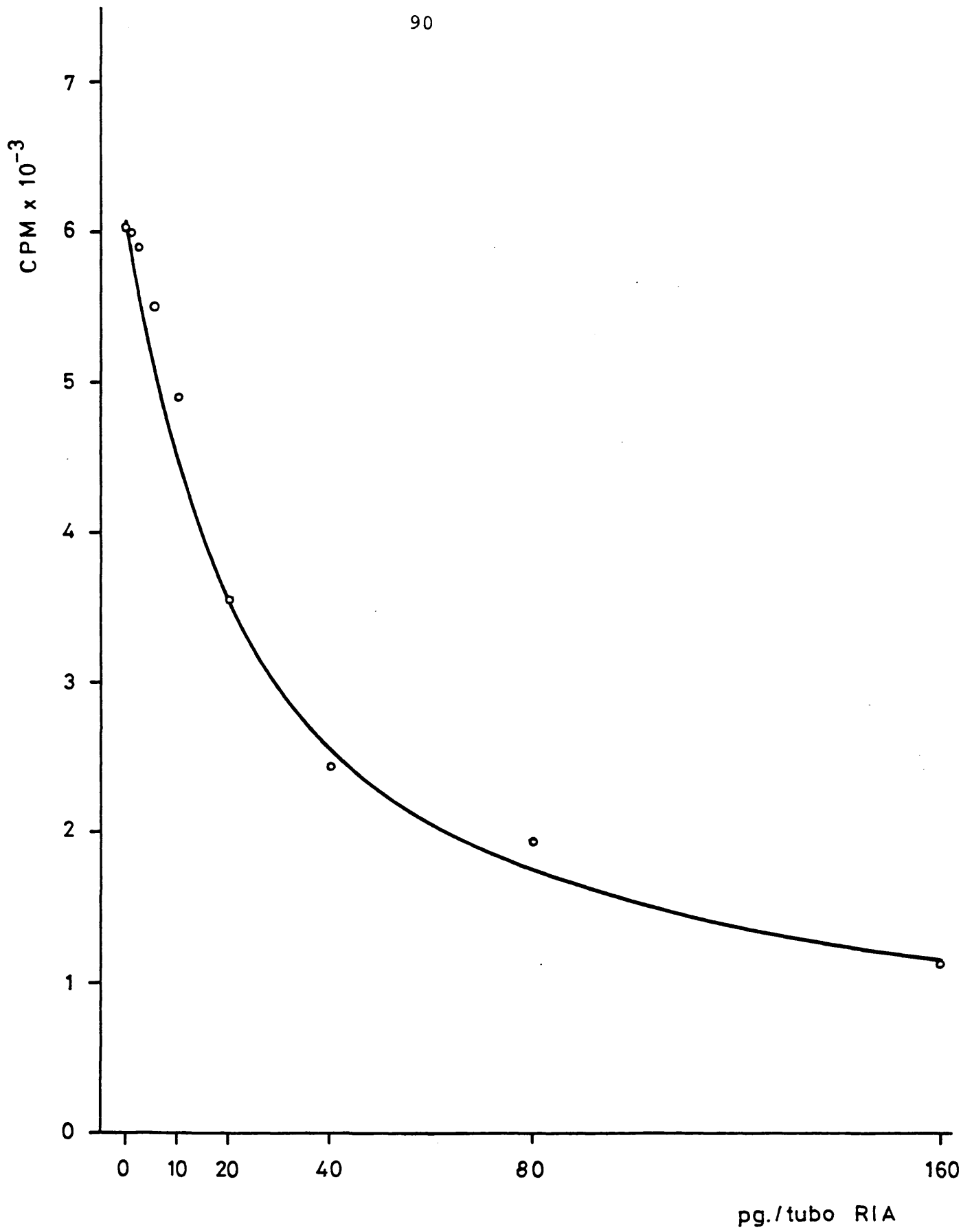


Fig. 13

a) Curva estandar de somatostatina

Tabla 9

	Y (CPM)	$\sum(\bar{y} - \bar{y})^2$	$\sum(\bar{y} - y)^2$	L_n	$1/L_n$
AT	7,28835	12,01713	0,015725	2	0,5
A	6,56267	7,51257	0,004339	2	0,5
0	1,2640	6,54214	0,000070	2	0,5
1,25	1,2783	6,4902	0,000003	2	0,5
2,5	1,3843	5,94105	0,002451	2	0,5
5	1,7750	4,18923	0,051486	2	0,5
10	2,377	2,08733	0,028550	2	0,5
20	3,754	0,00459	0,013544	2	0,5
40	4,845	1,04702	0,010838	2	0,5
80	5,37033	2,39807	0,032081	2	0,5
160	6,56267	5,37577	0,003445	2	0,5

b.- Análisis de la varianza.

Se descompone la varianza como en los radioinmunoensayos de insulina y glucagón.

TABLA 10

Concepto	Suma de cuadrados	L	S
General	160,9143400	32	5,0286
Entre concentraciones	160,7517298	10	16,0751
Intra concentraciones	0,1625340	22	0,0074

F= 2172,31081 valor crítico= 3,26 P= 0,01

Se puede ver que la varianza entre concentraciones es mayor que la intra concentraciones, lo que indica que el ensayo es vá lido.

c.- Test de Bartlett.

Se aplicó este test para comprobar que la varianza de las CPM en la fracción de insulina libre para las distintas con cen traciones de insulina fria de la curva de calibración es homogé nea.

$$E.B. = 2,306 \times \frac{L_i \log s_i^2 - \sum L_n \log s_n^2}{K}$$

$$k = 1 + \frac{\sum \frac{1}{L_n} - \frac{1}{L_i}}{3(n-1)}$$

$$L_i \quad 1/L_i \quad L_i \log s_i^2 \quad \sum L_n \quad \sum 1/L_n \quad \sum L_n \log s_n^2$$

22 1/22 -46,89252 22 5,5 -60,8309308

K= 1,81666

E.B.= 12,0225469 valor crítico= 29,588 P= 0,001

Por lo tanto la varianza del parámetro medido (CPM) correspondiente a las distintas concentraciones de somatostatina fría de la curva estandar es homogénea.

d.- Test de Duncan.

Error estandar de la media= 0,04962

TABLA 11

x	CPM	$2\alpha < 0,001$	Límite
0	1,2640		
1,25	1,2783	3,99	1,0803
2,5	1,2783	4,17	1,7740
5	1,7750	4,23	1,5626
10	1,3770	4,36	2,1606
20	3,7540	4,42	3,5346
40	4,8450	4,48	4,6227
80	5,3703	4,53	5,1455
160	6,1403	4,57	5,9135
A	6,5626	4,6	6,3344
AT	7,2883	4,63	7,0586

Vemos que diferencia todas las concentraciones de somatostaa

tina fría de la curva estándar, excepto 0 y 1,25 pg/tubo.

e.- Perfil de precisión.

En la tabla 12 indicamos los errores absolutos y relativos correspondientes a las distintas concentraciones de somatostatina cíclica de una curva estándar representativa.

TABLA 12

$$s_y = 0.00738791$$

x	s_x	s_x/x	s_x/x (%)
0	0,03202		
1,25	0,03535	0,02828	2,8280
2,5	0,03885	0,01554	1,5540
5	0,04635	0,00927	0,9270
10	0,06332	0,006332	0,6332
20	0,10518	0,00526	0,5260
40	0,2206	0,00552	0,5520
80	0,57825	0,00723	0,7230
160	1,80073	0,01125	1,1250

Sensibilidad

En la Figura 14 representamos el perfil de precisión de la curva. La zona de mínimo error del radioinmunoensayo corresponde al intervalo de concentraciones comprendido entre 10 y 80pg / tubo.

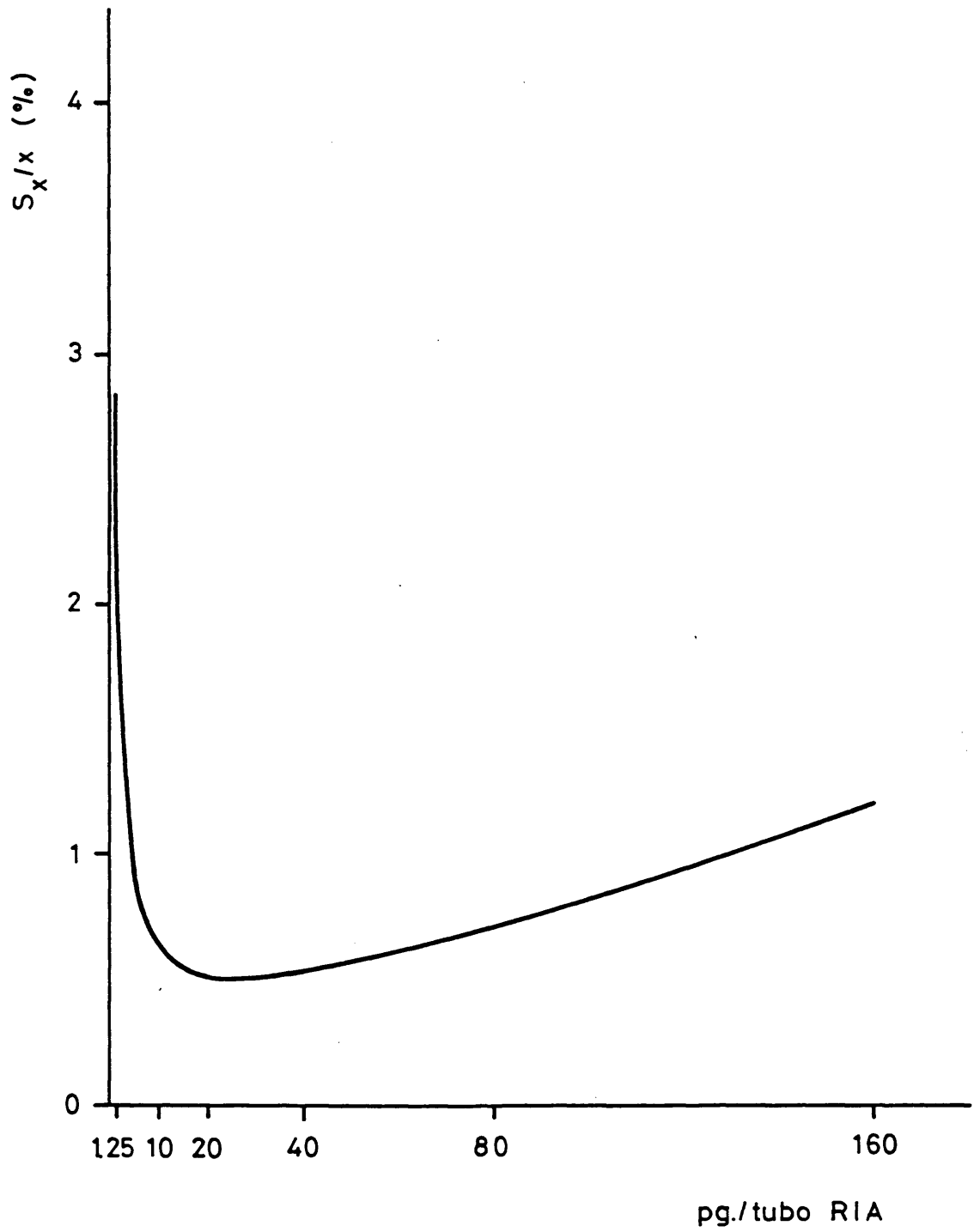


Fig. 14

2.- Comparación estadística entre experimentos.

Los distintos experimentos se compararon aplicando el test estadístico de la "t" de Student para pequeño número de casos y muestras no apareadas.

V.-MEDIDA DEL CONTENIDO DE INSULINA, SOMATOSTATINA Y GLUCAGON.

Cincuenta islotes aislados con colagenasa se sonicaron en 0,5 ml. de ácido acético 0,2M durante 5 segundos (microsonda, sonicador Branson). Se separaron distintas alicuotas que se almacenaron congeladas a -20°C hasta el momento de la determinación de insulina, glucagón y somatostatina.

VI.- OXIDACION DE D-(U- ^{14}C) GLUCOSA.

1.- Material.

- Krebs-Hepes: Es un Krebs-Ringer modificado en el que se sustituye el bicarbonato por una cantidad equimolar de Hepes (ácido N-2 Hidroxietilpiperacina-N'2-etanosulfónico Sigma).
- ClH 0,5M.
- D-(U- ^{14}C)-glucosa (Radiochemical Center, Amersham).
- Hiamina (Packard).
- Líquido de centelleo:

5 g. PPO

0,05 g. PoPoP

1 litro toluol

2.- Método.

Medio de incubación: Se liofilizan 10 μ l de D-(U- 14 C)-glucosa (292 mCi/mmol) y se redisuelven con 300 μ l de Krebs-Hepes conteniendo 0,50 % de albúmina bovina y glucosa 3 ó 20 mM (11,11 y 1,6 mCi/mmol respectivamente). Se pipetea alicuotas de 50 μ l en tubos de poliestireno de 0,4 ml. (Beckman) provisto de una apertura lateral y suspendidos dentro de un vial de centelleo (Fig. 15).

Se transfieren 10 islotes a cada vial de poliestireno. Tras cerrar herméticamente los viales de centelleo se incuban durante 2 horas a 37°C con agitación suave. Se detiene la incubación añadiendo 10 μ l de HCl 0,5 M al tubo interior y 0,5 ml. de hiamina al vial exterior. El 14 CO₂ desprendido por el clorhídrico se recoge en la hiamina agitando durante una hora a temperatura ambiente. A continuación se retira el vial interior de poliestireno, se añaden 10 ml. de la mezcla de centelleo y se cuenta la radiactividad (Mark II, Nuclear Chicago).

En cada experimento se incuban 2 viales de cada medio de incubación sin islotes para corregir la producción espontánea de 14 CO₂ (Blancos), cuya radiactividad se restó del medio de incubación midiendo la radiactividad en alicuotas de 5 μ l por triplicado.

Los resultados se expresan en pmol/islote/hora de equivalentes de glucosa con igual actividad específica a la del medio de incubación.

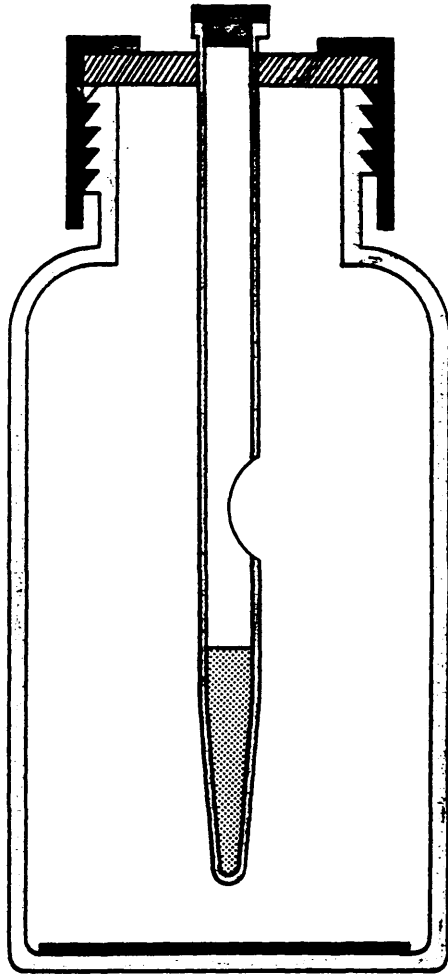


Fig. 15

VI.- GLICOLISIS.

1.- Material.

- Krebs-Hepes
- HCl 0,4M.
- D-(5-³H)-glucosa (Radiochemical Center, Amersham)
- Líquido de centelleo (PCS. Amersham)

2.- Método.

La velocidad de glicolisis se valoró midiendo la producción de ³H₂O a partir de D-(5-³H)-glucosa (Ashcroft y cols., 1972).

Medio de incubación: Se liofilizan 10 μ l de D-(5-³H)-glucosa que se redisuelven en 200 μ l de Krebs Hepes conteniendo 0,5% de albúmina bovina y glucosa 3 ó 20mM (16,6 y 2,5 mCi/mmol respectivamente de actividad específica). Se pipetea 20 μ l en viales de poliestireno en cada uno de los cuales se transfieren 10 islotes. Estos viales se introducen en viales de centelleo conteniendo 0,5 ml. de agua destilada que se cierran herméticamente y se incuban a 37°C durante 2 horas con agitación suave. La incubación se detiene añadiendo 5 μ l de HCl 0,4M en el vial interior y se continúa la incubación a 37°C con agitación suave durante 12 horas para permitir un equilibrio de reparto del ³H₂O formada entre el vial interior y el exterior. Una vez retirado el vial interior se añaden 5 ml. de la mezcla de centelleo y se cuenta su radiactividad.

En cada experimento se procesaron viales sin islotes (Blan

cos) cuya radiactividad (producción espontanea de $^3\text{H}_2\text{O}$) se resta a todas las muestras. La actividad especifica se calculó midiendo alicuotas de 5 μl del medio de incubación. Los resultados se expresan en pmol/islote/hora de equivalentes de glucosa de igual actividad especifica a la del medio de incubación.

RESULTADOS

a.- EFECTO DEL AYUNO SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA.

En la Fig. 16 representamos la secreción media de insulina de seis perifusiones control (ratas alimentadas) y de ocho perifusiones con islotes de ratas ayunadas 48 horas, y sus correspondientes desviaciones estandar.

Trás 30 minutos de perifusión con glucosa 3mM (período de estabilización) la secreción de insulina es estimulada aproximadamente 4 veces al aumentar la concentración de glucosa a 20 mM (periodo de estimulación) en las ratas controles (ratas alimentadas). La cantidad total de insulina segregada por islotes de animales ayunados durante el periodo de estimulación es significativamente menor a la de los controles (Tabla 13).

b.- EFECTO DEL 2-BROMOESTEARATO SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA.

En la Fig. 17 se representa la secreción media de insulina de seis perifusiones con islotes de ratas alimentadas y seis perifusiones con islotes de los mismos animales en las que se añadió 2-bromoestearato 0,25mM durante los periodos de estabilización y de estimulación. La cantidad total de insulina segregada por islotes de ratas alimentadas en presencia de 2-bromoestearato no se modifica respecto a la de islotes del mismo animal perifundidos sin 2-bromoestearato (Tabla 13).

Se estudió a continuación el efecto del 2-bromoestearato 0,25mM sobre la secreción de insulina por islotes de ratas ayu

nadas 48 horas.

En la Fig. 18 se representa la secreción media de insulina con sus correspondientes desviaciones estandar de seis perfusiones con islotes de ratas ayunadas 48 horas y seis perfusiones con islotes de la misma rata en las que se añadió 2-bromoestearato 0,25mM durante toda la perfusión. La cantidad total de insulina segregada por islotes de ratas ayunadas, en respuesta a glucosa 20mM cuando se añade 2-bromoestearato al medio de perfusión es significativamente mayor que la segregada por islotes de la misma rata en ausencia de 2-bromoestearato, alcanzando un valor semejante al de los controles (islotes de ratas alimentadas) (Tabla 13).

Para comprobar que el 2-bromoestearato no tiene un efecto estimulador directo sobre la secreción de insulina en respuesta a glucosa 20mM durante el ayuno, se hicieron una serie de perfusiones en las que el 2-bromoestearato se añadió solo durante el periodo de estabilización con glucosa 3mM. La cantidad total de insulina segregada por islotes de ratas ayunadas y perfundidas con 2-bromoestearato es significativamente mayor que en los controles (Fig. 19, Tabla 13).

El aumento de la secreción de insulina durante el ayuno, inducido por el 2-bromoestearato, podría atribuirse a la capacidad de los ácidos grasos de estimular la secreción de insulina (Malaisse y cols., 1968; Goberna y cols., 1974). Por esta razón se hicieron una serie de perfusiones con islotes de ratas ayunadas

en las que se utilizó ácido esteárico 0,25mM como análogo estructural del 2-bromoestearato. La perifusión con esteárico durante ambos periodos de estabilización y de estimulación solo aumento, ligera pero significativamente, la cantidad total de insulina segregada durante los minutos 11 a 30 del periodo de estimulación (Fig. 20).

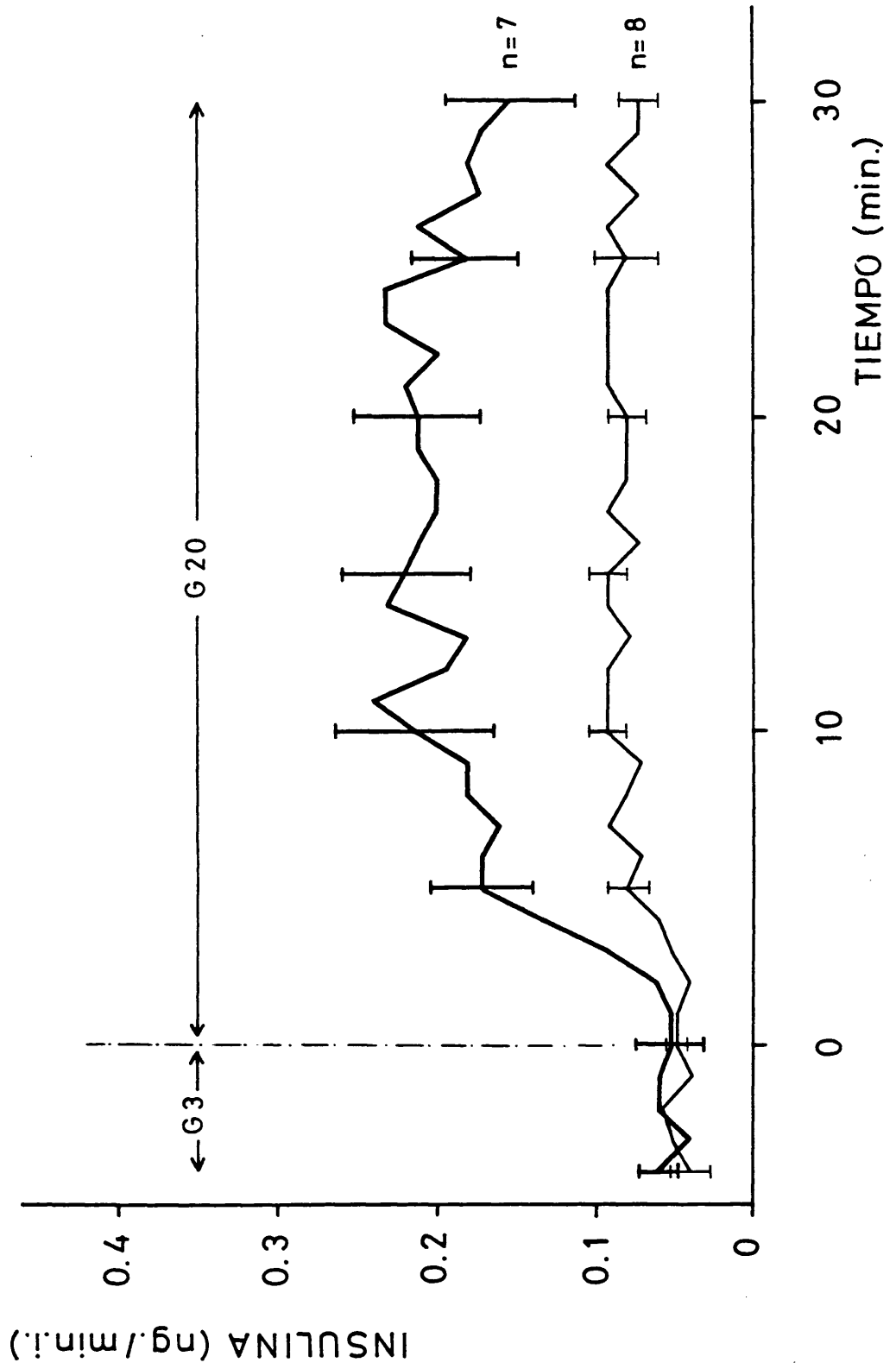


Fig. 16

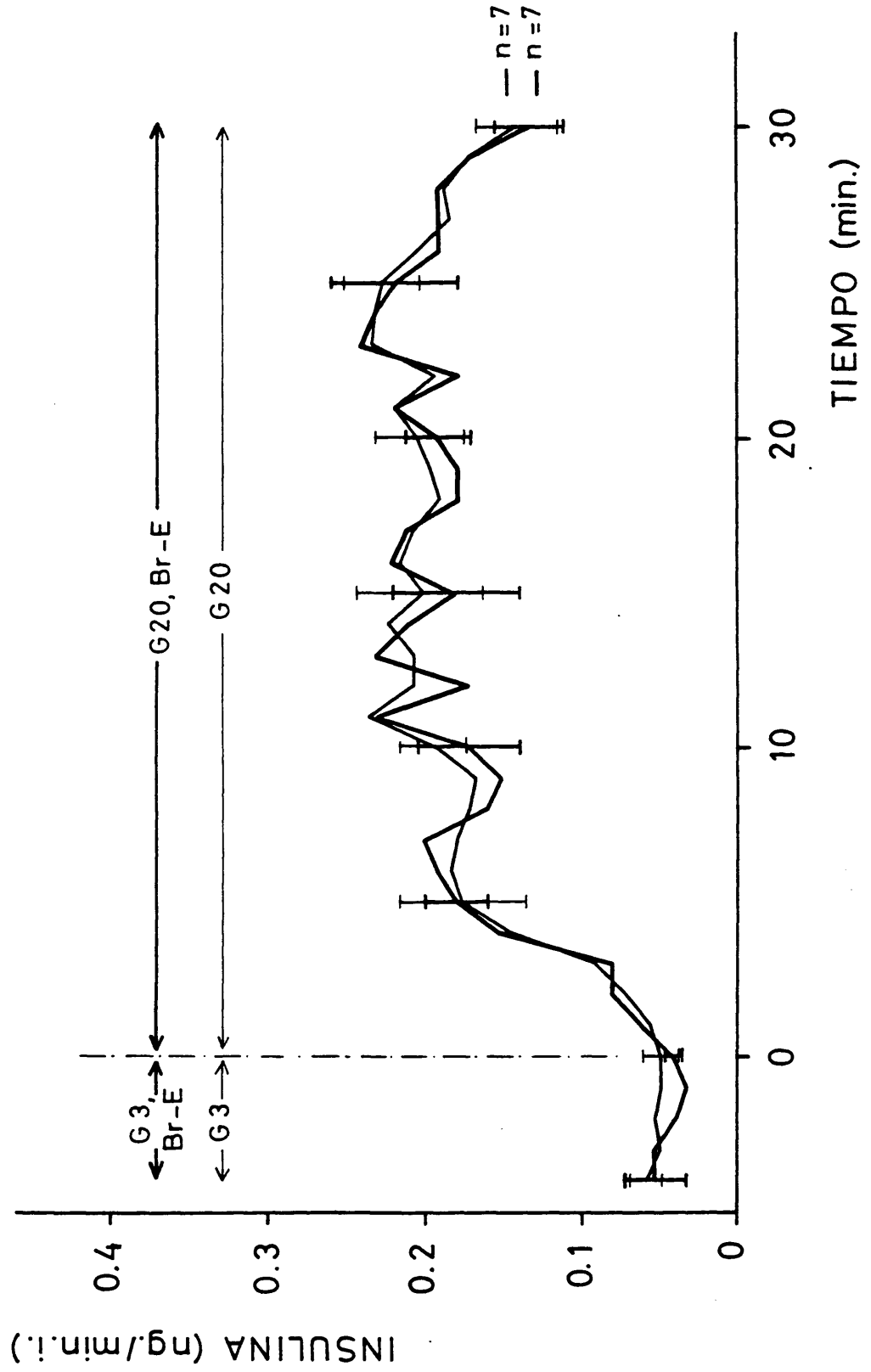


Fig. 17

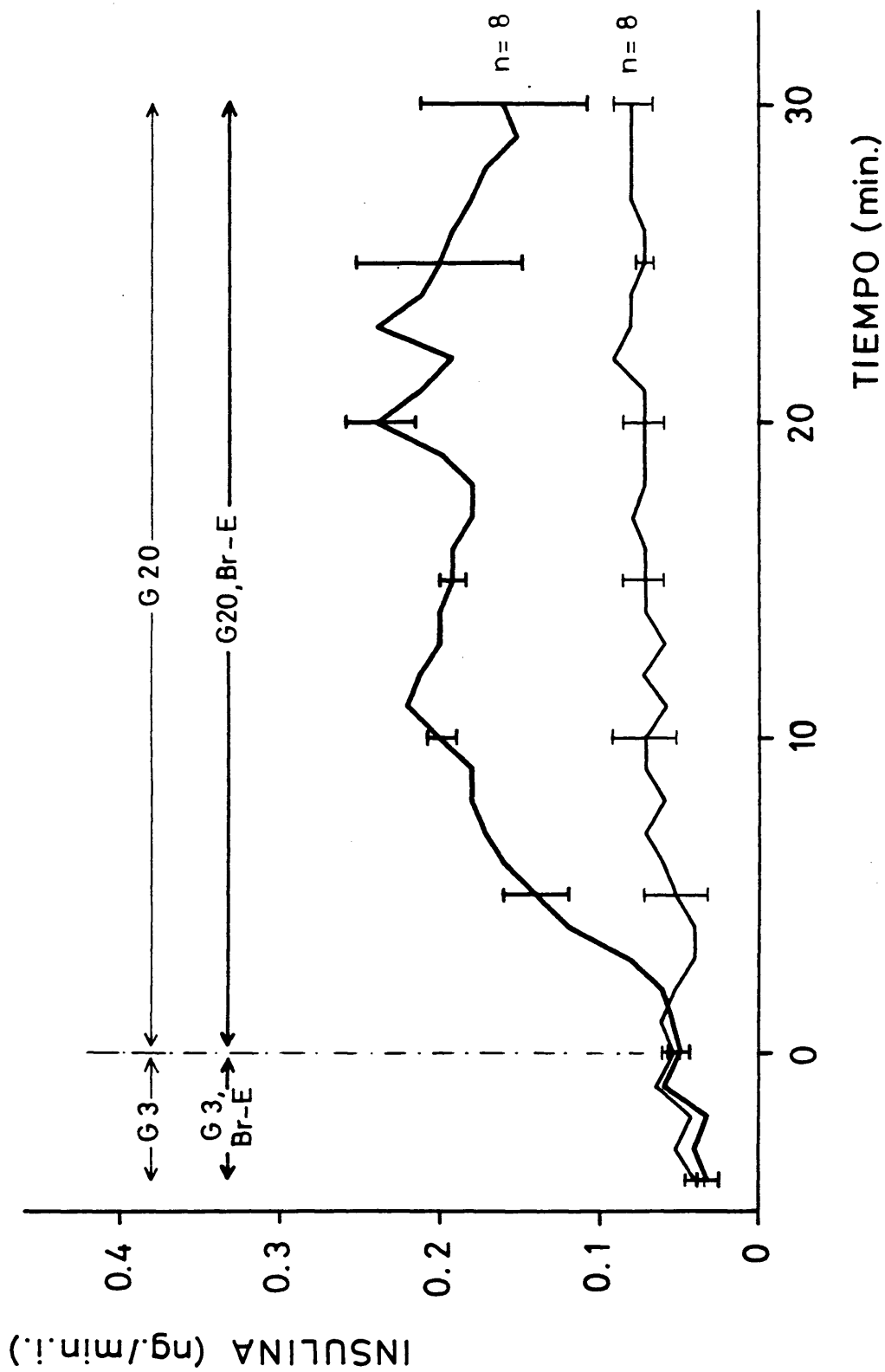


Fig. 18

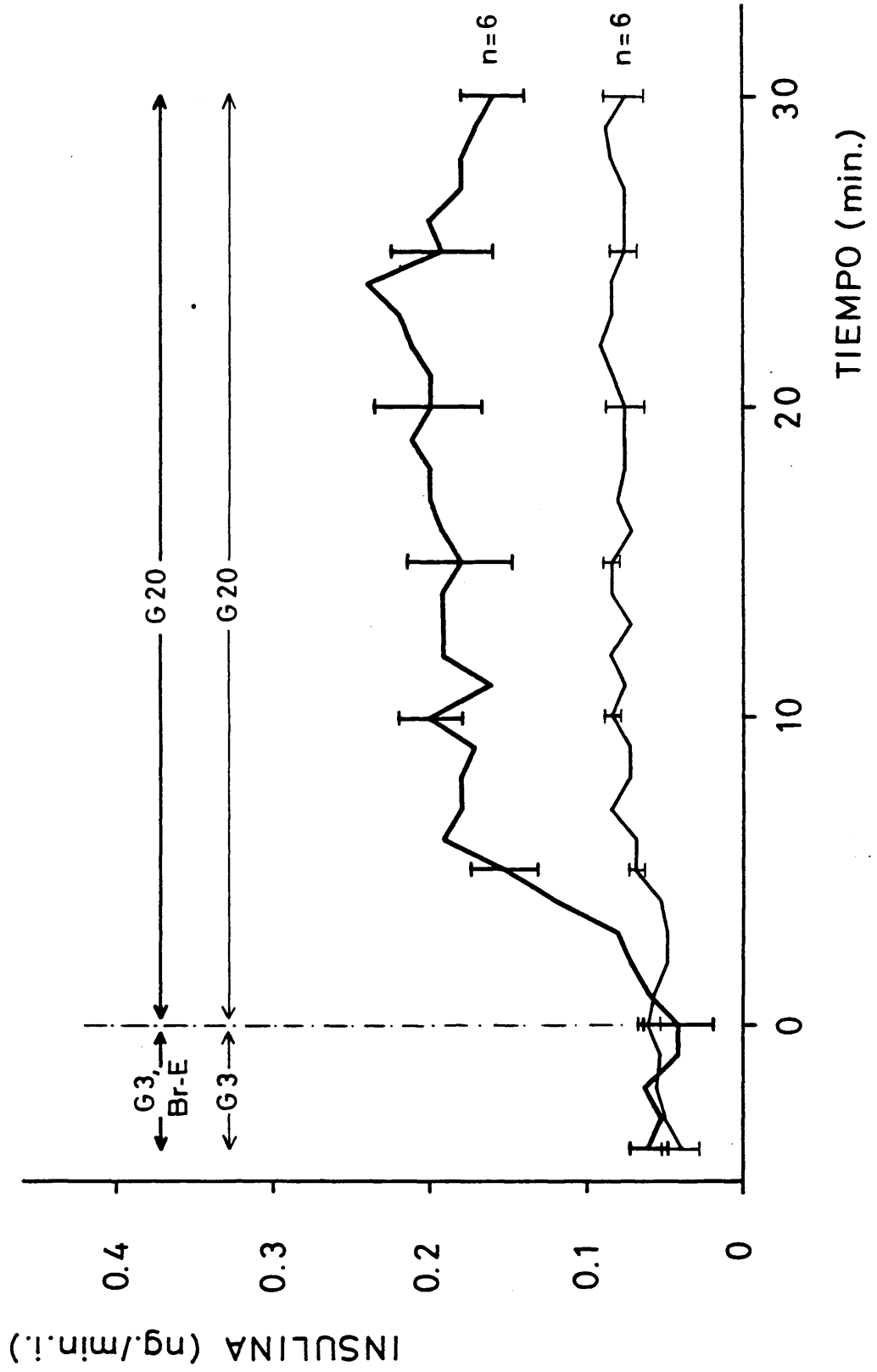


Fig. 19

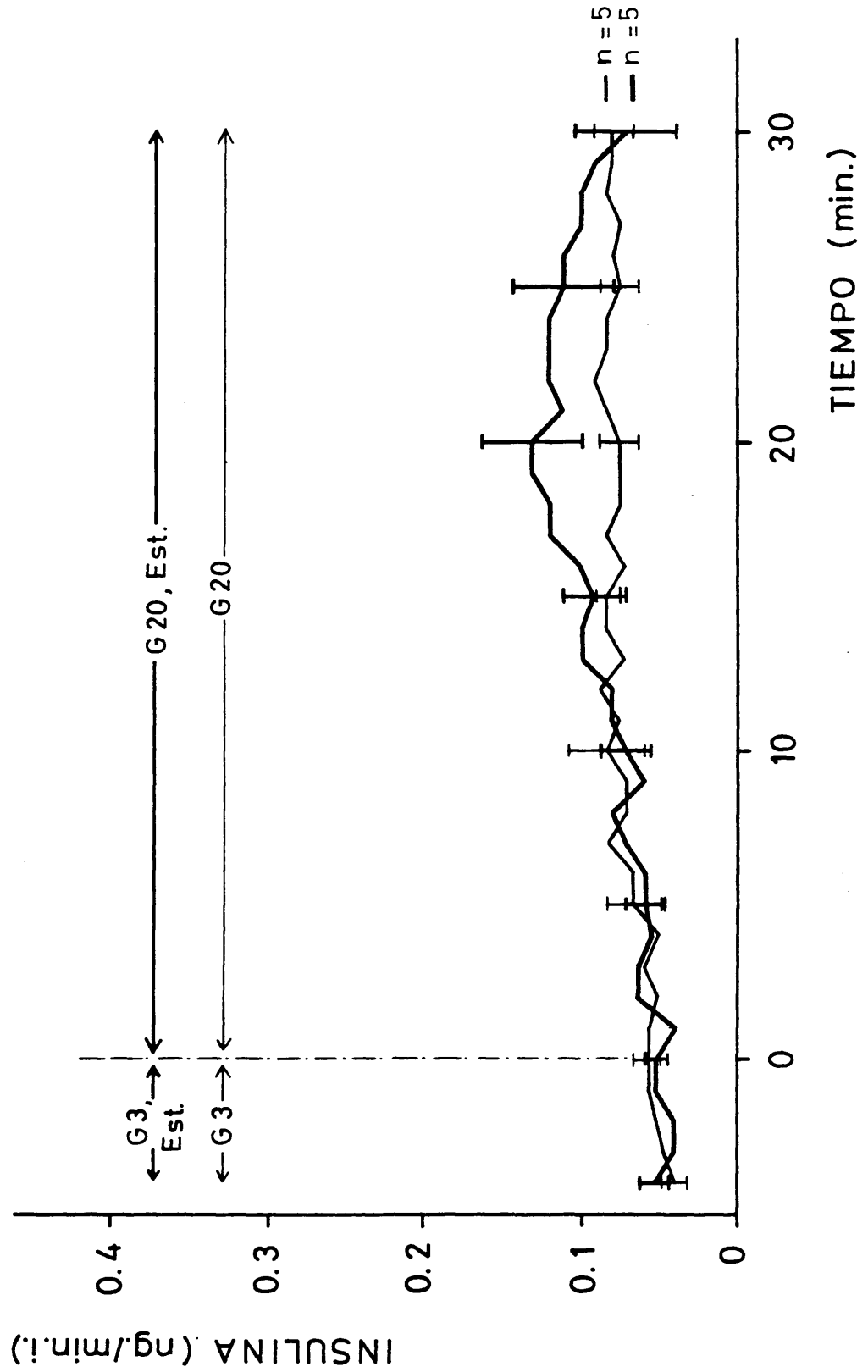


Fig. 20

Tabla 13

Estado nutricional	Aditivos		Cantidad total de insulina		p
	p.estabilización (-30 a 0 min.)	p.estimulación (0 a 30 min)	(0 - 10 min)	(11 - 30 min)	
1.ratas aliment.	G ₃	G ₂₀	1,41 ± 0,20	4,16 ± 0,51	(7) (7) -
2.ratas aliment.	G ₃ + BrE	G ₂₀ + BrE	1,47 ± 0,41	4,10 ± 0,51	(7) (7) NS
3.ayuno 48 h.	G ₃	G ₂₀	0,51 ± 0,09	1,46 ± 0,20	(8) (8) -
4.ayuno 48 h.	G ₃ + BrE	G ₂₀ + BrE	1,39 ± 0,10*	4,01 ± 0,31*	(8) (8) 0,001
5.ayuno 48 h.	G ₃	G ₂₀	0,52 ± 0,10	1,6 ± 0,52	(6) (6) -
6.ayuno 48 h.	G ₃ + BrE	G ₂₀	1,40 ± 0,10*	4,02 ± 0,53*	(6) (6) 0,001
7.ayuno 48 h.	G ₃	G ₂₀	0,44 ± 0,07	1,42 ± 0,43	(5) (5) -
8.ayuno 48 h.	G ₃ + BrE	G ₂₀ + BrE	0,55 ± 0,2	2,09 ± 0,5	(5) (5) NS

* NS: comparado con la línea 1

p : comparado con la línea 1

c.- EFECTO DEL ACIDO PALMITICO.

Se estudió el efecto del ácido palmítico 0,5mM sobre la se creción de insulina por islotes de ratas alimentadas en respuesta a distintas concentraciones de glucosa.

La perfusión con glucosa 5mM, con o sin ácido palmítico, no estimuló la secreción de insulina (Fig. 21, Tabla 14). El au mento de la concentración de glucosa a 6mM no produce por si mismo un estímulo de la secreción de insulina, pero la adición de ácido palmítico 0,5mM induce un pico rápido y transitorio de se creción que se traduce en un aumento significativo de la cantidad total de insulina segregada durante los minutos 0 a 10 del periodo de estimulación (Fig. 22, Tabla 14). El 2-bromoestearato 0,25mM carece de efecto insulinosecretor en presencia de glucosa 6mM (Fig. 23, Tabla 14). La perfusión simultanea con 2-bromoes tearato (0,25mM) y palmítico (0,5mM) en presencia de glucosa 6mM estimula la secreción de insulina hasta niveles similares a los obtenidos en presencia de palmítico solamente pero con la diferencia de que se mantienen estacionarios durante todo el periodo de perfusión (Fig. 24, Tabla 14).

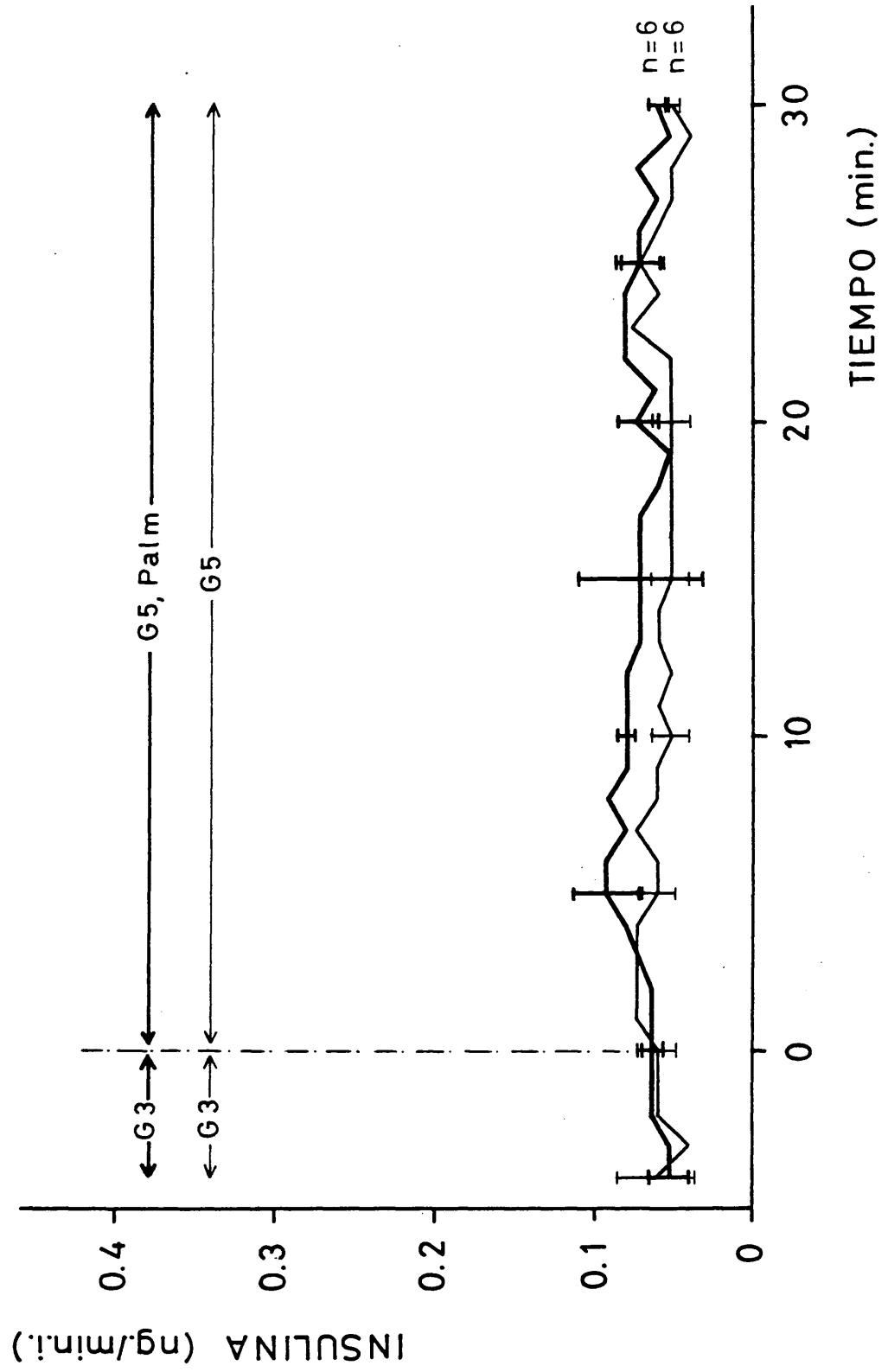


Fig. 21

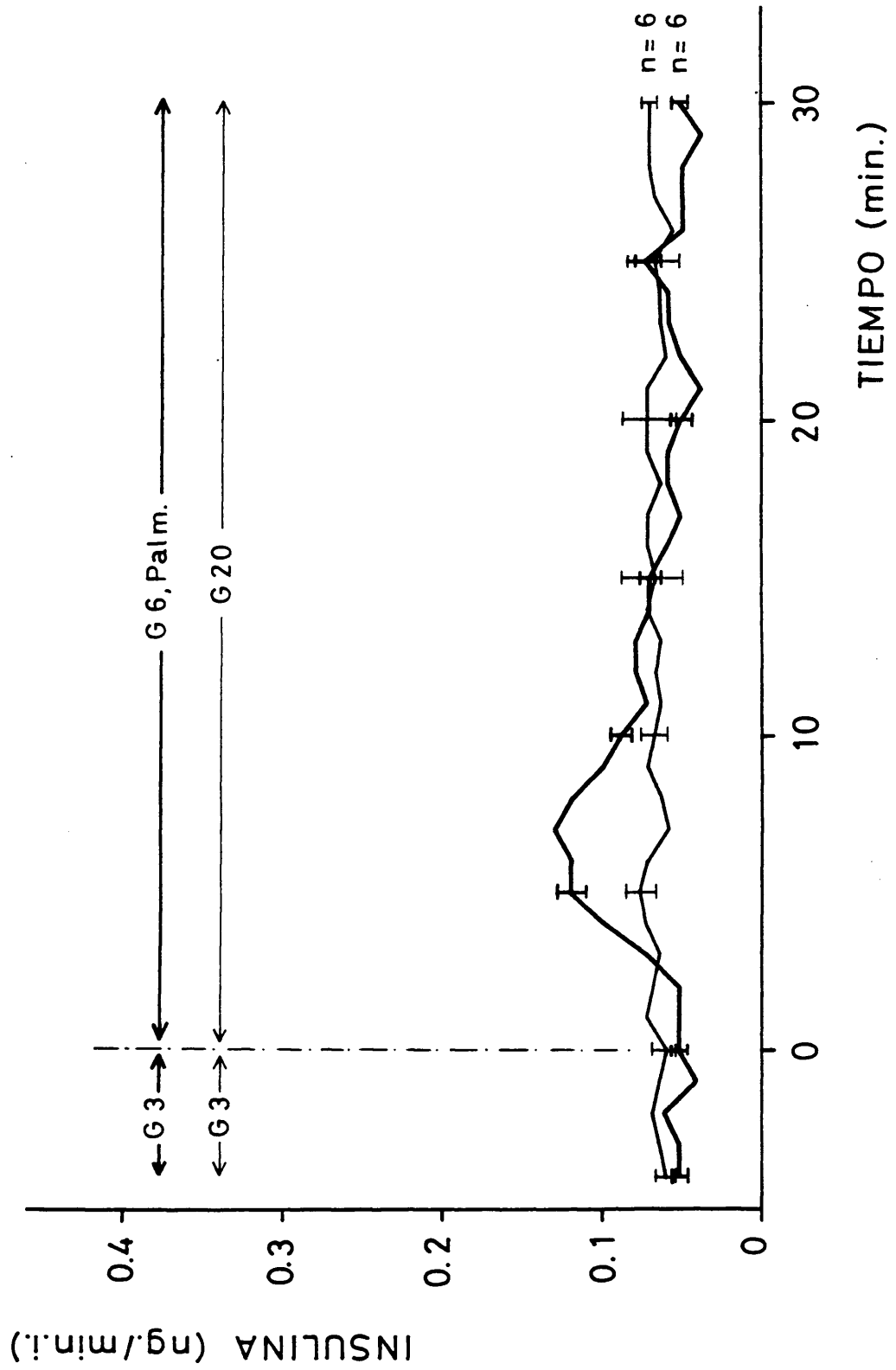


Fig. 22

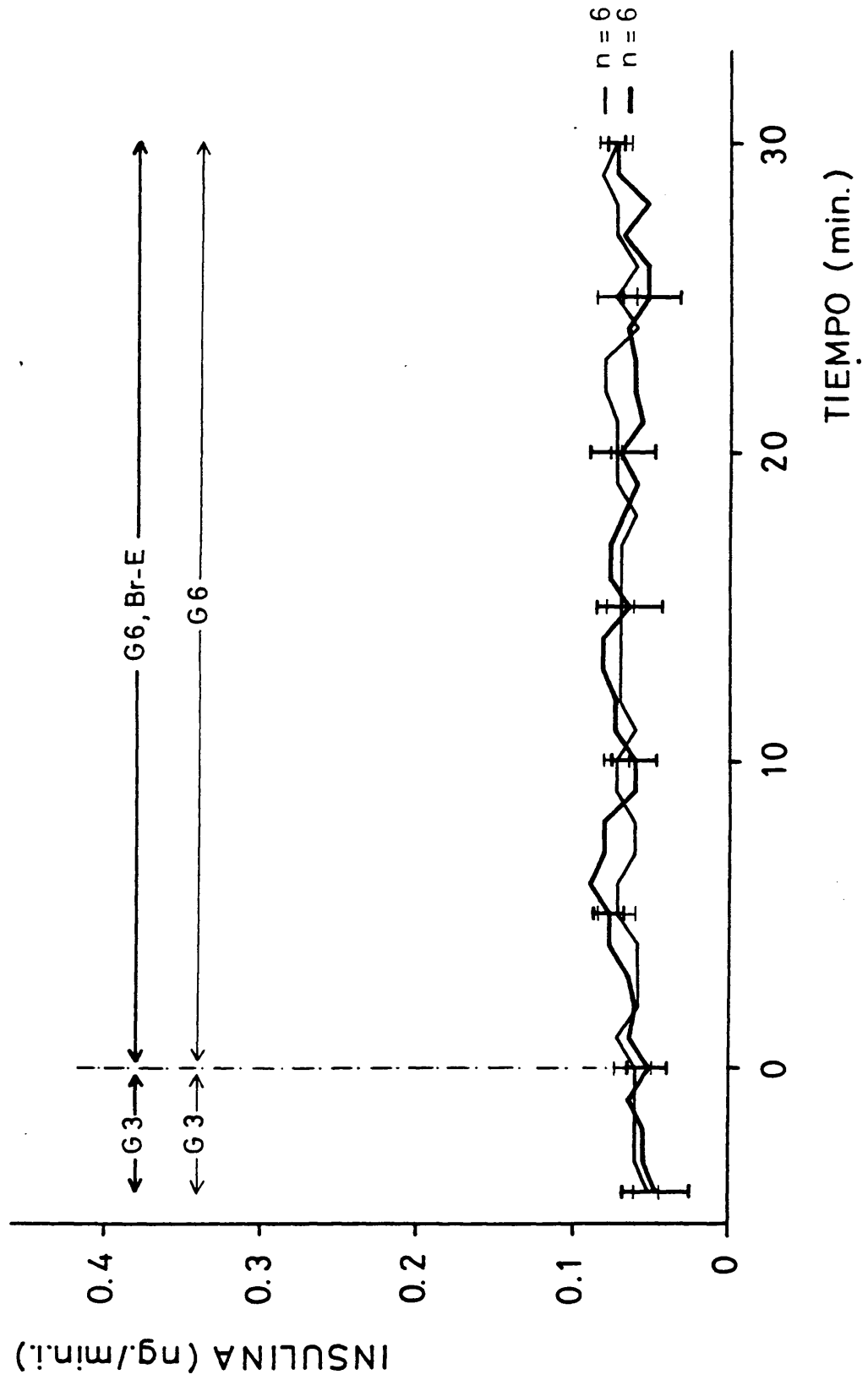


Fig. 23

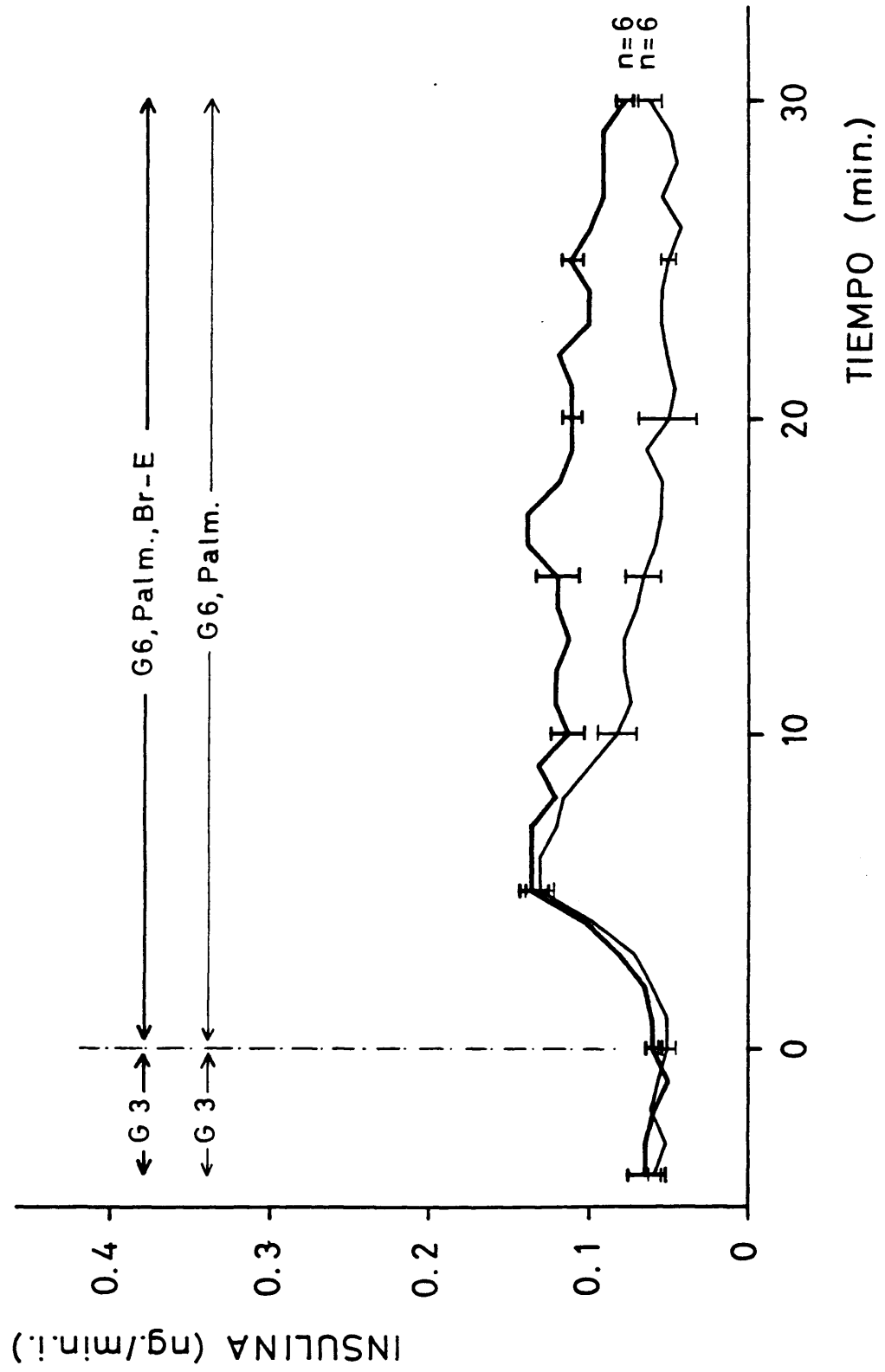


Fig. 24

Tabla 14

Estado nutritivo	Aditivos		Cantidad total de insulina		P
	p.estabilización (-30 a 0 min.)	p.estimulación (0 a 30 min.)	(0 - 10 min.)	(11 - 30 min.)	
1.ratas aliment.	G ₃	G ₅	0,63 ± 0,10 (6)	1,05 ± 0,24 (6)	-
2.ratas aliment.	G ₃	G ₅ + palm.	0,70 ± 0,06 (6)	1,18 ± 0,07 (6)	NS
3.ratas aliment.	G ₃	G ₆	0,67 ± 0,05 (6)	1,35 ± 0,11 (6)	-
4.ratas aliment.	G ₃	G ₆ + palm.	1,05 ± 0,04 (6)	1,32 ± 0,08 (6)	0,01
5.ratas aliment.	G ₃	G ₆	0,66 ± 0,10 (6)	1,36 ± 0,10 (6)	-
6.ratas aliment.	G ₃	G ₆ + BrE	0,70 ± 0,10 (6)	1,38 ± 0,10 (6)	NS
7.ratas aliment.	G ₃	G ₆ + palm.	1,03 ± 0,04* (6)	1,36 ± 0,12 (6)	-
8.ratas aliment.	G ₃	G ₆ + palm + BrE	1,06 ± 0,03 (6)	2,3 ± 0,05 (6)	* NS

* p 0,001 comparado con línea 3

d.- VELOCIDAD DE OXIDACION DE D-(U-¹⁴C)-GLUCOSA.

En la Fig. 25 se representa la velocidad de oxidación de glucosa (pmol/islote/hora) por islotes de ratas alimentadas en presencia de glucosa 3 ó 20mM. La velocidad de oxidación con glucosa 20mM es significativamente mayor que con glucosa 3mM.

En la Fig. 25 se puede ver que el ayuno no modifica la velocidad de oxidación de glucosa 20mM. Cuando se añade 2-bromoestearato 0,25mM al medio de incubación la velocidad de oxidación por los islotes de ratas ayunadas 48 horas tampoco varia (Fig. 25, Tabla 15).

Tabla 15

Estado nutritivo	Aditivos	Oxidación D-(U- ¹⁴ C)glucosa (pmol/i./h.)		P
1. ratas aliment.	G ₃	2,9024 ± 0,12	(23)	-
2. ratas aliment.	G ₂₀	15,7136 ± 0,63	(11)	0,001
3. ayuno 48 h.	G ₂₀	14,8925 ± 0,77	(12)	*
4. ayuno 48 h.	G ₂₀ + BrE	15,411 ± 0,63	(9)	*

* NS comparado con línea 2

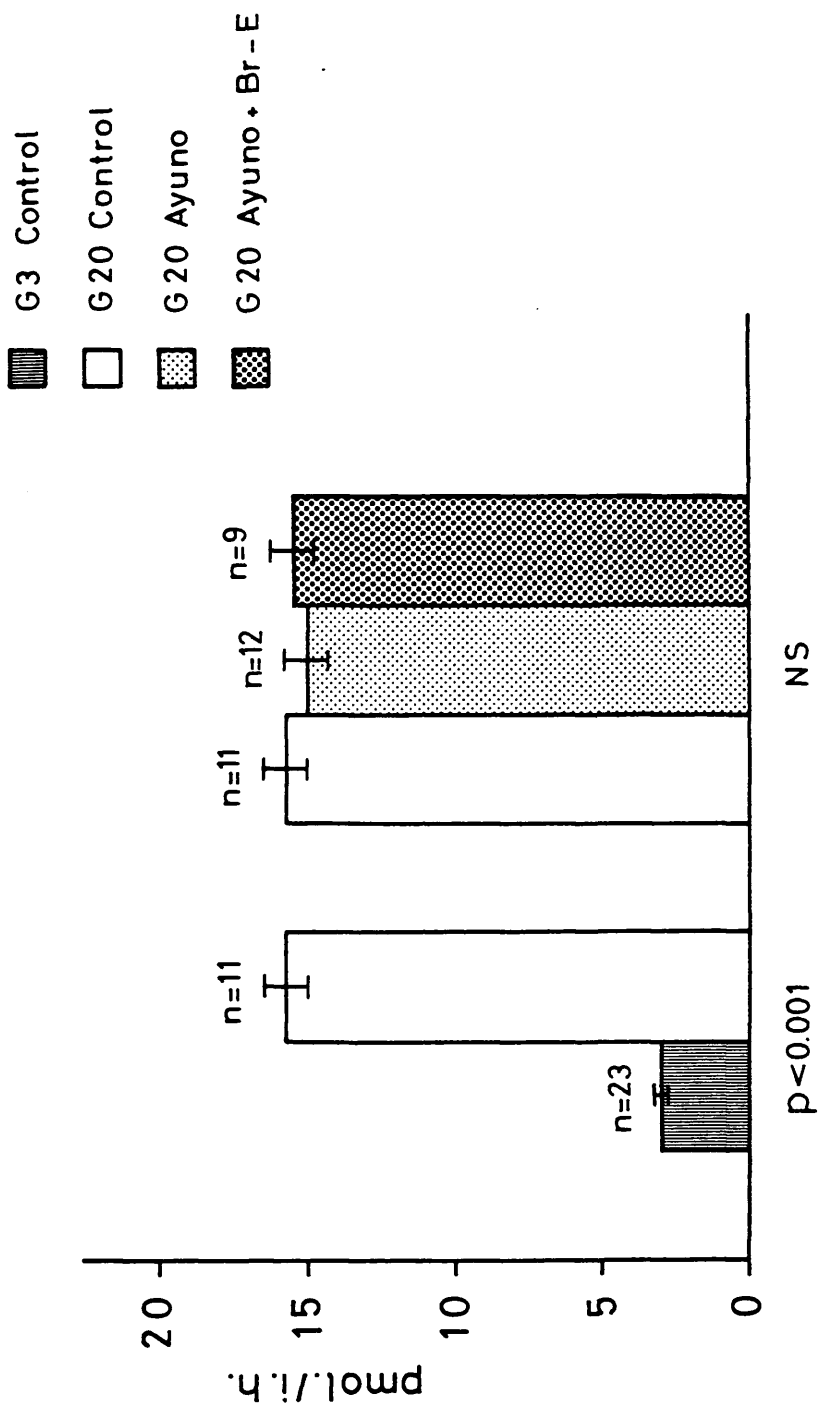


Fig. 25

e.- VELOCIDAD DE GLICOLISIS.

Se valoró midiendo la producción de $^3\text{H}_2\text{O}$ a partir de D-(5- ^3H)-glucosa en presencia de glucosa 3 ó 20mM. Los resultados se expresan en pmol/islote/hora.

Como se ve en la Fig. 26 la producción de $^3\text{H}_2\text{O}$ por islotes de ratas alimentadas a partir de glucosa 20mM es significativamente mayor que a partir de glucosa 3mM.

Se estudió el efecto del ayuno sobre la velocidad de glicolisis. En la Fig. 26 se representan los valores medios con sus correspondientes desviaciones estandar de la producción de $^3\text{H}_2\text{O}$ por islotes de ratas ayunadas 48 horas e islotes de ratas alimentadas. El ayuno no modifica significativamente la velocidad de glicolisis (Tabla 16). El 2-bromoestearato 0,25mM no modifica la producción de $^3\text{H}_2\text{O}$ a partir de glucosa 20mM por islotes de ratas alimentadas ó ayunadas 48 horas (Fig. 26, Tabla 16).

Tabla 16

Estado nutritivo	Aditivos	Velocidad de glicolisis (pmol/islote/hora)	P
1. ratas aliment.	G ₃	14,17 ± 0,91 (16)	-
2. ratas aliment.	G ₂₀	83,03 ± 2,28 (7)	0,001
3. ratas aliment.	G ₂₀ + BrE	85,13 ± 2,72 (13)	*
4. ayuno 48 h.	G ₂₀	82,40 ± 1,41 (17)	*
5. ayuno 48 h.	G ₂₀ + BrE	81,20 ± 1,29 (15)	*

* NS comparado con línea 2

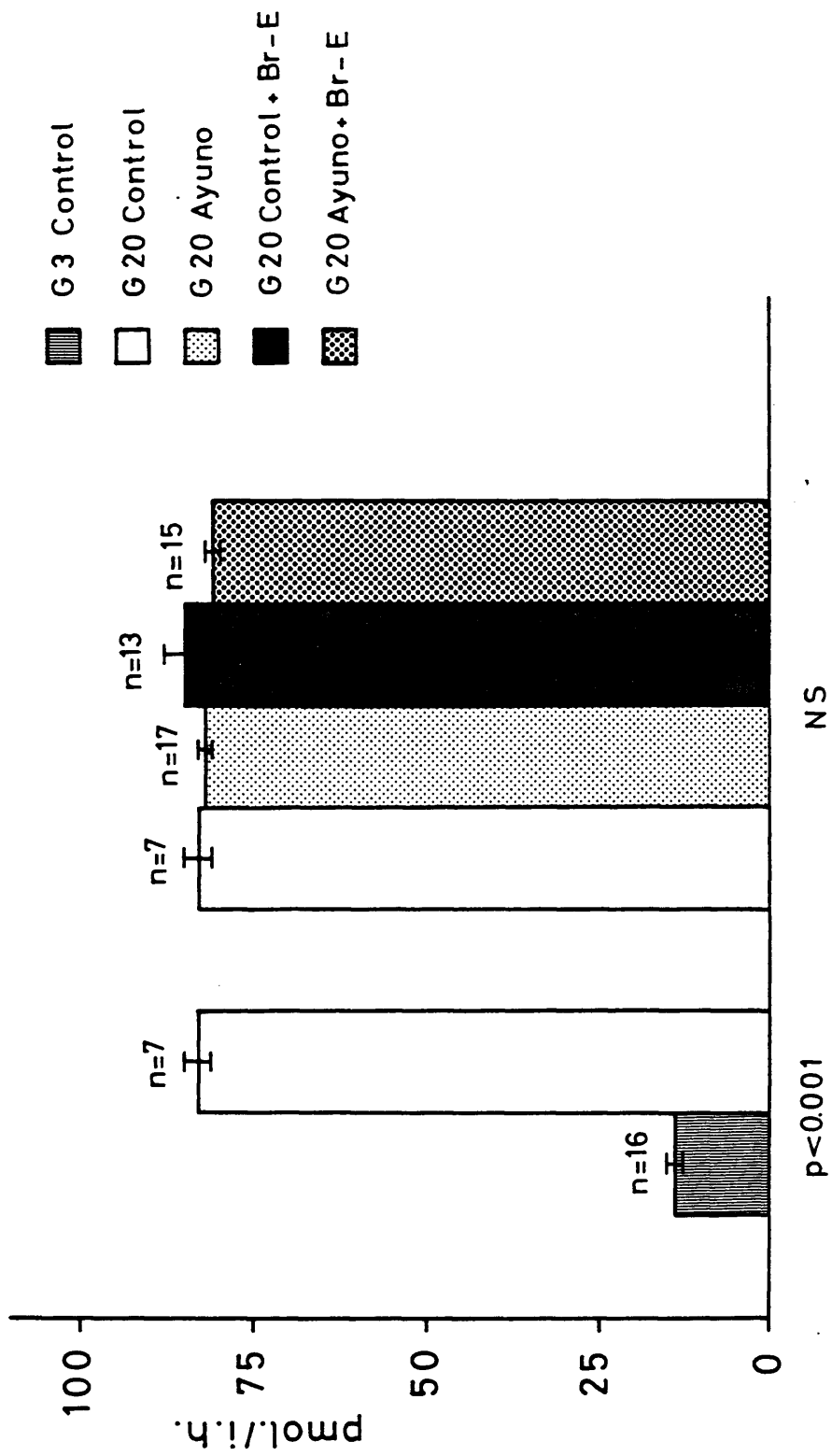


Fig. 26

Dada la interrelación morfológica y funcional que parece existir entre los tipos celulares A, B y D de los islotes de Langerhans decidimos estudiar el efecto de glucosa, ayuno, ácidos grasos y 2-bromoestearato sobre la secreción simultánea de insulina, glucagón y somatostatina. El objetivo es comprobar si las variaciones en la secreción de insulina pudieran ser secundarias a las alteraciones primarias en los patrones secretores de somatostatina y glucagón en las diferentes condiciones experimentales utilizadas.

Para ello se realizaron perfusiones con 100 islotes procedentes de un mismo animal a un flujo de 0,5 ml/min con objeto de poder detectar con precisión las variaciones de la secreción de somatostatina. El tiempo de perfusión se dividió en tres periodos: estabilización (-45 a 0 min), estímulo (0 a 30 min) y recuperación (30 a 45 min).

f.- EFECTO DEL AYUNO.

1.- Secreción de insulina.

Aquí se demuestra nuevamente que el ayuno inhibe significativamente la secreción de insulina en respuesta a glucosa 20mM (Fig. 27, Tabla 17).

2.- Secreción de somatostatina.

En controles (islotes de ratas alimentadas), la glucosa 20 mM induce un pico de secreción que alcanza su valor máximo apro

ximadamente en el minuto 6, cinco veces superior al valor basal y desciende rápidamente a valores basales en el minuto 10. El ayuno inhibe la secreción de somatostatina en respuesta a glucosa 20mM que permanece en valores basales a lo largo de toda la perfusión (Fig. 28, Tabla 18).

3.- Secreción de glucagón.

En la Fig. 29 se representa la secreción media con su desviación estandar de 6 perfusiones control y 5 perfusiones con islotes de ratas ayunadas 48 horas. Trás 45 minutos de perfusión con glucosa 3mM, la secreción de glucagón por islotes de rata control es inhibida al aumentar la concentración de glucosa a 20mM. El ayuno bloquea la respuesta a glucosa 20mM permaneciendo la secreción de glucagón en valores basales durante toda la perfusión (Tabla 19).

g.- EFECTO DEL 2-BROMOESTEARATO.

g₁.- Ratas control.

1.- Secreción de insulina.

El 2-bromoestearato no modifica la secreción de insulina en respuesta a glucosa 20mM en islotes de ratas control (Fig. 30, Tabla 17).

2.- Secreción de somatostatina.

La perfusión con 2-bromoestearato 0,25mM durante el perio

do de estabilización y estimulación induce una secreción basal de somatostatina (glucosa 3mM) unas cinco veces superior a la de los controles, que permanece al mismo nivel medio durante toda la perifusión aunque al aumentar la concentración de glucosa a 20mM se produce una pequeña estimulación (Fig. 31, Tabla 18).

3.- Secreción de glucagón.

En presencia de 2-bromoestearato 0,25mM la secreción de glucagón permanece en valores basales durante el periodo de estimulación con glucosa 20mM (Fig. 32, Tabla 19).

g₂.- Ratas ayunadas 48 horas.

1.- Secreción de insulina.

Cuando se añade 2-bromoestearato 0,25mM al medio de perifusión durante los periodos de estabilización y estimulación, la secreción de insulina por islotes de ratas ayunadas 48 horas alcanza los valores registrados en los controles (islotes de ratas alimentadas) (Fig. 33, Tabla 17).

2.- Secreción de somatostatina.

El 2-bromoestearato aumenta dos a tres veces la secreción basal de somatostatina (glucosa 3mM) en islotes de ratas ayunadas en comparación con los controles (islotes de ratas ayunadas no tratadas con bromoestearato). La glucosa 20mM no modifica estos niveles de secreción que permanecen estacionarios durante toda la perifusión (Fig. 34, Tabla 18). Hay que destacar que los

valores de secreción encontrados en estos experimentos son inferiores a los registrados en islotes de ratas alimentadas y perifundidos con 2-bromoestearato (Tabla 18).

3.- Secreción de glucagón.

En presencia de 2-bromoestearato 0,25mM la secreción basal de glucagón (glucosa 3mM) en islotes de ratas ayunadas aumenta aproximadamente dos veces en comparación con los controles (islotes de ratas ayunadas no tratadas con 2-bromoestearato). El aumento de la concentración de glucosa a 20mM induce una disminución de la secreción de glucagón, en contraposición a lo que ocurre en los controles, en los que permanece estacionaria (Fig. 35, Tabla 19).

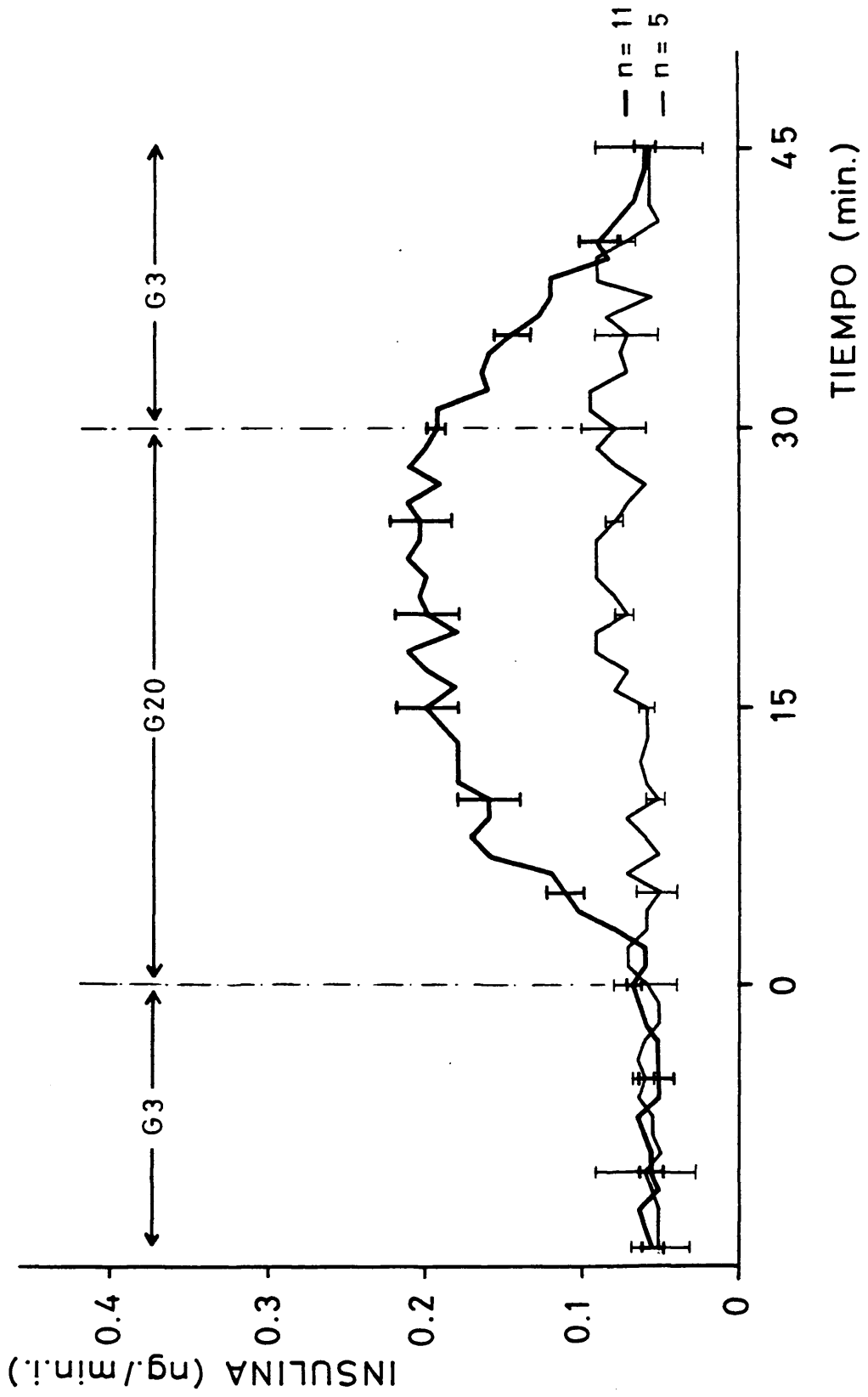


Fig. 27

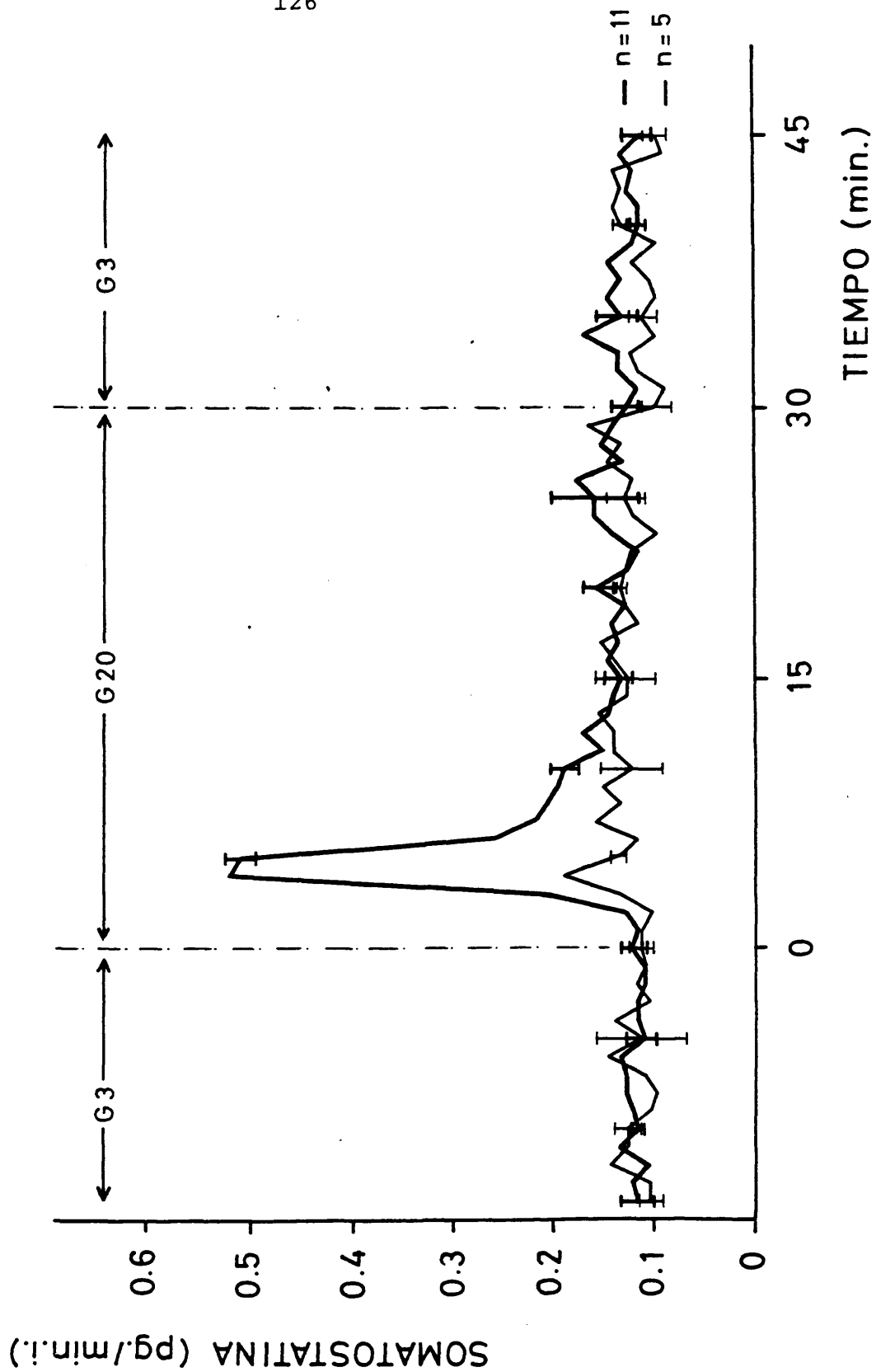


Fig. 28

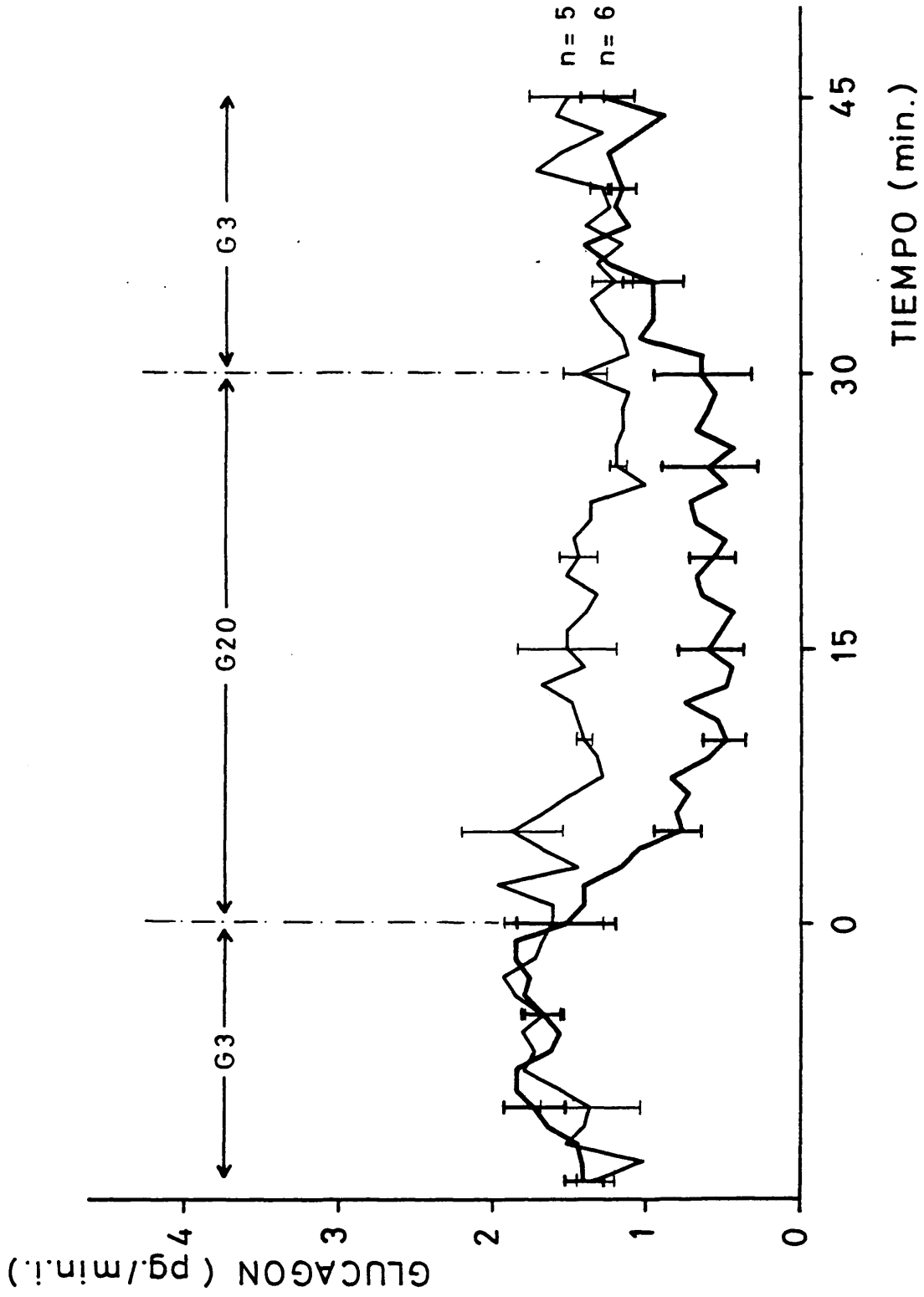


Fig. 29

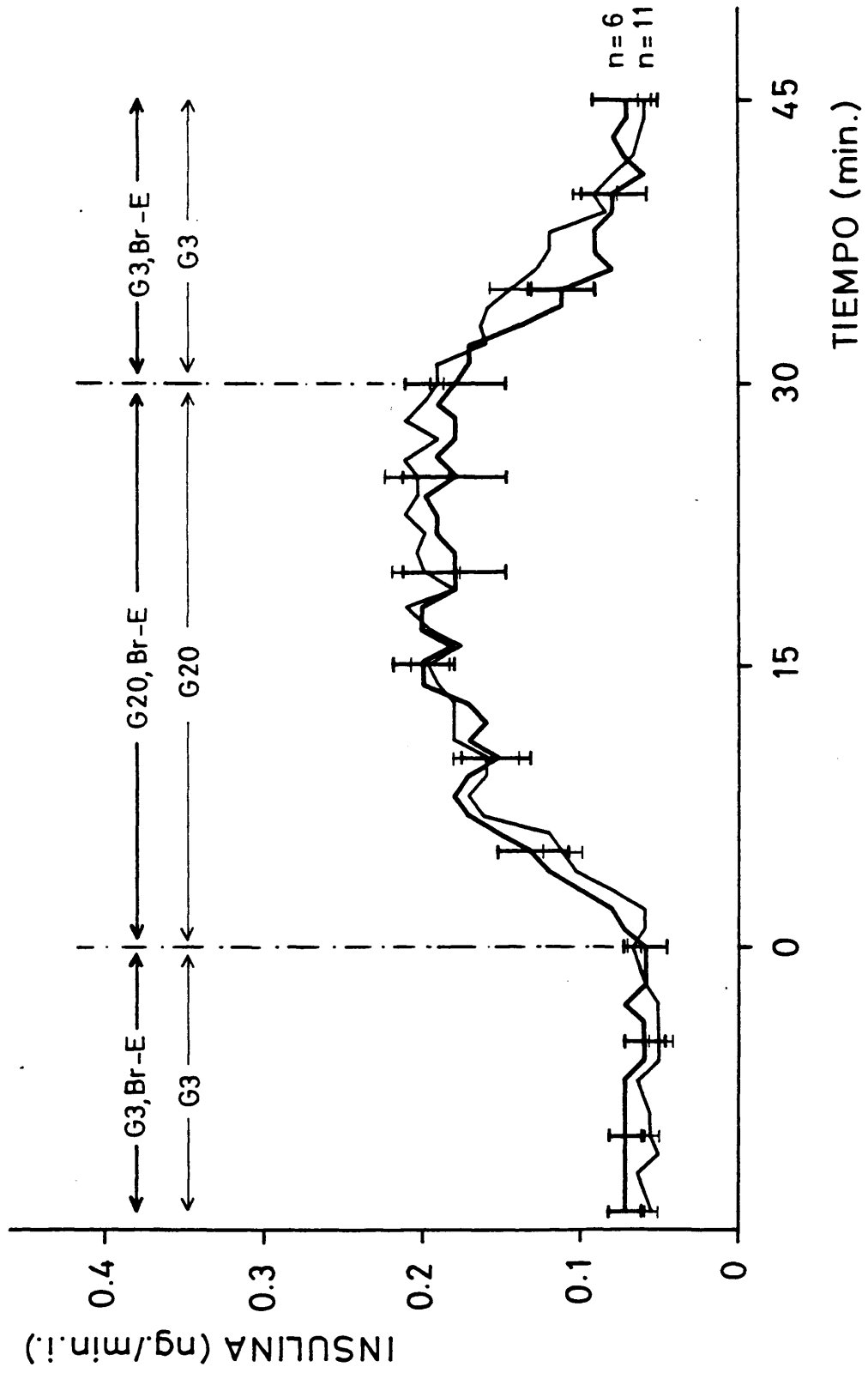


Fig. 30

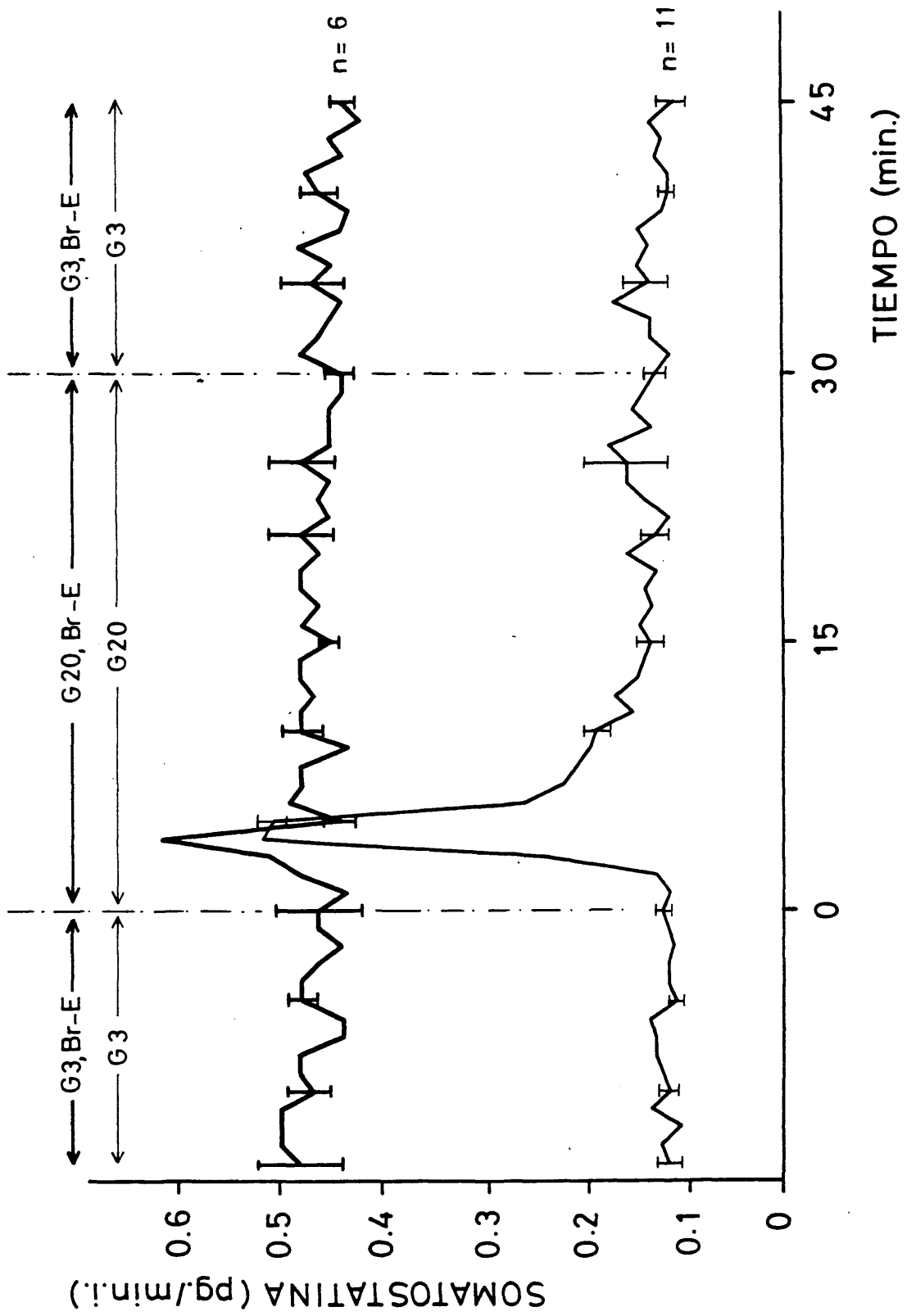


Fig. 31

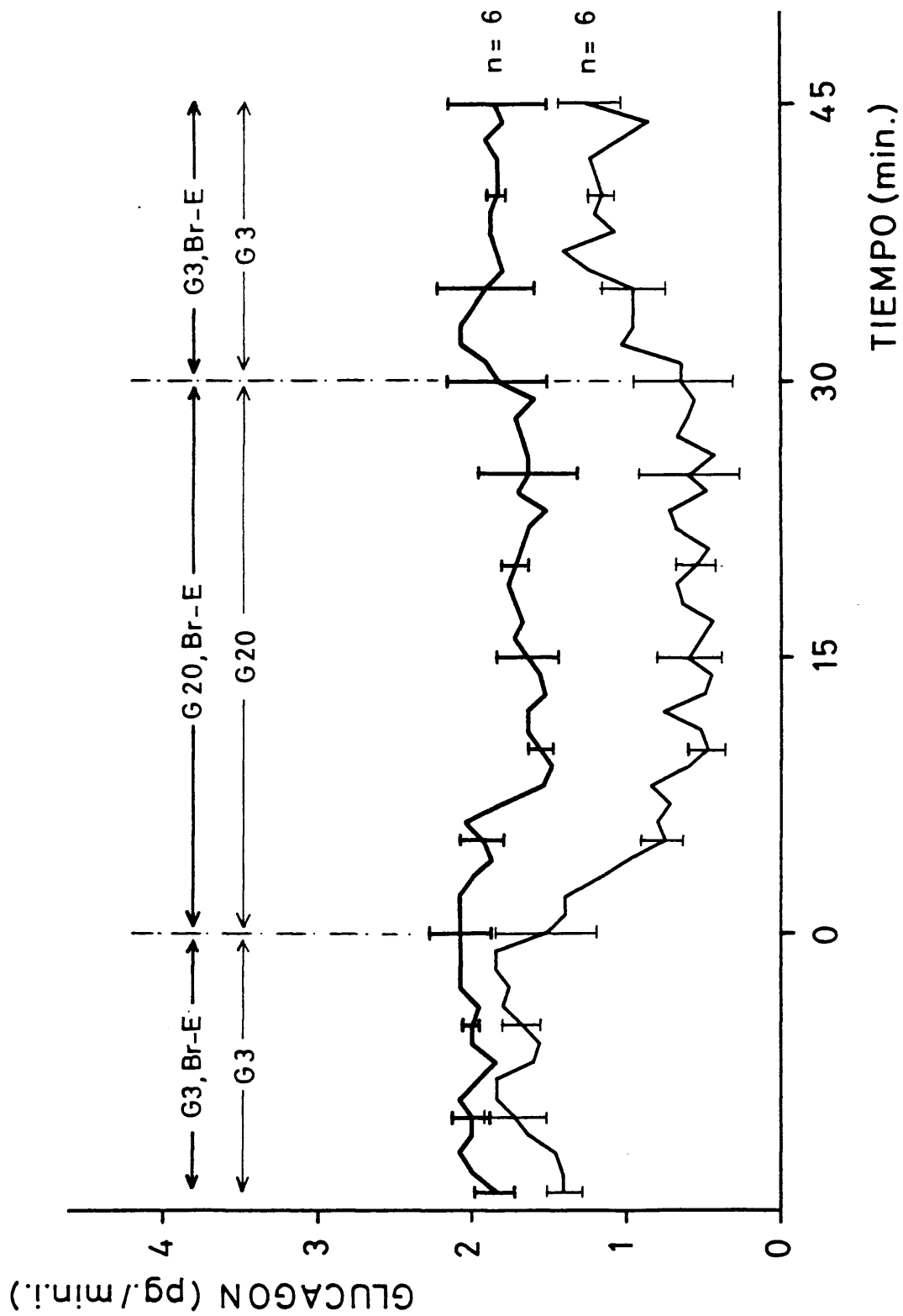


Fig. 32

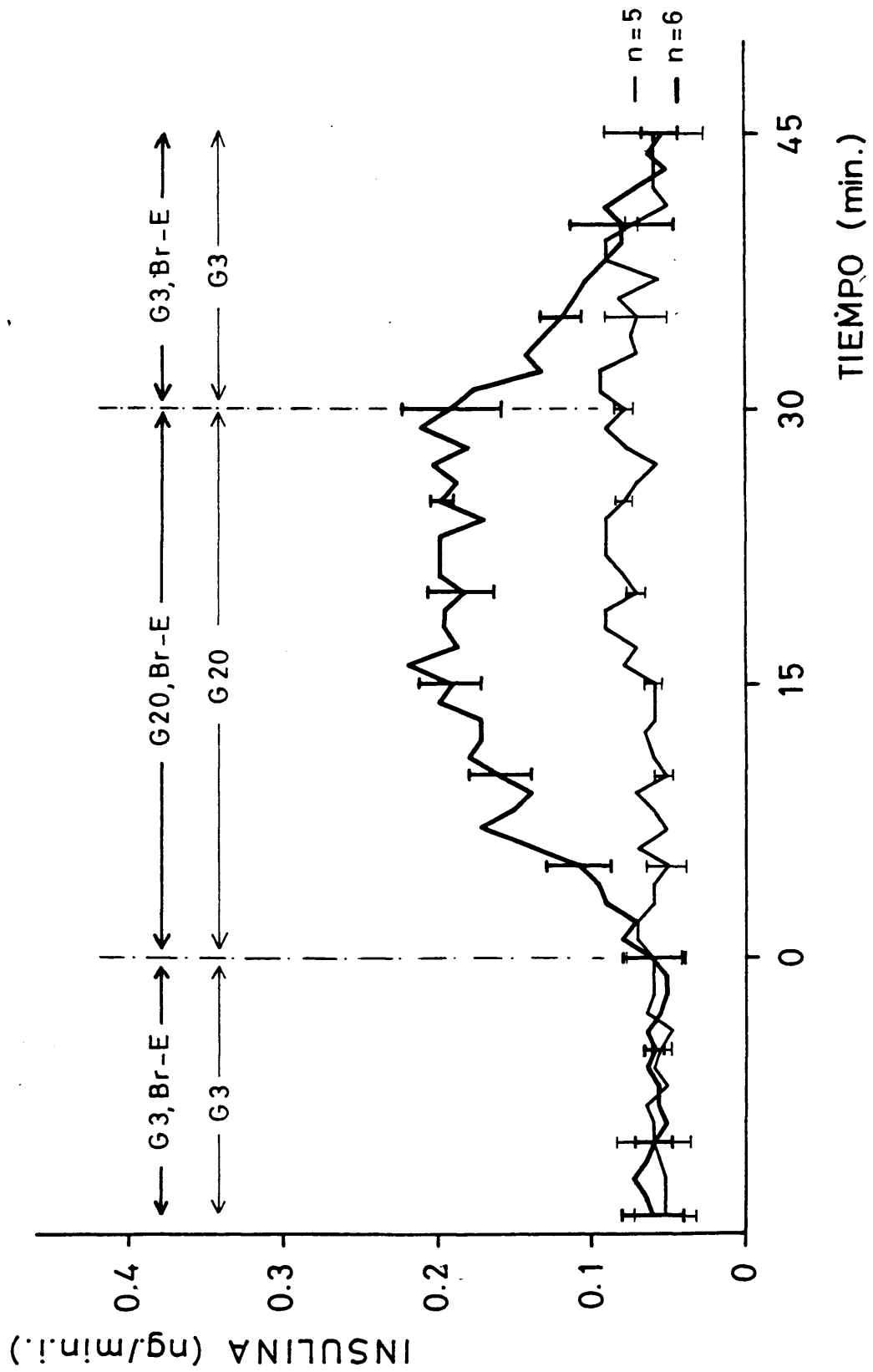


Fig. 33

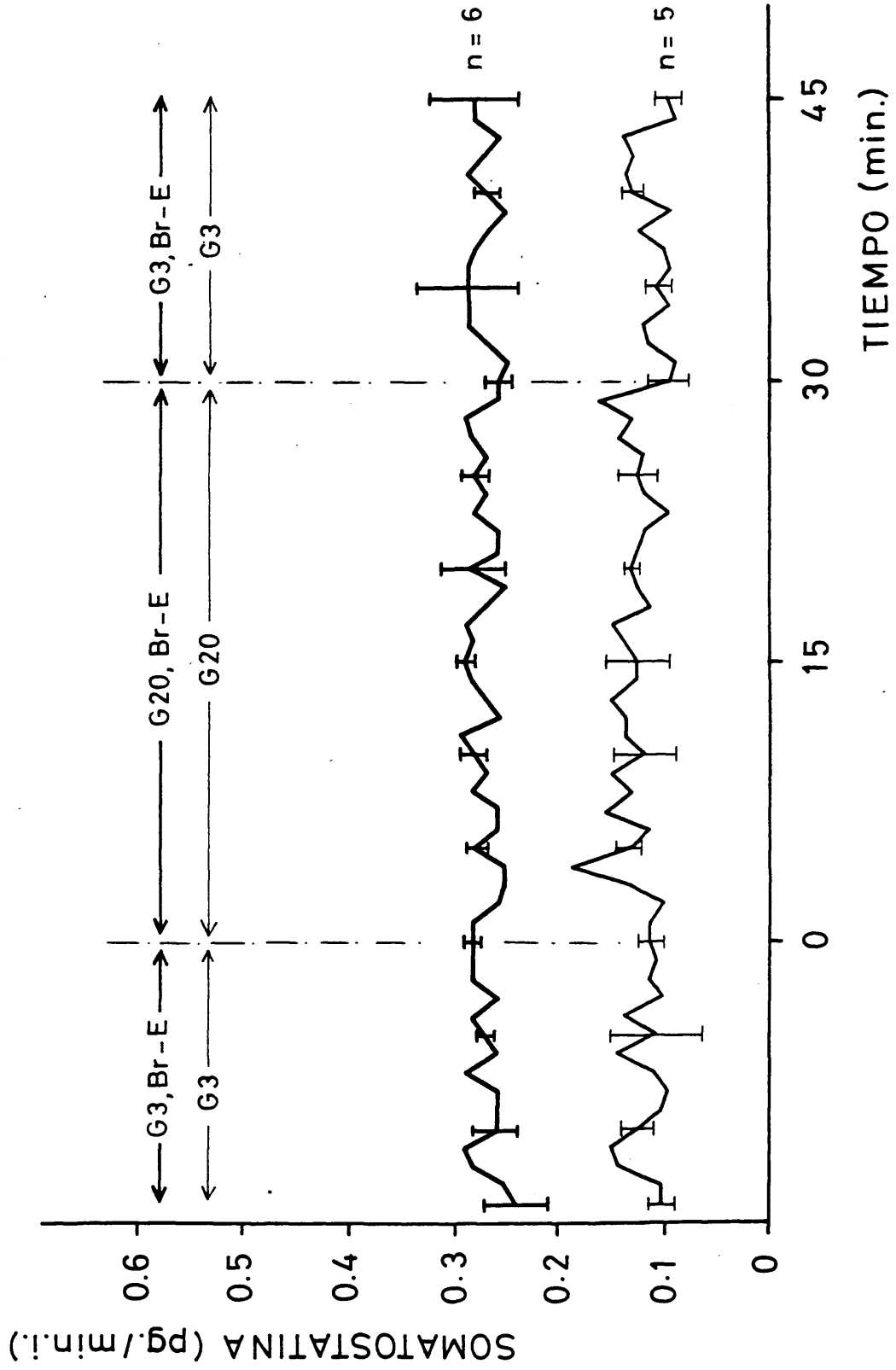


Fig. 34

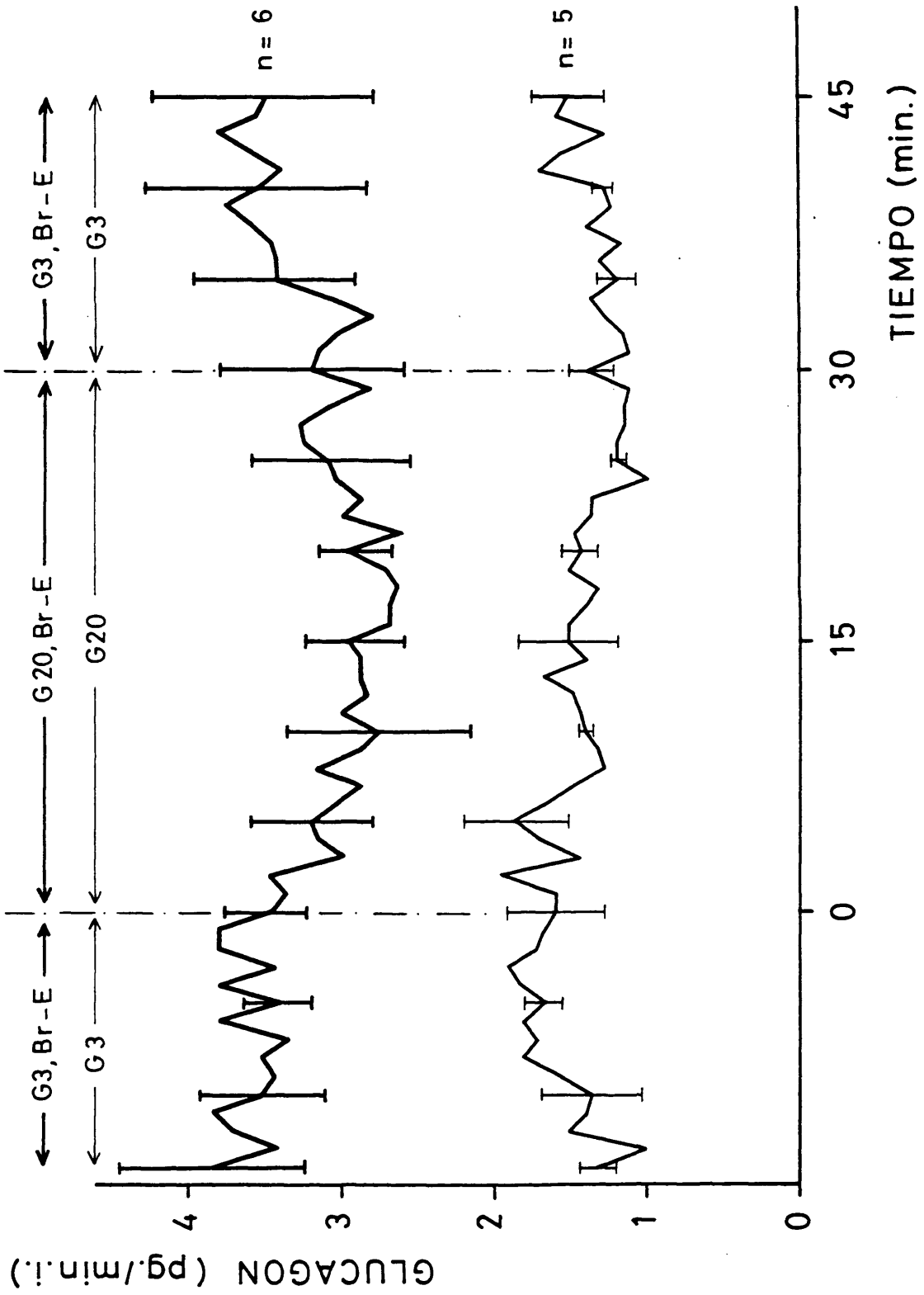


Fig. 35

Tabla 17

Estado nutricional	Aditivos		Estimulación		Insulina total segregada (ng)		p			
	Estabilización (-45-0) (30-45)	recuperación (0-30)	(-15-0)	p	(0-10)	p				
1. Ratas alim.	G ₃	G ₂₀	0,86±0,10 (11)	-	1,24±0,4 (11)	-	3,94±0,3 (11)	-	1,60±0,51 (11)	-
2. Ratas alim.	G ₃ +BrE	G ₂₀ +BrE	0,99±0,21 (6)	NS	1,32±0,1 (6)	NS	3,79±0,22 (6)	NS	1,40±0,4 (6)	NS
3. Ayuno 48h.	G ₃	G ₂₀	0,80±0,12 (5)	-	0,61±0,08 (5)	-	1,52±0,13 (5)	-	1,08±0,05 (5)	-
4. Ayuno 48h.	G ₃ +BrE	G ₂₀ +BrE	0,90±0,20 (6)	NS	1,21±0,21* (6)	0,001	3,82±0,31* (6)	0,001	1,46±0,4 (6)	NS

*NS comparado con línea 1

Tabla 18

Estado nutricional	Aditivos		Somatostatina total segregada (ng)					
	Estabilización (-45-0) (30-45)	Estimulación (-15-0)	P	(0-10)	(11-30)	P	(30-45)	P
1. Ratas alim.	G ₃	G ₂₀ 1,740±0,009(11)	-	2,515±0,1 (11)	2,819±0,21 (11)	-	1,923±0,20 (11)	-
2. Ratas alim.	G ₃ +BrE	G ₂₀ +BrE 7,130±0,52 (6)	0,001	4,890±0,40 (6)	9,482±0,30 (6)	0,001	6,820±0,23 (6)	0,001
3. Ayuno 48h.	G ₃	G ₂₀ 1,719±0,2 (5)	-	1,339±0,2 (5)*	2,580±0,30 (5)**	-	1,672±0,21 (5)**	-
4. Ayuno 48h.	G ₃ +BrE	G ₂₀ +BrE 4,080±0,10 (6)***	0,001	2,670±0,10 (6)***	5,480±0,31 (6)***	0,001	3,840±0,40 (6)***	0,001

* p 0,001 comparado con línea 1

** NS comparado con línea 1

*** p 0,001 comparado línea 2

Tabla 19

Estado nutricional	Aditivos		Estimulación		Glucagón total		segregado (pg)		p	
	(-45-0) (30-45)	(0-30)	(-15-0)	p	(0-10)	p	(11-30)	p		
1. Ratas alim.	G ₃	G ₂₀	25,57±3,2 (6)	-	9,11±0,81 (6)	-	11,29±1,64 (6)	-	16,57±2,63 (6)	-
2. Ratas alim.	G ₃ +BrE	G ₂₀ +BrE	29,81±3,91 (6)	0,05	18,28±2,32 (6)	0,001	33,23±3,60 (6)	0,001	27,83±4,3 (6)	0,01
3. Ayuno 48h.	G ₃	G ₂₀	23,82±2,40 (5)	-	15,67±2,45 (5)*	-	27,16±1,71 (5)*	-	20,08±1,78 (5)	-
4. Ayuno 48h.	G ₃ +BrE	G ₂₀ +BrE	53,66±9,1 (6)*	0,001	30,88±2,19 (6)*	0,001	58,38±1,99 (5)*	0,001	51,20±2,73 (6)*	0,001

* p 0,001 comparado con la línea 1

h.- EFECTO DEL ACIDO PALMITICO.

1.- Secreción de insulina.

El ácido palmítico estimula la secreción de insulina por islotes de ratas alimentadas en respuesta a glucosa 6mM produciendo un pico rápido de secreción que desciende rápidamente a valores basales (Fig. 36, Tabla 20).

2.- Secreción de somatostatina.

Como se ve en la Fig. 37 la secreción de somatostatina en respuesta a glucosa 6mM no se modifica, permaneciendo toda la perfusión en valores basales. Cuando se añade ácido palmítico 0,5mM al medio de perfusión durante la fase de estimulación con glucosa 6mM aparece un pequeño pico de secreción aproximadamente 1,5 veces superior a los valores basales, que alcanza su valor máximo en el minuto 6 y desciende rápidamente a valores basales (Fig. 37, Tabla 21).

3.- Secreción de glucagón.

La secreción de glucagón no se modifica cuando se aumenta la concentración de glucosa de 3 a 6mM (Fig. 38). La adición de ácido palmítico durante la fase de estimulación con glucosa 6mM produce un pequeño descenso de la secreción que alcanza su valor mínimo aproximadamente en el minuto 7 (un minuto después de que la somatostatina alcance su valor máximo) y que vuelve rápidamente a valores basales (Fig. 38, Tabla 22).

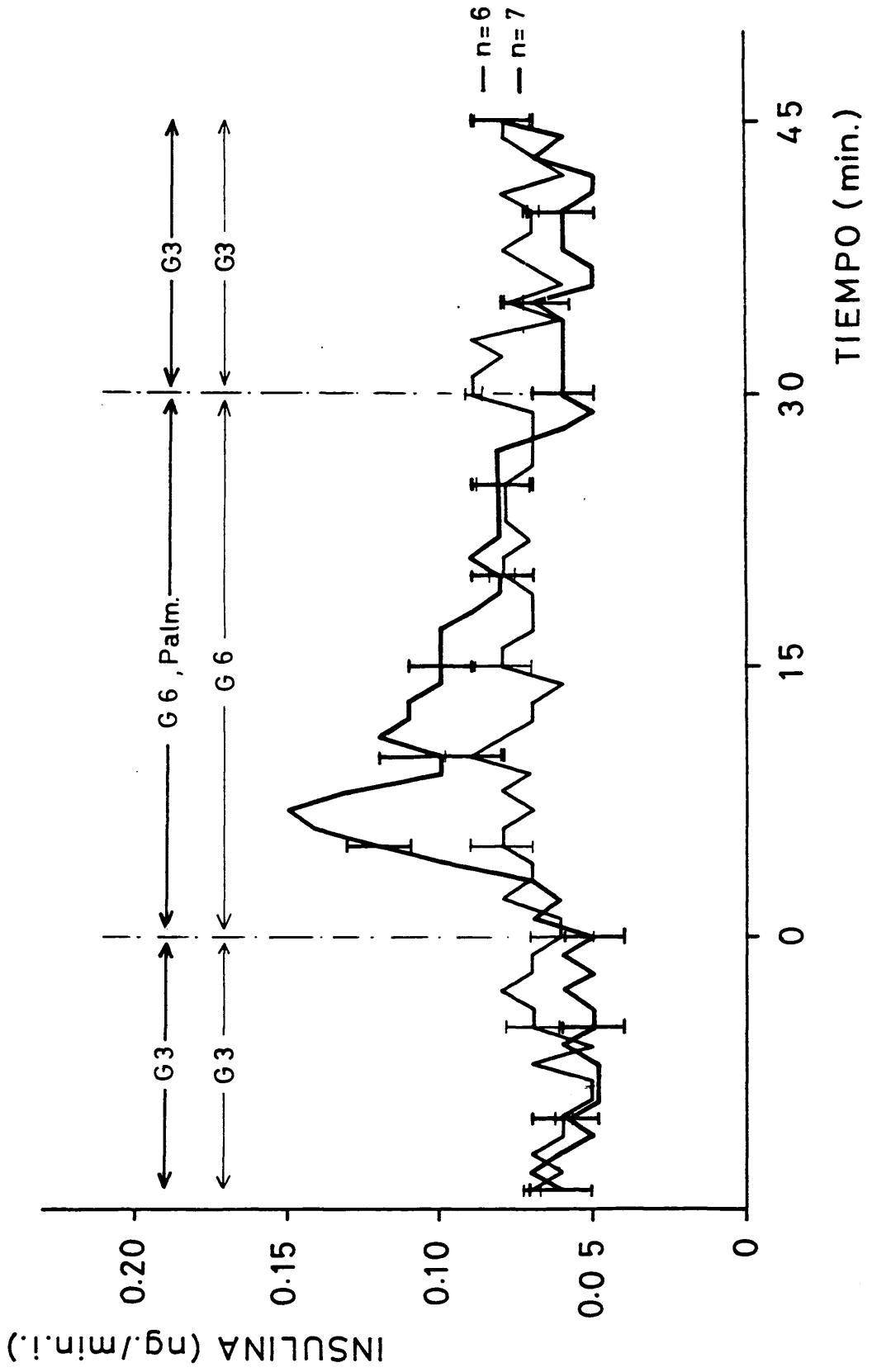


Fig. 36

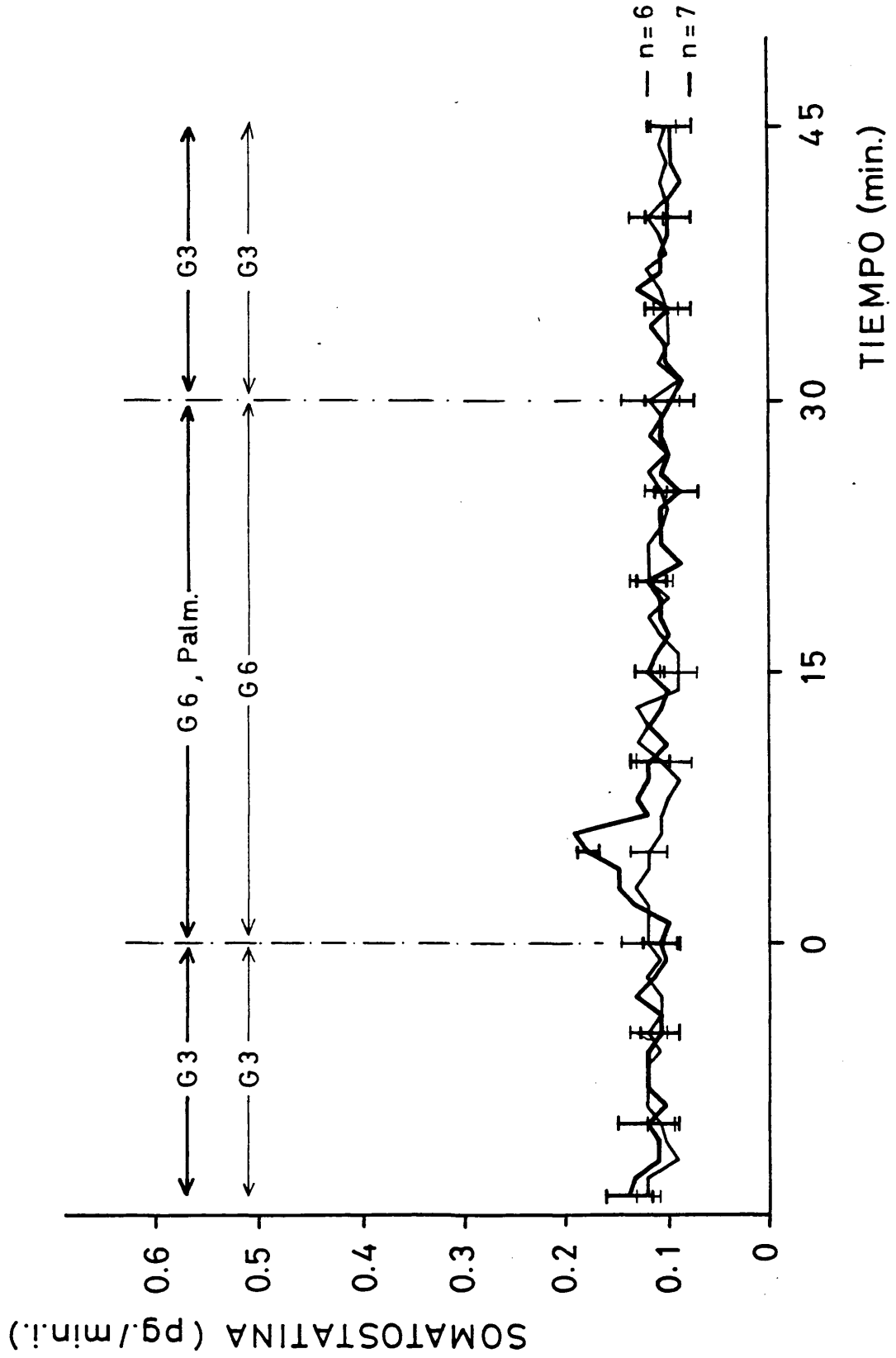


Fig. 37

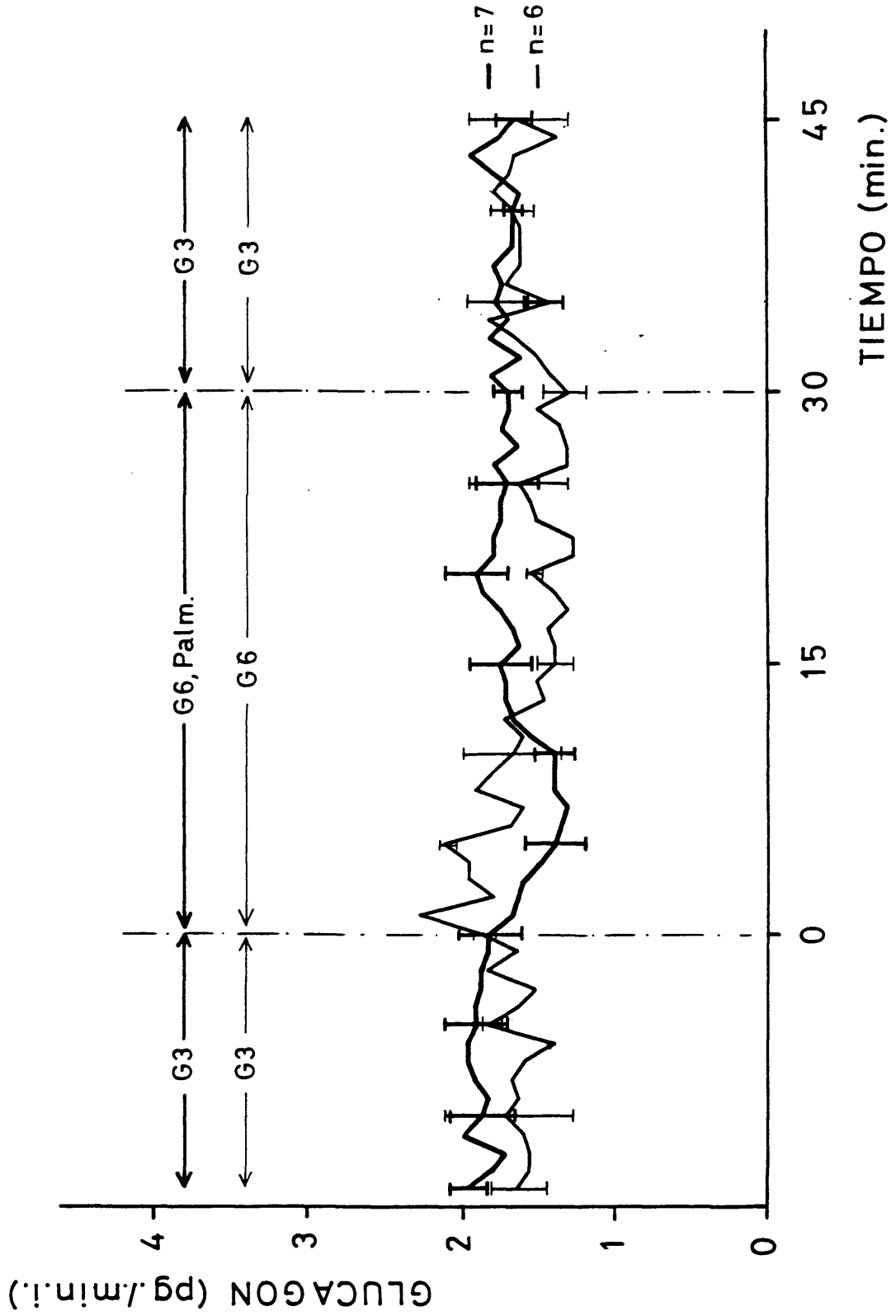


Fig. 38

i.- EFECTO DEL 2-BROMOESTEARATO SOBRE LA ACCION SECRETORA DEL ACIDO PALMITICO.

1.- Secreción de insulina.

Como se ha descrito en experimentos previos (c) la combinación de ácido palmítico (0,5 mM) con 2-bromoestearato (0,25mM) en presencia de glucosa 6 mM determina un aumento de la secreción de insulina que alcanza el mismo valor máximo obtenido en presencia de palmítico solamente (h) pero con la diferencia de que se mantiene estacionaria a este nivel durante todo el tiempo de perifusión (Fig. 39, Tabla 20).

2.- Secreción de somatostatina.

La perifusión con ácido palmítico (0,5 mM) más 2-bromoestearato (0,25 mM) en presencia de glucosa 6 mM induce un pico de secreción que alcanza un máximo similar al obtenido por acción exclusiva del ácido palmítico pero que se mantiene estacionario durante el periodo de estimulación y vuelve a valores basales al suprimir el estímulo (Fig. 40, Tabla 21).

3.- Secreción de glucagón.

La adición de 2-bromoestearato (0,25 mM) convierte la inhibición inducida por el ácido palmítico (0,5 mM) en presencia de glucosa 6 mM en una estimulación de 1,5 veces. Al disminuir la concentración de glucosa a 3 mM durante los últimos 15 minutos y retirar el ácido palmítico y 2-bromostearico del medio de perifusión, la secreción de glucagón muestra tendencia a seguir aumentando (Fig. 41, Tabla 22).

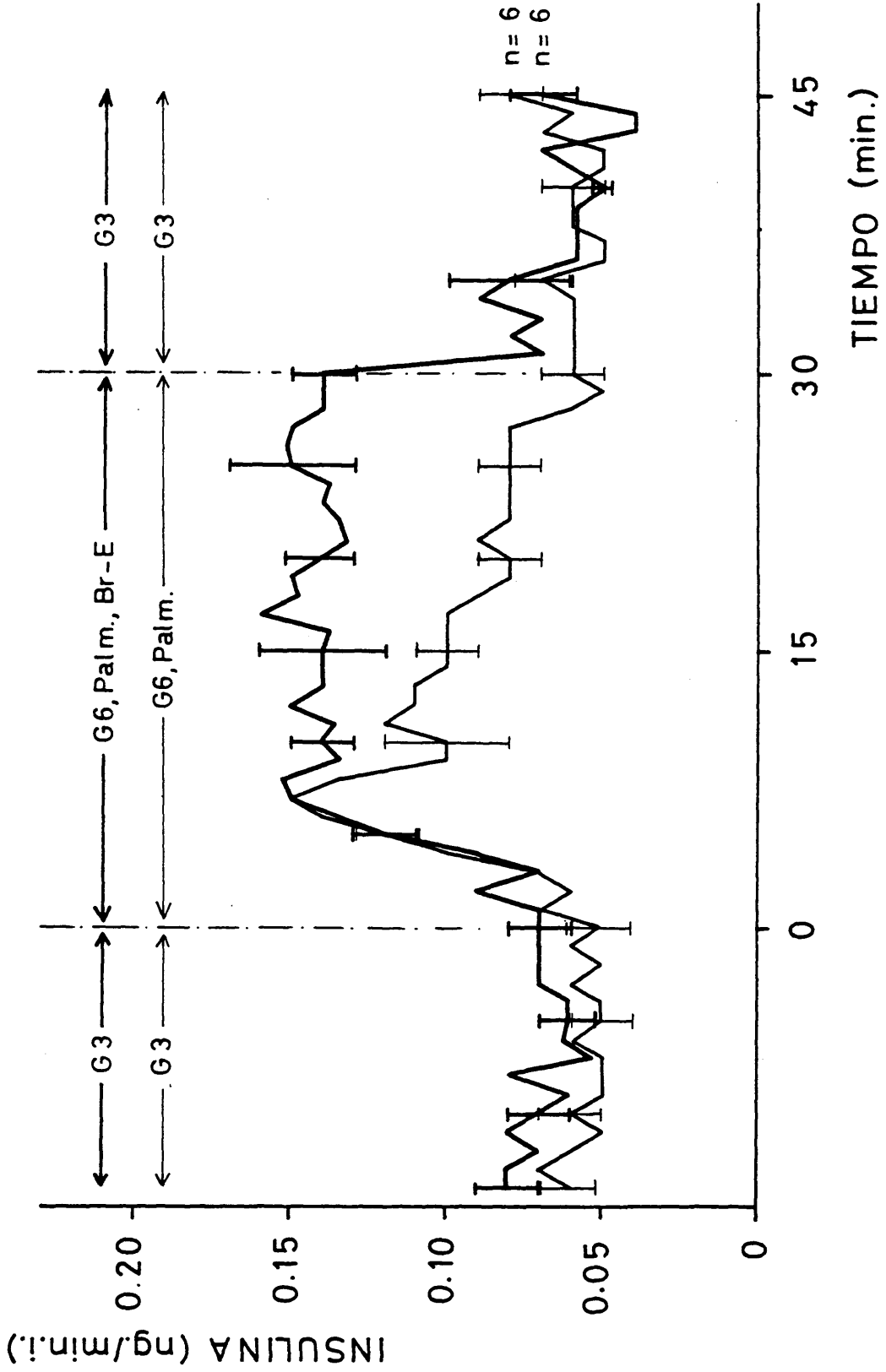


Fig. 39

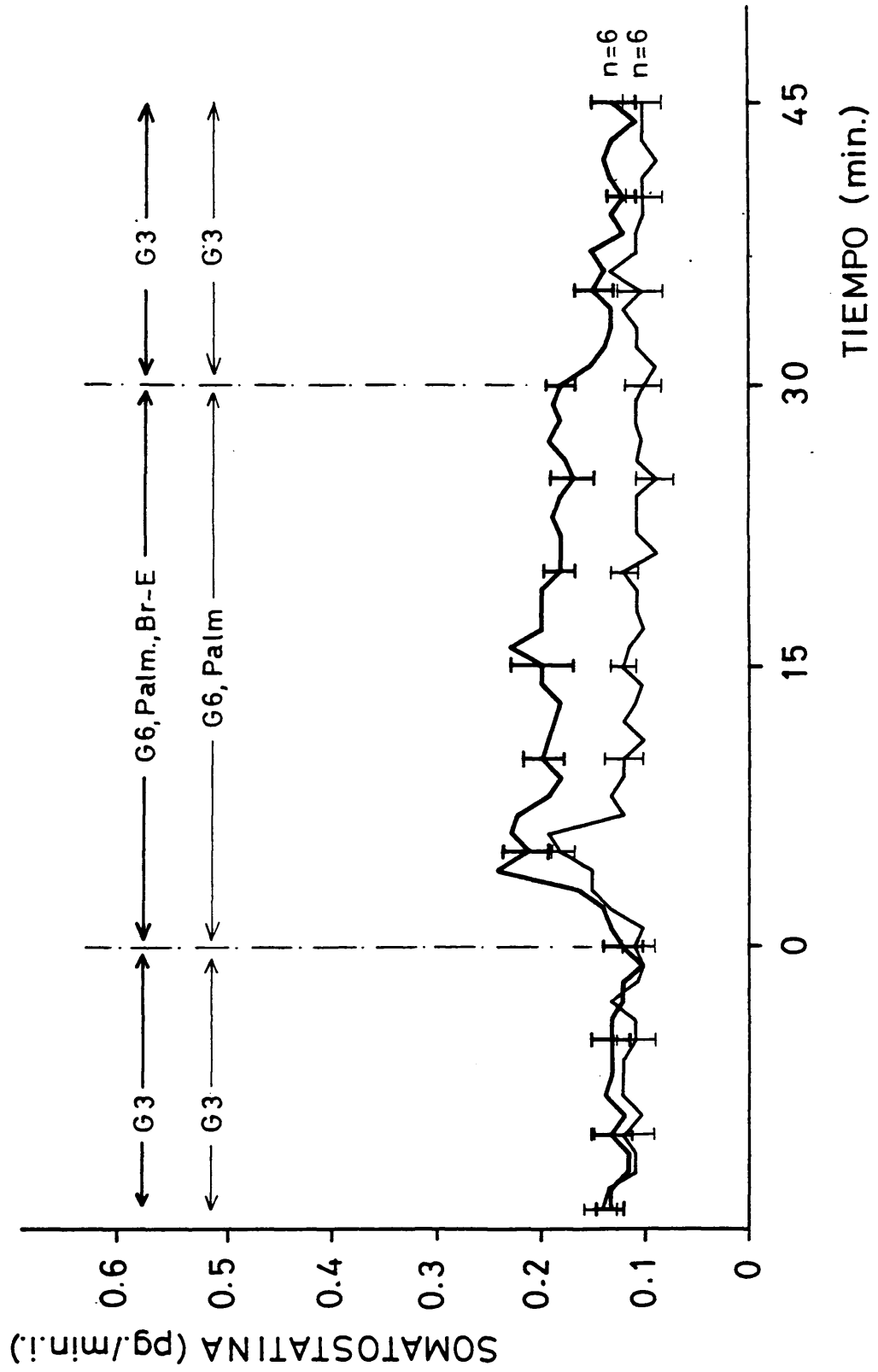


Fig. 40

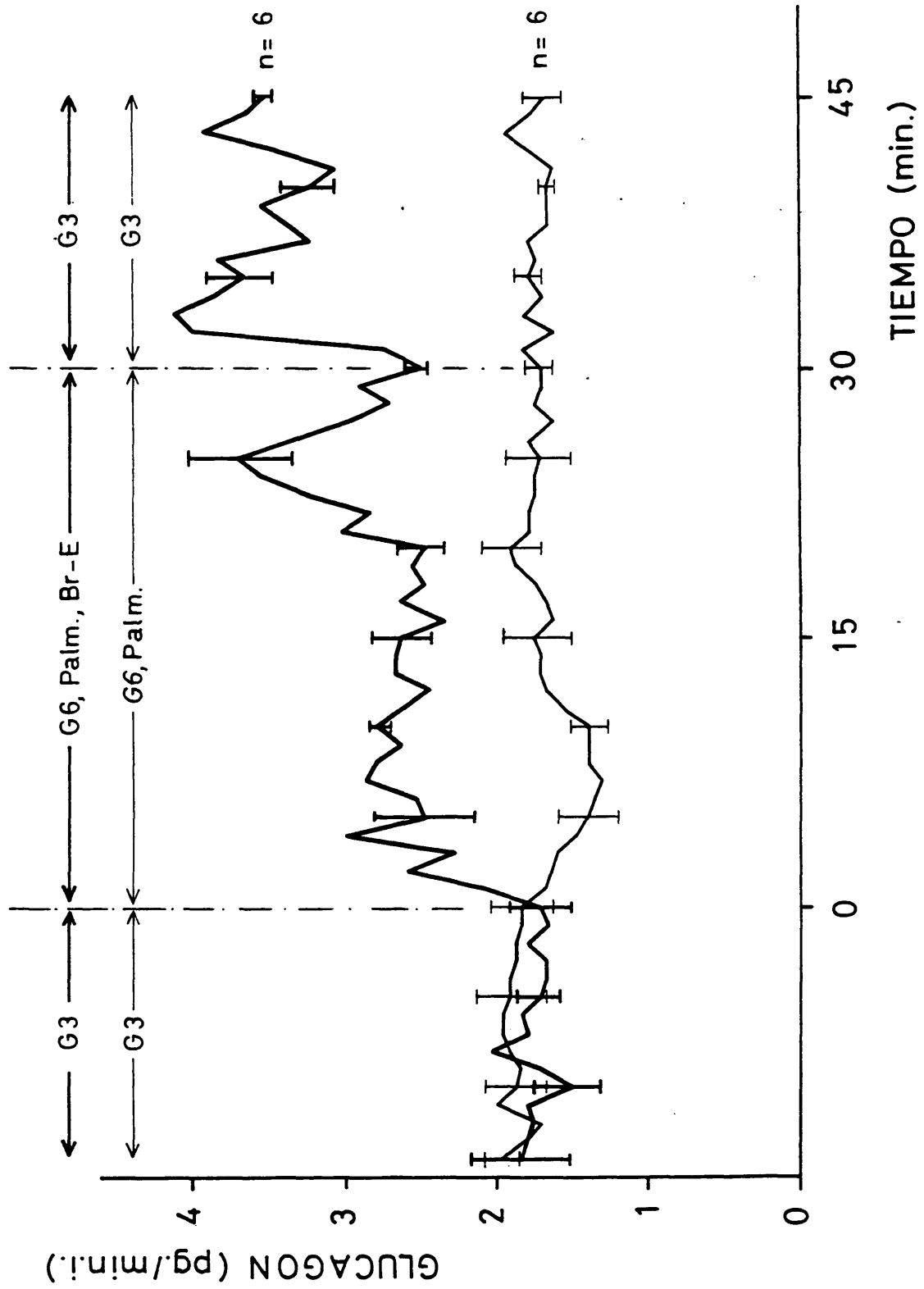


Fig. 41

Tabla 20

Estado nutricional	Aditivos		Estimulación		Insulina total segregada (ng)		Insulina total segregada (ng)		Insulina total segregada (ng)	
	(-45-0)	(30-45)	(0-30)	(-15-0)	p	(0-10)	p	(11-30)	p	(30-45)
1. Ratas alim.	G ₃	G ₆	G ₆	0,96±0,13 (6)	-	0,75 ±0,08 (6)	-	1,490±0,21 (6)	-	1,020±0,12 (6)
2. Ratas alim.	G ₃	G ₆ +Palm.	G ₆ +Palm.	0,83±0,10 (7)	NS	1,040±0,09 (7)	0,001	1,430±0,09 (7)	NS	0,900±0,18 (7)
3. Ratas alim.	G ₃	G ₆ +Palm.+BrE	G ₆ +Palm.+BrE	1,03±0,20 (6)	NS	1,151±0,10 (6)	(6)* 0,001	2,850±0,11 (6)	** 0,001	0,96 ±0,14 (6)

* NS comparado con línea 2

** p 0,001 comparado con línea 2

Tabla 21

Estado Nutritivo	Estabilización		Estimulación		Somatostatina total segregada (ng)								
	recuperación												
1. Ratas alim.	G ₃	G ₆	1,71±0,10 (6)	-	1,130±0,12 (6)	-	2,230±0,13 (6)	-	1,580±0,08 (6)	-			
2. Ratas alim.	G ₃	G ₆ +Palm.	1,74±0,11 (7)	NS	1,391±0,20 (7)	0,05	2,152±0,09 (7)	NS	1,581±0,10 (7)	NS			
3. Ratas alim.	G ₃	G ₆ +Palm.+BCE	1,85±0,13 (6)	NS	1,90 ±0,3 (6)	*	0,001	3,752±0,14 (6)	**	0,001	1,830±0,16 (6)	*	0,01

* p 0,01 comparado con línea 2

** p 0,001 comparado con línea 2

Tabla 22

Estado Nutritivo	Aditivos		Estabilización Estimulación recuperación		Glucagón total segregado (ng)		P
	(-45-0) (30-45)	(0-30)	(-15-0)	(0-10)	(11-30)	(30-45)	
1. Ratas alim.	G ₃	G ₆	24,74±2,70 (6)	18,74±2,11 (6)	30,23±2,45 (6)	24,52±1,31 (6)	-
2. Ratas alim.	G ₃	G ₆ +BrE	27,40±1,7 (7)	14,65±1,28 (7)	33,09±3,85 (7)	26,21±1,91 (7)	NS
3. Ratas alim.	G ₃	G ₆ +Palm.+BrE	25,11±3,6 (6)	25,98±2,82 (6)*	56,48±3,81 (6)*	53,22±3,67 (6)*	0,001

*p 0,001 comparado línea 2

j.- ESTUDIO DEL CONTENIDO DE INSULINA, SOMATOSTATINA Y GLUCAGON
EN ISLOTES DE LANGERHANS.

1.- Insulina.

En la Fig. 42 se representa el contenido de insulina (ng/ islote) en islotes de ratas control e islotes de ratas ayunadas 48 horas. El contenido de insulina de islotes de ratas ayunadas es significativamente menor que el de los controles.

2.- Somatostatina.

Como en el caso de insulina, el contenido de somatostatina en islotes de ratas ayunadas 48 horas es significativamente menor que el contenido en islotes de ratas alimentadas (Fig. 43).

3.- Glucagón.

A diferencia de las otras hormonas, el contenido de glucagón de los islotes no es modificado por el ayuno (Fig. 44).

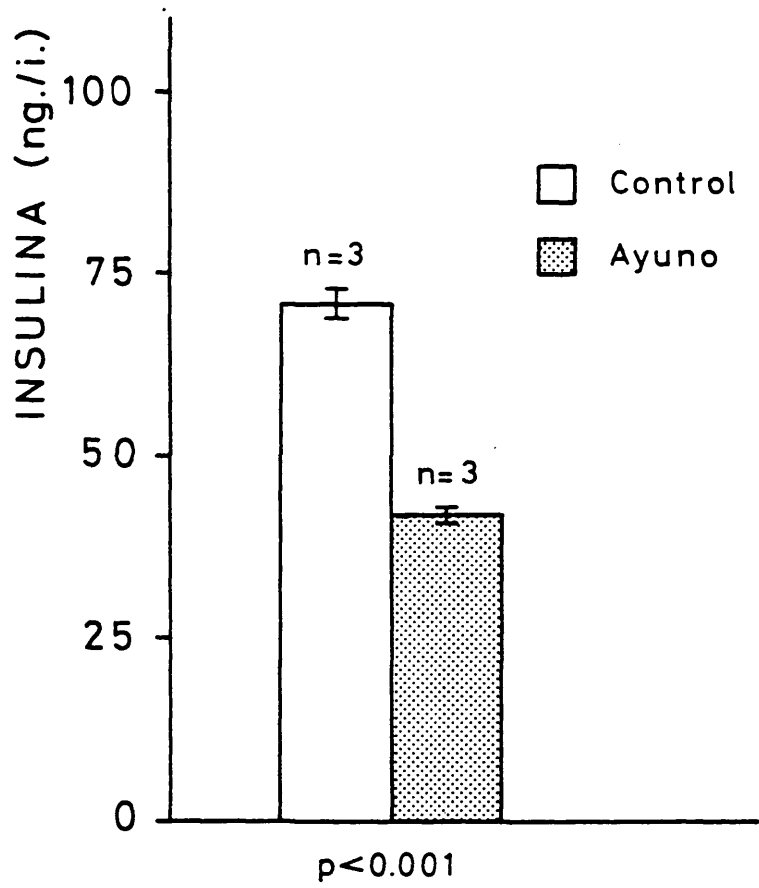


Fig. 42

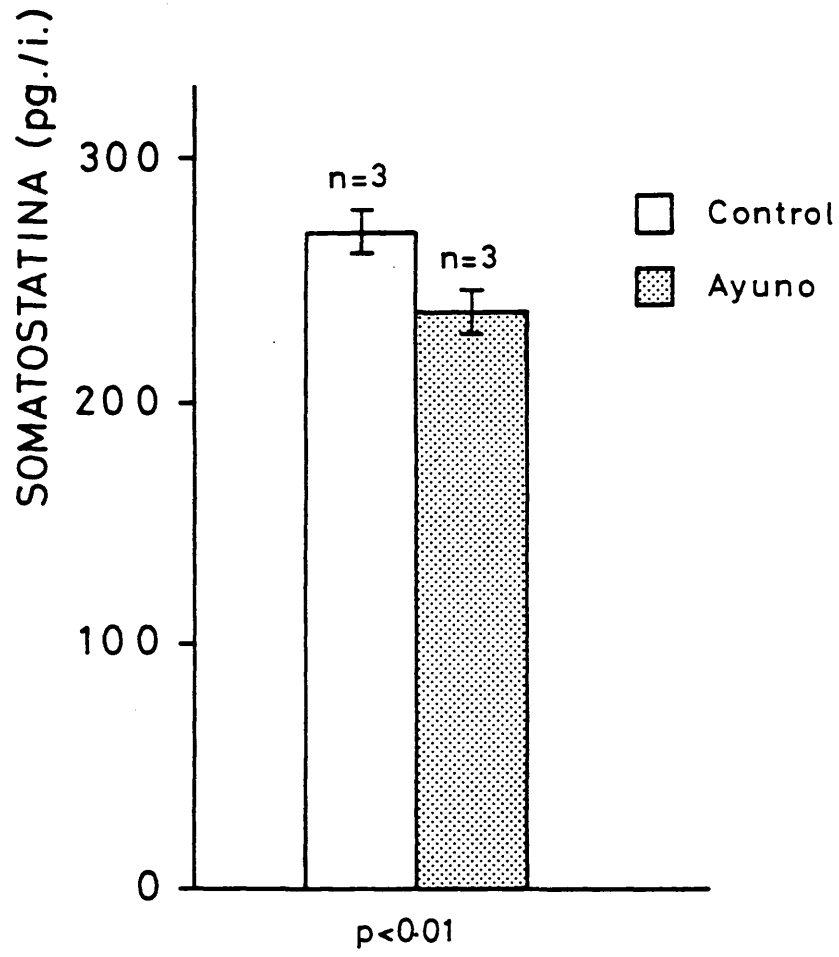


Fig. 43

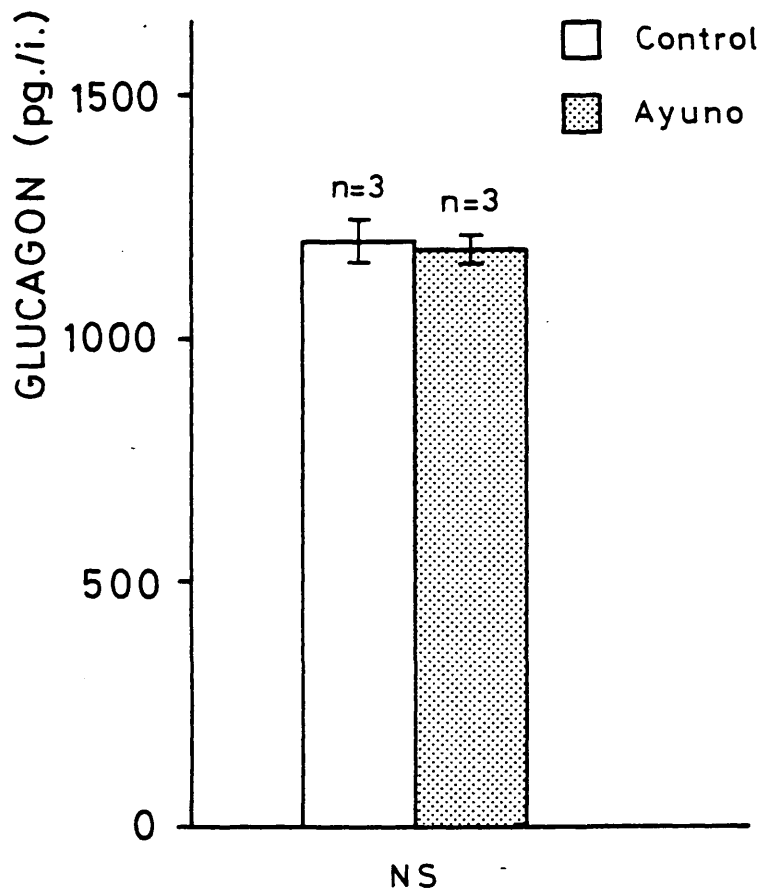


Fig. 44

DISCUSSION

DISCUSION

Como ya demostraron otros autores anteriormente (Howell y cols., 1973; Wolters y cols., 1977; Bouman y cols., 1979; Hedeskov y cols., 1975; Hellman y cols., 1973) la secreción de insulina, en respuesta a la glucosa, está inhibida significativamente durante el ayuno. El hecho de que la velocidad de oxidación y la utilización de glucosa no se modifiquen tras 48 horas de ayuno, indica que el ciclo glucosa-ácidos grasos no es el responsable del defecto insulino-secretor durante el ayuno. Esto está apoyado por datos previos de otros autores que presentan evidencias en contra de la actuación de este ciclo en los islotes (Berne, 1975; Hellman y cols., 1972; Matschinsky y cols., 1968).

Aunque algunos autores también encuentran que la oxidación de glucosa no se modifica tras 48 horas de ayuno (Hedeskov y cols., 1975), sin embargo la utilización de glucosa y la producción de lactato están siempre disminuidos (Wolters y cols., 1977; Levy y cols., 1976; Hedeskov y Capito, 1974). Esto se contradice con los resultados encontrados en este trabajo ya que la utilización de glucosa no se modifica tras 48 horas de ayuno a pesar de que la secreción de insulina está inhibida significativamente. Sin embargo, Wolter y cols. (1973) han encontrado también una velocidad normal de utilización de glucosa junto con una respuesta insulinosecretora defectuosa en islotes de ratas ayunadas 24 horas. Estos resultados parecen indicar que el defecto secretor durante el ayuno no es totalmente atribuible a un fallo en el metabolismo de la glucosa en los islotes.

El 2-bromoestearato es capaz de restaurar a valores normales la secreción de insulina en respuesta a glucosa 20 mM en islotes de ratas ayunadas 48 horas, pero no puede deducirse que actúe bloqueando la inhibición del metabolismo de la glucosa ya que este no se modifica durante el ayuno. Tampoco parece atribuible el efecto del 2-bromoestearato a un mecanismo inespecífico ya que solo afecta a la secreción en islotes de ratas ayunadas y en presencia de concentraciones estimulantes de glucosa (20 mM). Por el contrario, no modifica la secreción de insulina en respuesta a glucosa 3, 6 ó 20 mM, en islotes de ratas alimentadas, ni tampoco el metabolismo de la glucosa en islotes de ratas alimentadas ó ayunadas 48 horas.

El 2-bromoestearato potencia la secreción de insulina inducida por ácido palmítico en presencia de glucosa 6 mM. Esto unido a que el 2-bromoestearato es un inhibidor de la oxidación de ácidos grasos (Raaka y cols., 1979; Chase y Tubss 1972; Berne y cols., 1975), sugiere que actúa alterando el metabolismo de los lípidos. El destino metabólico de los ácidos grasos exógenos en los islotes se distribuye equitativamente entre oxidación y esterificación, las cuales son inhibida y estimulada respectivamente, por glucosa 16,7 mM (Berne, 1975). Se conoce que en el ayuno predomina en el hígado la oxidación de ácidos grasos sobre su esterificación (Zammit V.A., 1981; Ontko y cols., 1980). Es posible que 48 horas de ayuno puedan contrarrestar el efecto de la glucosa sobre el metabolismo de los lípidos en los islotes induciendo un incremento de la velocidad de oxidación de los ácidos grasos e inhibiendo su esterificación (¿disminución de los niveles

de glicerol-fosfato o malonil (CoA?). Una posible explicación de nuestros resultados podría ser la hipótesis de que la esterificación de los ácidos grasos (síntesis de triacilglicerol+fosfolípidos) puede jugar un papel importante en el mecanismo de secreción (Freinkel y cols, 1975; Clements y cols, 1975). La inhibición de la oxidación de ácidos grasos por el 2-bromoestearato puede aumentar indirectamente su esterificación hasta niveles compatible con una secreción normal de insulina (vease esquema al final de la discusión).

La estimulación transitoria de insulina en respuesta al palmitico podría deberse a un aumento de su tasa de esterificación que no se mantendría a un nivel suficiente como para permitir una estimulación continuada de la secreción. El 2-bromoestearato, inhibiendo la oxidación del ácido palmítico por las células de los islotes, aumentaría indirectamente su esterificación de forma sostenida y ello a su vez justificaría el hallazgo de una estimulación continua de la secreción.

Las células A pueden oxidar glucosa y preferentemente ácidos grasos a velocidades dependientes de su concentración extracelular (Edwards y Taylor, 1970; Ostenson y cols, 1979) y esta capacidad metabólica se ha relacionado con su poder para inhibir la secreción de glucagón, que ha sido claramente demostrada en el presente trabajo. El ayuno de 48 horas bloquea el efecto inhibitor de glucosa 20mM sobre la liberación de glucagón sin afectar la secreción basal (glucosa 3mM) y este hecho puede atribuirse a un fallo de las células A para metabolizar glucosa debido a la ausencia

cia de una respuesta insulínica suficiente (Ostenson y cols., 1979). El efecto del ayuno prolongado sobre la secreción de glucagón "in vitro" ha sido poco estudiado y no se encuentran en la literatura datos concretos sobre el efecto específico de la glucosa en esta situación metabólica. De nuestros resultados se deduce que en el ayuno existe un aumento relativo de la secreción de glucagón con respecto a la de insulina, que podría conducir "in vivo" a una hiperglucagonemia relativa.

El efecto inhibitor del ácido palmítico sobre la secreción de glucagón en presencia de glucosa 6 mM podría atribuirse a una acción directa del ácido graso, a través de su metabolismo y/o al aumento de la secreción de insulina, que favorecería la metabolización de la glucosa en las células A. Aunque no puede deducirse una relación causal, es significativo que el mínimo de secreción de glucagón coincide temporalmente con el máximo de la respuesta insulínica.

La adición de 2-bromoestearato convierte la acción ligeramente inhibitor del palmitato en una potenciación de la secreción de glucagón que incluso tiende a aumentar al disminuir la concentración de glucosa en el medio de perfusión de 6 a 3 mM, simultáneamente a la disminución de la secreción de insulina. Durante el ayuno prolongado, situación en la que es de esperar un aumento de la lipólisis endógena y una mayor disponibilidad de ácidos grasos por las células A, el 2-bromoestearato también potencia la secreción basal de glucagón (glucosa 3 mM) y se restau

ra parcialmente el efecto inhibidor de glucosa 20 mM (Fig. 35).

El 2-bromoestearato, por el contrario, no modifica la secreción basal de glucagón en islotes de animales alimentados.

Estos datos aparentemente indican que también en el caso del glucagón la inhibición de la oxidación de los ácidos grasos potencia su secreción.

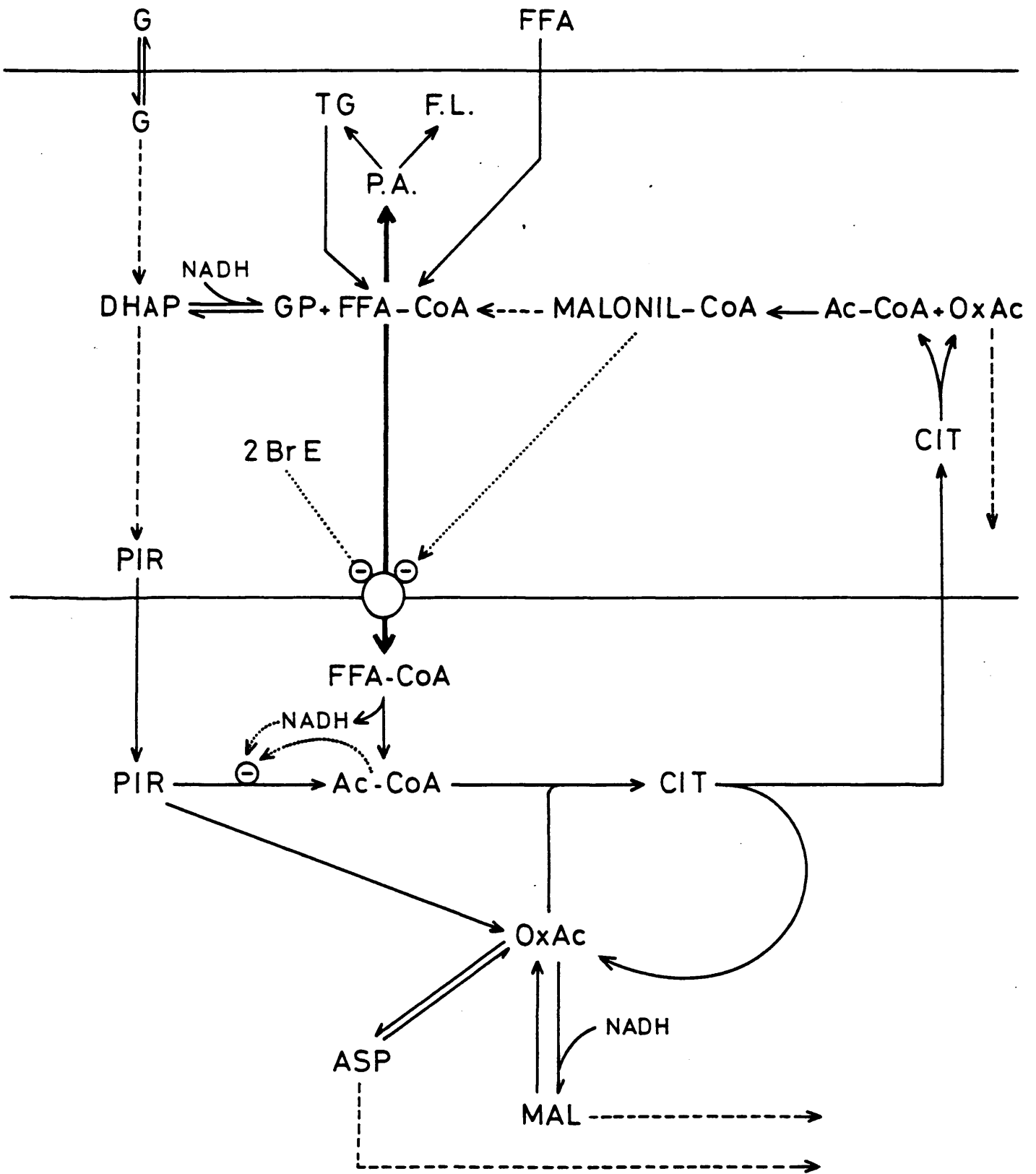
La esterificación de los ácidos grasos puede jugar un papel general (recambio de los fosfolípidos de membrana u otras acciones más específicas) en los procesos de secreción endocrina pancreática, como se ha postulado en el caso de la insulina.

El efecto inhibidor de la glucosa sobre la secreción basal de glucagón habría que explicarlo, según esta hipótesis, suponiendo que la glucosa inhibe la esterificación de los ácidos grasos en las células A.

La secreción de somatostatina se comporta en general de forma similar a la de insulina. Su respuesta al aumentar la concentración de glucosa es completamente inhibida por el ayuno de 48 horas. Esta inhibición podría ser explicada también en base a un predominio de la oxidación de ácidos grasos por las células D sobre su esterificación en las condiciones de ayuno. Esta conclusión es aparentemente apoyada por el hecho de que el 2-bromoestearato potencia la secreción de somatostatina inducida por el ácido palmíco así como su secreción basal (glucosa 3 mM) en islotes de ratas alimentadas y ayunadas.

El estudio simultaneo de la triple respuesta hormonal de los islotes de rata aislados parece indicar que no existe una interacción muy firme entre la secreción de las distintas hormonas entre sí. Esta afirmación viene sugerida por el hallazgo coetaneo de niveles altos de insulina y somatostatina o de somatostatina y glucagón.

En resumen, el ayuno prolongado bloquea el efecto específico de la glucosa sobre la triple respuesta hormonal de los islotes de Langerhans. El ácido 2-bromo-esteárico, inhibidor de la oxidación de los ácidos grasos, restaura una respuesta hormonal a la glucosa en el caso de la secreción de insulina y produce una respuesta exagerada en la secreción de glucagón y somatostatina. Estos datos sugieren que el metabolismo de los ácidos grasos en las células pancreáticas endocrinas puede jugar un papel regulador en los mecanismos de secreción.



CONCLUSIONES

- El ácido 2-bromoestearico restaura una respuesta insulinica normal a glucosa 20 mM en islotes de ratas ayunadas 48 horas. Este efecto no es reproducido por una dosis igual de ácido esteárico, lo que sugiere que es especifico del 2-bromo-acil derivado.
- El ácido 2-bromoesteárico potencia la secreción de insulina inducida por el ácido palmítico en presencia de una determinada concentración subestimulante (6 mM) de glucosa. Teniendo en consideración todo lo anterior más el conocido poder inhibidor del ácido 2-bromoesteárico sobre la oxidación de ácidos grasos de cadena larga, se deduce aparentemente que este bromo-acil derivado modifica la secreción de insulina inhibiendo la oxidación de los ácidos grasos en las células B de los islotes, posiblemente aumentada durante el ayuno prolongado.
- El defecto insulinosecretor durante el ayuno no es mediado paracrinamente por somatostatina pues la estimulación de esta ultima por glucosa es también inhibida por el ayuno.
- La potenciación de la secreción de somatostatina por el ácido 2-bromoesteárico en todas las condiciones estudiadas sugiere que la regulación de los procesos de oxidación y esterificación de ácidos grasos pueden participar en el control del mecanismo de secreción de esta hormona.
- La acción inhibidora de una concentración alta de glucosa sobre la secreción basal de glucagón es bloqueada durante

el ayuno prolongado. Este último inhibe por tanto la triple respuesta hormonal de los islotes a la glucosa.

- El hallazgo de una potenciación de la secreción basal de glucagón en presencia de ácido 2-bromosteárico en islotes de ratas ayunadas o en islotes controles (ratas alimentadas) tratados también con ácido palmítico parece indicar, como en el caso de insulina y glucagón, que la regulación de los procesos de oxidación y esterificación de los ácidos grasos desempeña un papel en el mecanismo de secreción hormonal.

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar-Parada, E., Eisentraut, A.M. and Unger, R.H.
Diabetes 18: 717, 1969.
- Anderson, E and J.A. Long.
Endocrinology 40: 92, 1974.
- Andrews, S.S.; S.A. López and W.G. Blackard.
Metabolism 24: 35, 1974.
- Arimura, A., D.H. Coy, M. Chiara; R. Fernandez-Durango, E. Samu
mols; K. Chiara, C.A. Meyers, A.V. Shally
Somatostatin. In: Bloon S.R. (Ed.) Gut Hormones. Churchill Livings
tone
Edinburgh London, New York: 437, 1978.
- Arimura, A., H. Sato, A. Dupont and A. Schally.
Science 189: 1007, 1975.
- Ashcroft, S.J.
Diabetologia 18: 5, 1980.
- Ashcroft, S.J.H., J.M. Basset, P.J. Randle.
Diabetes 21 (suppl.2): 538, 1972.
- Ashcroft, S.J.H., Weerasinghe, L., J.M. Basset and P.J. Randle.
Biochem. J. 126: 525, 1972.
- Berne, C.
J. Histochem. Cytochem. 23: 652, 1975
- Berne, C.
Biochem. J. 152: 667, 1975.
- Berne, C.
Biochem. J. 152: 661, 1975

- Berne, C. and Andersson, A.
J. Med. Sci. 86: 55, 1981.
- Boschero, A.C. and W.J. Malaisse.
Am. J. Physiol. 236: E139, 1979.
- Bouman, P.R., G.H.J. Wolters and W. Konijnendijk.
Diabetes 28: 132, 1979.
- Bouman, P.R., G.H.J. Wolters, W. Konijnendijk and R.S. Bosboom.
10th Acta Endocrinologica Congress Amsterdam 1975, Acta Endocrinol. (Suppl.) (kbh) 199: 37, 1975.
- Brazeau, P., W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. Rivier, R. Guillemin.
Science 1979: 77, 1973.
- Brolin, S.E. and C. Berne.
Met. Clin. Exp. 16: 1024, 1967.
- Buchanan, K.D., J.E. Vance and R. Williams.
Horm. Metabolism 18: 717, 1969.
- Buckman, M.T., J. Conway, J.A. Siebel and R.P. Eaton.
Metabolism 22: 1253, 1973.
- Campillo, J.E?, A.S. Luyckx, M.D. Torres and P.J. Lefebvre.
Diabetologia 16: 267, 1979.
- Capito, H.G. and C.J. Hedekov.
Biochem. J. 142: 653, 1974.
- Clements, jr. R.S., W.B. Rhoten and B.L. Poole.
Diabetes 24, 395, 1975.

- Coore, H.G. and P.J. Randle.
Biochem. J. 84: 78p, 1962.
- Chase, J.F.A. and P.K. Tubbs.
Biochem. J. 129: 55, 1972.
- Douglas, W.W.
Brit. J. Pharmacol. 34: 45, 1968.
- Duncombe, W.G.
Biochem. J. 88: 77, 1963.
- Edwards, J.C. and K.W. Taylor.
Biochim. Biophys. Acta 215: 310, 1970.
- Efendic, S., A. Nylén, A. Roovete and K. Uvnäs-Wallenstein.
FEBS Lett. 92 (1): 33, 1978.
- Freinkel, N.C., El Younsi and R.M.C. Dawson.
Eur. J. Biochem. 59: 245, 1975.
- Gerich, J.E., M. Langlois, V. Schneider, J.H. Karam and C. Noacca.
J. Clin. Invest. 53: 1284, 1974.
- Gerrit, H.J., W. Wolters, W. Konijnendijk and P.R. Bouman.
Diabetes 26: 530, 1977.
- Goberna, R., J. Tamarit jr., J. Osorio, R. Fussgänger, J. Tamarit
and E.F. Pfeiffer.
Horm. Metab. Res. 6: 256, 1974.
- Grodsky, G.M., A. Batts, L.L. Bennet, C. Vcela, N.B. Williams
and D.F. Smith.
Amer. J. Physiol. 205: 638, 1963.

- Hedekov, C.J. and K. Capito.
Biochem. J. 140: 423, 1974.
- Hedekov, C.J. and K. Capito.
Biochem. J. 152: 571, 1975.
- Hedekov, C.J. and K. Capito.
Horm. Metab. Res. 7: 1, 1975.
- Hedekov, C.J.
Physiological Reviews 60: 442, 1980.
- Hellman, B. and Idahl, L.A.
Diabetes 21: 992, 1975.
- Hellman, B. and L.A. Idahl.
Diabetes 21: 999, 1972.
- Hellamn, B.
Experientia 32: 155, 1973.
- Hellman, B., L.A. Idahl, A. Lernmark, J. Sehlin and I.B. Talje
dal.
Biochem. J. 138: 33, 1974.
- Hammar, H. and C. Berne.
Diabetologia 6: 526, 1970.
- Hellerstrom, C.
Acta Endocr. Copnh. 45: 122, 1964.
- Hermansen, K.
Diabetologia 19: 492, 1980.
- Herchuelz, A. and W.J. Malaisse.
Am. J. Physiol. 238: E96, 1980.

- Herchuelz, A. and W.J. Malaisse.
Am. J. Physiol. 238: E87, 1980.
- Herchuelz, A., A. Sener, W.J. Malaisse.
J. Membrane Biol. 57: 1, 1980.
- Herchuelz, A., Thonnart, N., A. Sener, W.J. Malaisse.
Endocrinology 1980.
- Howell, S.L. Thesis Univ. London 1967, citado por Montague y
Taylor Nature 217: 853, 1968.
- Howell, S.L., C. Green and W. Montague.
Biochem. J. 136: 343, 1973.
- Hunter, W.M. and F.C. Greenwood.
Nature 194: 495, 1962.
- Idahl, L.A.
Diabetologia 9: 403, 1974.
- Joost, H.G. and J. Beckman.
Metabolism 29: 23, 1980.
- Kuo, W.N., D.S. Hodgins and F. Kuo.
J. Biol. Chem. 218: 2705, 1973.
- Kuzime, T., M. Utsumi, G. Yoshino, K. Ishihare, Y. Hirose, H.
Makimura, S. Baba.
Diabetes 29: 71, 1980.
- Lacy, P.E. and M. Kostianovsky.
Diabetes 16: 35, 1961.
- Larsson, L.I., N. Goltermann, L. de Magistris, J.F. Rehfeld and

T.W. Schwartz.

Science 205: 1393, 1979.

- Lavine, R.L., N. Vogles, P.V. Perrino and L. Recant.
Endocrinology 97: 615, 1975.
- Lenmark, A. and G. Fex.
FEBS Lett. vol. 25, n^o 2: 287, 1972.
- Levy, J., A. Herchuelz, A. Sener and W.J. Malaisse.
Metabolism 25: 583, 1976.
- Light, A. and M.S. Simpson.
Biochem. Biophys. Acta 20: 251, 1956.
- Luft, R., S.E. Efendic, T. Hokfelt, O. Johansson and A. Arimura.
Med. Biol. 52: 428, 1974.
- Luyckx, A. and P.J. Lefebvre.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 133: 524, 1970.
- Malaisse, W.J.
Handbook of Physiology. Endocrinology. 197
- Malaisse, W.J., J. C. Hutton, A. Sener, J. Levy, A. Herchuelz,
G. Devis and G. Somers.
Membrane Biol. 38: 193, 1978.
- Malaisse, W.J., J.C. Hutton, S. Kawazu, A. Herchuelz, I. Vall
verde and A. Sener.
Diabetologia 16: 331, 1979.
- Malaisse, W.J. and F. Malaisse-Lagae.
J. Lab. Clin. Med. 72: 438, 1968.
- Malaisse, W.J., F. Malaisse-Lagae and P.H. Wright.

- Amer. J. Physiol. 213: 843, 1967.
- Malaisse, W.J., A. Sener and J. Levy.
The Journal of Biological Chemistry 251: 1731, 1976.
 - Malaisse, W.J., A. Sener, A. Herchuelz and J.C. Hutton.
Métabolism 28: 373, 1979.
 - Marliss, E.B., T.T. Daki, R.H. Unger, S. Soeldner and G.F. Cahill.
J. Clin. Invest. 49: 2256, 1970.
 - Matschinsky, F.M., J.E. Ellerman, J. Krzanowski, J. Loftler-
Brajtburg, R. Landgraf and R. Fertel.
J. Biol. Chem. 240: 1007, 1971.
 - Matschinsky, F.M. and A.S. Pagliara.
Metabolism 25 (Suppl.1): 1435, 1976.
 - Matschinsky, F.M., C.R. Rutherford and J.E. Ellerman.
Biochem. and Biophys. Res. Comm. Vol. 33, n° 5: 855, 1968.
 - Matthews, E.K.
Acta Diabet. Lat. (Suppl. 7): 83, 1970
 - Montague, W. and K.W. Taylor.
Nature 217: 853, 1968.
 - Muller, W.A., T.T. Aoki, J. P. Flatt, G.L. Blackburn, R.H. Egdahl
and G.J. Cahill jr.
Metabolism 25:1077, 1976.
 - Newsholme, E. A. and C. Start.
En: "Regulation in Metabolism". John Wiley and sons, ed. Londres,
1973.

- Niki, A. and H. Niki.
Biomedical Research 1: 189, 1980.
- Niki, A., H. Niki, H. Tsubochi, I. Miwa, T. Ohno and H. Kimura.
Biomedical Research 1 (Suppl.): 130, 1980.
- Oliver, J.R., V. Williams and P.H. Wright.
Proc. of the Soc. Exp. Biol. and Med. 154: 270, 1977.
- Ontko, J.A.
J. Biol. Chem. 247: 1788, 1972.
- Ontko, J.A. and M.L. Johns.
Biochem. J. 192: 959, 1980.
- Orci, L., D. Beatens, M.P. Dubois and C. Rufener.
Horm. Metab. Res. 7: 400, 1975.
- Orci, L., D. Beatens, C. Rufener, M. Amherdt, M. Ravazzda, P. Studer, F. Malaisse-Lagae and R.H. Unger.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73: 1338, 1976.
- Orci, L. and R.H. Unger.
Lancet 2: 1243, 1975.
- Osterson, C.G.
Diabetologia 17: 325, 1979.
- Osterson, C.G., A. Agren and A. Andersson.
Biochem. Biophys. Acta 628: 152, 1980.
- Patel, Y.C., M. Amhert and L. Orci.
Endocrinology 104: 676, 1979.

- Patel, Y.C. and S. Reichlin.
Endocrinology 192: 523, 1978.
- Raaka, B.M. and J.M. Lowenstein.
J. Biol. Chem. 254: 6755, 1979.
- Randle, P.J., P.B. Garland, E.A. Newsholme and C.N. Hales.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 131: 324, 1965.
- Ribalet, B. and P.M. Beigelman.
Am. Physiol. Soc. C124, 1980.
- Rodriguez-Candela, J.L.
Proc. 4th Congr IDF, p. 629, (1961) and Perspectives in Biology,
1963 (Elsevier publ. comp. Amsterdam 1963).
- Rubin, R.P.
Pharmacol, Rev. 22: 389, 1970.
- Schauder, P., Mc. Intosh, J. Arends and H. Frerichs.
Diabetes 28: 204, 1979.
- Schusdziarra, V., Ruiller, V. Harris, J.M. Conlon and R.H. Unger.
Endocrinology 103: 2264, 1978.
- Sehlin, J. and I.B. Taljedal.
Nature 253, 635, 1975.
- Seino, S., H. Sakurai, Y. Seino, K. Tsuda, K. Tanigawa, H. Kuyuya,
Y. Goto and H. Tmura.
Diabetes 29: 323, 1980.
- Selawry, H., R. Gutman, G. Fink and L. Recaut.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 198, 1973.

- Sener, A. and W.J. Malaisse.
Diabetes and Metabolism 4: 127, 1978.
- Shapiro, B., M. Berelowitz, B.L. Pimstone and M. Scheppard.
Diabetes 28: 182, 1979.
- Spector, A.A. and D. Steimberg.
J. Biol. Chem. 240: 3747, 1965.
- Tamarit, J.
Arch. Med. Exp. XVIII: 307, 1965.
- Tamarit-Rodriguez, J.
Acta Physiol. Scand. 103: 379, 1978.
- Thorell and Johansson.
Biochim. Biophys. Acta 251: 363, 1971.
- Unger, R.H., A.M. Eisentraut, M.S. Mc. Call, S. Keller, M.C.
Land and L.L. Madison.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 102: 621, 1959.
- Vale, W.N., J. Rivier, J. Villareal, C. Rivier, C. Douglas and
M. Brown.
Metab. Clin. Exp. 25 (Suppl.): 1491, 1976.
- Van Lan, V., N. Yamaguchi, M.J.Garcia, E.R.Ramey and J.C. Penhos.
Endocrinology 94: 671, 1974.
- Wolters, G.H.J., W. Konijnendijk and P.R? Bouman.
Diabetes 26: 530, 1977.
- Yalow, R.S. and S.A. Bergson.
Radiology 66: 196, 1956.

- Yalow, R.A. and S.A. Bergson.
Nature 184: 1648, 1059
- Yalow, R.S. and S.A. Bergson.
Diabetes 9: 254, 1960.
- Yalow, R.S. and S.A. Bergson.
J. Clin. Invest. 39: 1157, 1960.
- Zammit, V.A.
Sciences 46: 1981