



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Esta tesis doctoral contiene un índice que enlaza a cada uno de los capítulos de la misma.

Existen asimismo botones de retorno al índice al principio y final de cada uno de los capítulos.

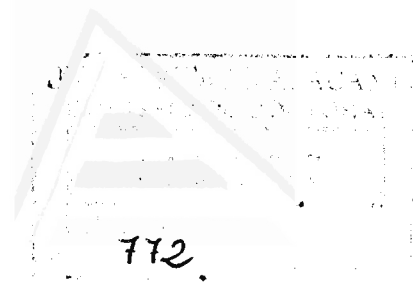
[Ir directamente al índice](#)

Para una correcta visualización del texto es necesaria la versión de [Adobe Acrobat Reader 7.0](#) o posteriores

Aquesta tesi doctoral conté un índex que enllaça a cadascun dels capítols. Existeixen així mateix botons de retorn a l'índex al principi i final de cadascun dels capítols .

[Anar directament a l'índex](#)

Per a una correcta visualització del text és necessària la versió d' [Adobe Acrobat Reader 7.0](#) o posteriors.



UNIVERSIDAD DE ALICANTE
FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

**VARIABILIDAD FUNCIONAL
DE
LOS ISLOTES PANCREÁTICOS DE RATÓN**

TESIS PRESENTADA POR :
BERNARDO OLIVERA ALONSO
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

ALICANTE, 1997





Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

El trabajo realizado en esta tesis ha sido parcialmente financiado por los siguientes proyectos :

Generalitat Valenciana :

GV-3117-95

Ministerio de Sanidad :

FIS 94/0014-01

FIS 96/1994-01

Unión Europea :

ERBSC1-CT920833



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

D. BERNAT SORIA ESCOMS, Catedrático de Fisiología del Departamento de Fisiología de la Universidad de Alicante.

CERTIFICA :

Que el presente trabajo de investigación sobre "VARIABILIDAD FUNCIONAL DE LOS ISLOTES PANCREATICOS DE RATON", presentado por D. Bernardo Olivera Alonso, para optar al grado de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección en la Facultad de Medicina de la Universidad de Alicante y puede presentarse para su defensa.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Alicante a veinticinco de agosto de mil novecientos noventa y siete.

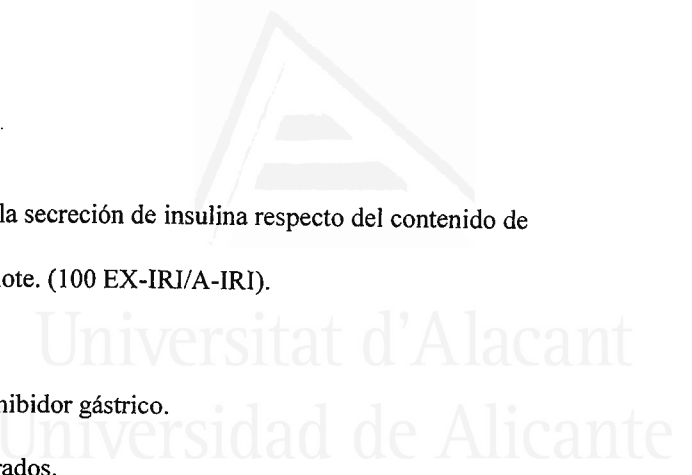
Fdo.: Bernat Soria Escoms




Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

ABREVIATURAS

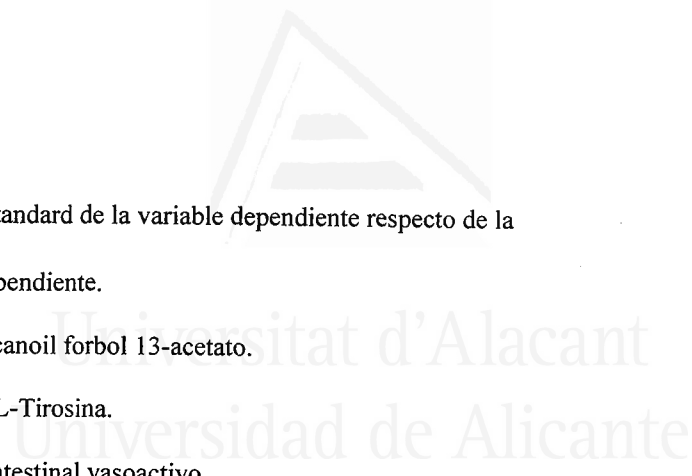
a	Ordenada en el origen de la recta de regresión simple.
ACh	Acetil colina.
ADP	Adenosin-5'-difosfato.
AMP	Adenosin-5'-monosfato.
Arg	Aminoácido L-Arginina.
A-IRI	Contenido de insulina inmunorreactiva en ácido, pg/islote.
Ain-IRI	Contenido inicial de insulina inmunorreactiva en ácido (EX-IRI+A-IRI), pg/islote.
ATP	Adenosin-5'-triosfato.
$\gamma^{32}\text{ATP}$	Adenosin-5'-triosfato con isótopo ^{32}P en fosfato γ .
b	Pendiente de la recta de regresión simple.
BSA	Albúmina sérica bovina.
c.p.m.	Cuentas por minuto.
Ca^{2+}	Ion calcio.
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Concentración intracelular de ion calcio
cAMP	Adenosin-3'-5'-monosfato cíclico.
CO_2	Dióxido de carbono.
CoA	Coenzima A.
C.V.	Coefficiente de variación.
DHU	Dehidrouramilo.
DS	Desviación standard de los datos de la muestra.
ES	Error standard de la media.
EX-IRI	Secreción de insulina inmunorreactiva, pg/islote/30 minutos.



%FEX	Porcentaje de la secreción de insulina respecto del contenido de insulina del islote. (100 EX-IRI/A-IRI).
G	Glucosa.
GIP	Polipéptido inhibidor gástrico.
°C	Grados centígrados.
GTP	Guanosin-5'-trifosfato.
h	Unidad de tiempo: hora.
HCl	Acido clorhídrico.
HEPES	Acido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-etansulfónico.
¹²⁵ I	Isótopo 125 del yodo.
IBMX	Isobutilmetilxantina.
IGF-I	Factor de crecimiento semejante a la insulina, tipo I.
IRI	Insulina inmunorreactiva.
K ⁺	Ion potasio.
K _{ATP}	Canales de potasio dependientes de ATP.
KCl	Cloruro potásico.
KDa	Unidad de peso molecular: kilodalton.
K _m	Constante cinética enzimática.
KRB	Solución de Krebs-Ringer-Bicarbonato.
Lys	Aminoácido L-Lisina.
M	Unidad de concentración: molar.
MgCl ₂	Cloruro magnésico.
μl	Unidad de volumen: microlitro.
μM	Unidad de concentración: micromolar.
μm	Unidad de longitud: micrometro.
ml	Unidad de volumen: mililitro.
mM	Unidad de concentración: milimolar.



mm	Unidad de longitud: milímetro.
mRNA	Acido ribonucleico mensajero.
ms	Unidad de tiempo: milisegundo.
n	Número de datos de la muestra.
NaCl	Cloruro sódico.
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido + Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADH + NADPH).
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido.
NaH ₂ PO ₄	Dihidrógeno ortofosfato sódico.
NaHCO ₃	Bicarbonato sódico.
ng	Unidad de masa: nanogramo.
NIDDM	Diabetes mellitus no insulino dependiente.
nm	Unidad de longitud: nanometro.
nM	Unidad de concentración: nanomolar.
O ₂	Oxígeno molecular.
p	Probabilidad de error al considerar diferentes las medias de dos muestras, comparándolas por la prueba de la t de student.
³² P _i	Fosfato inorgánico del isótopo 32 del fósforo.
PC1, PC2, PC3	Convertasas de proproteína (proinsulina).
pg	Unidad de masa: picogramo.
PP	Polipéptido pancreático.
r.p.m.	Revoluciones por minuto.
r ²	Coefficiente de determinación de la recta de regresión simple.
RIA	Radioinmunoensayo.
R _x	Valor de referencia de la variable independiente.
s _x	Desviación standard de la variable independiente.
s _y	Desviación standard de la variable dependiente.



$S_{y/x}$	Desviación standard de la variable dependiente respecto de la variable independiente.
TPA	12-O-tetradecanoil forbol 13-acetato.
Tyr	Aminoácido L-Tirosina.
VIP	Polipéptido intestinal vasoactivo.
W-IRI	Contenido de insulina inmunoreactiva en agua, pg/islote.
Win-IRI	Contenido inicial de insulina inmunoreactiva en agua (EX-IRI + W-IRI).
x_i	Datos de la muestra tomada como variable independiente.
y_c	Valor de la variable dependiente calculado por la recta de regresión simple.
y_i	Datos de la muestra tomada como variable dependiente.
y_t	Valor de la variable dependiente calculado, para corregir la media y la desviación standard, mediante la pendiente de la recta de regresión simple y el valor de referencia de la variable independiente. $y_t = y_i + (R_x - x_i)b$
Zn^{2+}	Ion cinc.



ÍNDICE

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Bases morfológicas de la fisiología del Islote de Langerhans.	2
1.1.1.	Descripción del islote de Langerhans.	2
1.1.2.	Circulación intraislote.	5
1.1.3.	Identificación morfológica.	6
1.2.	Acoplamiento estímulo - secreción.	7
1.2.1.	Síntesis y almacenamiento de insulina.	7
1.2.1.1.	Endopeptidasas.	11
1.2.2.	Secreción de insulina.	14
1.2.2.1.	Iniciadores y potenciadores de la secreción de insulina.	16
1.2.2.2.	Metabolismo de nutrientes.	17
1.2.2.3.	Calcio intracelular.	17
1.2.2.4.	Fosforilación de proteínas.	18
1.2.2.4.1.	Proteín quinasa A.	19
1.2.2.4.2.	Proteín quinasa C.	19
1.2.2.4.3.	Proteín quinasas dependientes de Ca ²⁺ -Calmodulina.	20
1.2.2.5.	Exocitosis.	22
1.3.	Esquema general del control de la secreción de insulina.	24
1.4.	Heterogeneidad y Variabilidad del islote de Langerhans.	25
1.4.1.	Heterogeneidad celular en células aisladas.	25
1.4.2.	Variabilidad morfológica del islote de Langerhans.	29
1.4.3.	Heterogeneidad células-islote.	30



2.	OBJETIVOS	32
2.1.	Objetivo general.	33
2.2.	Objetivos específicos.	33
2.2.1.	Estudio de la variabilidad funcional de los islotes pancreáticos.	33
2.2.2.	Efecto de la metodología utilizada.	34
2.2.3.	Estudio de la variabilidad debida a los depósitos de insulina.	35
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	38
3.1.	Material.	39
3.1.1.	Animales de experimentación.	39
3.1.2.	Reactivos.	39
3.1.3.	Aparataje.	40
3.1.4.	Software.	41
3.1.5.	Soluciones.	42
3.2.	Métodos.	43
3.2.1.	Obtención de islotes de Langerhans.	43
3.2.2.	Incubación de los islotes.	44
3.2.3.	Tamaño del islote.	44
3.2.4.	Contenido de insulina del islote.	44
3.2.5.	Radioinmunoanálisis de insulina.	45
3.2.6.	Análisis estadístico.	46

4.	RESULTADOS	50
4.1.	En el páncreas de ratón no existen islotes silentes.	51
4.2.	La respuesta de los islotes únicos depende de la concentración de glucosa.	54
4.3.	Relación de la secreción de insulina, inducida por glucosa, y del contenido de insulina con el tamaño del islote.	59
4.3.1	Secreción.	59
4.3.2.	Contenido.	63
4.3.3.	Secreción y contenido con glucosa 3 mM y 22 mM.	71
4.4.	Determinación mediante RIA inespecífico de las distintas insulinas inmunorreactivas contenidas en el islote.	85
4.5.	La albúmina (BSA) no es necesaria en el medio de incubación para estimular la secreción de insulina con glucosa.	88
4.6.	El contenido de IRI total se puede determinar en presencia de BSA, sin ácido.	88
4.7.	La albúmina (BSA) en el medio de incubación aumenta el contenido de insulina inmunorreactiva en ácido (A-IRI), pero no el contenido de insulina inmunorreactiva en agua.	92
4.8.	La secreción de insulina, inducida por K^+ 50 mM o por glucosa y potenciada por IBMX, se relacionan con la insulina inmunorreactiva en agua.	92
4.9.	La adrenalina inhibe la secreción de insulina y actúa sobre la insulina inmunorreactiva en agua.	97
4.10.	La glucosa induce la síntesis de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI).	103



5.	DISCUSIÓN	107
5.1.	El funcionamiento integrado del islote resuelve la heterogeneidad de las células B aisladas.	108
5.1.1.	No existen islotes silentes.	108
5.1.2.	Los islotes responden a la glucosa en forma concentración dependiente.	109
5.1.3.	El tamaño del islote es un factor de variabilidad.	109
5.2.	Insulinas inmunorreactivas contenidas en el islote.	111
5.2.1.	La incubación de los islotes en presencia de albúmina aumenta el contenido total de insulina inmunorreactiva en ácido (A-IRI).	111
5.2.2.	El islote contiene dos fracciones de insulina inmunorreactiva.	114
5.3.	Los secretagogos inducen la liberación de insulina y modifican la insulina inmunorreactiva en agua.	117
6.	CONCLUSIONES	121
7.	BIBLIOGRAFIA	124



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

INTRODUCCION



1. INTRODUCCION

1.1. Bases morfológicas de la fisiología del Islote de Langerhans

1.1.1 Descripción del Islote de Langerhans

Los islotes de Langerhans son racimos de tejido endocrino distribuidos por el páncreas exocrino en todos los vertebrados superiores y teleosteos. Cada islote es una mezcla compleja de células y puede funcionar separadamente, como un microórgano, o también concertado como páncreas endocrino. En los mamíferos, los islotes de Langerhans constituyen únicamente un 1% del parénquima pancreático. El número de células y el tamaño del islote de Langerhans varía desde unas pocas células y $<40 \mu\text{m}$ de diámetro hasta 5000 células y $400 \mu\text{m}$ de diámetro. Los islotes de tamaño $<160 \mu\text{m}$ de diámetro comprenden el 75% de los islotes, pero sólo suponen un 15% del volumen, y los islotes $>250 \mu\text{m}$ comprenden un 15% de los islotes y ocupan un 60% del volumen (Bonner-Weir, 1991).

Hay cuatro tipos principales de células endocrinas en los islotes de mamíferos:

	células B	productoras de insulina
células no-B	{ células A	productoras de glucagón
	{ células D	productoras de somatostatina
	{ células PP	productoras de polipéptido pancreático



Células B: son poliédricas (pirámides truncadas), están muy granuladas, con gránulos secretorios de unos 250 - 300 nm de diámetro. Hay dos tipos de gránulos en la célula B:

- gránulos maduros, presentan un núcleo denso a los electrones y una amplia membrana envolvente que deja un halo en su interior.

- gránulos inmaduros, presentan poco o ningún halo, de contenido moderadamente denso a los electrones y recubrimiento de clatrina.

Los gránulos inmaduros son el principal, sino el único, lugar de conversión de proinsulina a insulina. Otros cambios, como la pérdida de la cubierta de clatrina, acidificación del contenido de los gránulos, y cristalización de insulina se produce en la maduración de los gránulos ricos en proinsulina a gránulos ricos en insulina. La proporción de células B en los islotes varía de especie a especie. En los islotes de ratones normales hay aproximadamente un 80% de células B.

Células A: son más pequeñas y columnares que las B. Están muy granuladas, con gránulos de unos 200 - 250 nm de diámetro.

Células D: son más pequeñas que las células A y B. Están muy granuladas, y suelen presentar forma dendrítica. Los gránulos tienen un tamaño de unos 200 - 250 nm de diámetro.

La figura 1.1 muestra la imagen de un islote de Langerhans donde se observan las distintas células endocrinas que lo forman, teñidas de distinto color. Las células B aparecen de color verde, las células A se presentan de color azul y las células D de color rojo.

Las células no endocrinas incluyen células endoteliales, células nerviosas y fibroblastos.

El islote está recubierto por una cápsula formada por una capa de fibroblastos y fibras de colágeno.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

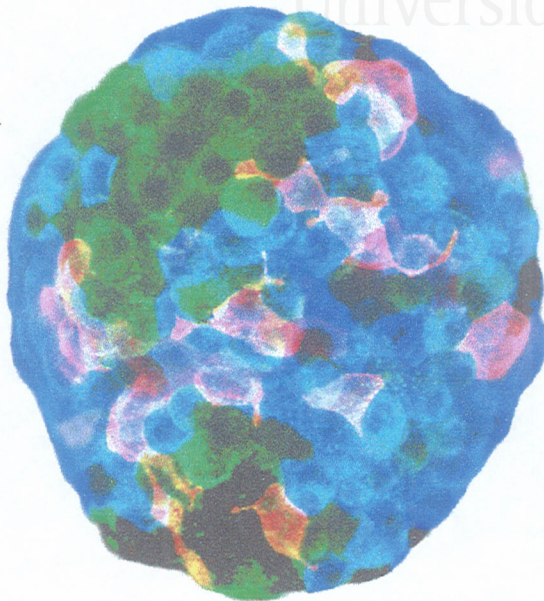


Figura 1.1. Imagen del islote de Langerhans. Distribución celular en islote pancreático de ratón. Las células B aparecen de color verde, las células A son las de color azul y las células D de color rojo. *Tomado de: R.L. Sorenson y T.C. Brelje. Department of Cell Biology and Neuroanatomy. University of Minnesota. (<http://www.novo.dk/hri>)*



1.1.2. Circulación intraislote

El islote de Langerhans de rata está formado por un núcleo de células B envueltas en un manto, de un grosor de una a tres células, de células no-B.

Los microcapilares forman la infraestructura de un islote. La arteriola entra en el islote de Langerhans por una de las discontinuidades del manto de células no-B, y llega directamente al núcleo de células B, desde donde se ramifica en capilares fenestrados, que siguen un camino tortuoso, primero a través del núcleo de células B y después a través del manto de células no-B. Los microcapilares eferentes confluyen en vénulas colectoras. El tipo de microvascularización varía según el tamaño del islote. En los islotes grandes, los vasos eferentes confluyen en el espacio subcapsular, en los pequeños se extienden por el tejido exocrino unos 50 - 100 μm antes de confluir en las vénulas colectoras (Bonner-Weir, 1991). Las células B, de rata, presentan dos caras libres hacia los capilares, y entre unas ocho a diez células forman una roseta alrededor del capilar, dando lugar a la forma tubular del capilar (Bonner-Weir, 1988). En el caso de los islotes de ratón (Figura 1.1) la distribución celular es distinta y las células B forman grupos celulares que se intercalan entre células no-B.

Hay bastantes evidencias de que las células B poseen una polarización morfológica funcional. En células B desgranuladas experimentalmente, los gránulos remanentes están polarizados hacia la capilaridad central.

En la unión de tres o más células B existen canalículos con microvilli interdigitados. Los desmosomas, que actúan como unión mecánica, se encuentran principalmente en esta zona. Esta superficie está especializada en funciones sensoras o secretoras. Dos líneas de evidencia sugieren una función sensora:

- los microvilli están enriquecidos, varias veces, en un transportador de glucosa encontrado en hígado y células B (Orci *et al.*, 1989),
- la exclusión de figuras de exocitosis en la región canalicular (Bonner-Weir, 1989).



1.1.3. Identificación morfológica

Mediante autorradiografía de alta resolución, Orci siguió la vía de transformación de proteínas formadas de nuevo, desde el retículo endoplásmico rugoso hacia los gránulos de las vesículas secretoras (Orci *et al.*, 1985).

A los 15 minutos, después de su síntesis, la mayor parte de las moléculas de proinsulina es recuperada en el complejo de Golgi, y se mueven desde las cisternas de Golgi *cis* a las *trans*, donde son empaquetadas en vesículas recubiertas de clatrina (Orci *et al.*, 1988). Durante, y poco después de su separación del complejo de Golgi, estas vesículas parecen estar uniformemente llenas de material proteico, de moderada densidad a los electrones. En este estadio se inicia la transformación de la proinsulina (Orci *et al.*, 1984) (Orci *et al.*, 1985) (Orci *et al.*, 1988). Esta iniciación depende, probablemente, de la presencia de, primero, componentes de membrana que crean condiciones intravesiculares para la conversión proteolítica y, segundo, de enzimas que hidrolicen las proteínas precursoras sintetizadas; la proteína más importante, la insulina, cristaliza como complejo de Zn^{2+} y ocupa el núcleo de la vesícula secretora (Howell, 1984).

En cuanto al requerimiento energético, el ATP no parece necesario para la formación del gránulo, aunque sí, para el transporte de la proinsulina al retículo endoplásmico rugoso o al complejo de Golgi (Howell, 1972; citado por Howell y Tyhurst, 1982), y también para el proceso de conversión de proinsulina en insulina (Rhodes *et al.*, 1987).

Una hora después de la síntesis de su precursor, la insulina es el principal producto de las vesículas que han perdido la cubierta de clatrina (Orci *et al.*, 1985) (Orci *et al.*, 1987).

Las células B, de adulto, tienen una cantidad relativamente grande de insulina almacenada (50 pg/célula) (Pipeleers *et al.*, 1987). Dean (Dean, 1973; citado por Howell y Tyhurst, 1982) mediante estudios morfométricos de gránulos (en ratones), observó un promedio de unos 13000 gránulos/célula B, que corresponden a un 10% del volumen celular, lo cual está de acuerdo con la observación de que la cantidad relativa de insulina es un 10% del contenido proteico del islote.

Inhibiendo la secreción de insulina, inducida por glucosa, con adrenalina, sin afectar a la biosíntesis de insulina, se observa un aumento de 120% en el número de gránulos (hasta 28000/célula) en 45 minutos (Dean, 1976; citado por Howell y Tyhurst, 1982). La biogénesis de gránulos que esto implica es considerable, pues la velocidad máxima de secreción que se alcanza normalmente es un 10% del contenido de insulina/hora; así que, para mantener el contenido de insulina, se requiere la generación de unos 1300 gránulos/célula/hora. Se ha calculado que hay unas 200000 moléculas/gránulo (Howell, 1974; citado por Howell y Tyhurst, 1982), por lo que una secreción activa debería liberar unas $2-6 \cdot 10^8$ moléculas/hora de hormona.

En una minoría de células B del islote, las vesículas secretoras contienen principalmente proinsulina, como si no se produjera la conversión en estas células antes del almacenamiento y/o secreción.

El pH del gránulo es importante para iniciar la conversión proteolítica de la proinsulina. Se han identificado dos endopeptidasas responsables de la conversión (Davidson *et al.*, 1988). El pH de los gránulos de insulina aislados es del orden de 5.0 - 5.5; las vesículas de Golgi-*trans* tienen pH neutro; los gránulos inmaduros tienen pH intermedio entre los anteriores (Hutton, 1982).

1.2. Acoplamiento estímulo - secreción

1.2.1. Síntesis y almacenamiento de insulina

Cualquier incremento en la secreción de insulina es rápidamente compensado por un incremento correspondiente en la biosíntesis de proinsulina, de forma que las reservas de las células B son rellenadas continuamente. Por tanto, la regulación de la biosíntesis de proinsulina es un aspecto muy importante de la función de la célula B.

En células B de islotes pancreáticos normales, la biosíntesis de proinsulina es específicamente regulada por muchos factores, de los que la glucosa es el más relevante fisiológicamente. A corto plazo (<2h), la biosíntesis de proinsulina inducida por glucosa es regulada a

nivel de traducción. Para largos periodos de estimulación (>6h) hay un grado adicional de control a nivel de transcripción, así como un aumento de la estabilidad del mRNA de preproinsulina, que puede contribuir al control de la biosíntesis de proinsulina; pero este control sólo tendría importancia en condiciones fisiológicas inusuales, como realimentación después de ayuno prolongado o hiperglucemia en NIDDM. Por tanto, en condiciones fisiológicas normales, el control fino, minuto a minuto, de la biosíntesis de proinsulina es principalmente mediado a nivel de traducción (Skelly *et al.*, 1996).

Dos principales cambios conformacionales culminan en la formación del núcleo del gránulo, la homohexamerización de proinsulina y la condensación de insulina, sensibles al Zn^{2+} y ocurren en la salida del retículo endoplásmico y en la llegada a los gránulos inmaduros, respectivamente (Huang y Arvan, 1995).

Los cristales de insulina son más estables a pH próximo al punto isoelectrico (5.5 - 6.0) y en presencia de Zn^{2+} . Prácticamente, la totalidad del Zn^{2+} se encuentra en el núcleo del gránulo, unido covalentemente a moléculas de insulina, a través del grupo histidina B10, en forma de hexámero (dos átomos de Zn^{2+} por cada seis moléculas de insulina) (Hill *et al.*, 1991) (Bryant *et al.*, 1993) (Bentley *et al.*, 1992). Está claro que la proinsulina también puede unir Zn^{2+} de forma similar, pero la molécula Zn^{2+} -Proinsulina es relativamente soluble, por lo que la condensación en los gránulos sólo ocurre después de la conversión de proinsulina en insulina (Howell y Tyhurst, 1982).

La figura 1.2 representa la estructura del hexámero de insulina coordinado con Zn^{2+} , de forma cilíndrica de diámetro 50 Å y altura 35 Å, a partir de los datos de Hill (Hill *et al.*, 1991). Los monómeros de insulina se asocian de forma antiparalela para formar dímeros (representados en un mismo color) en cuya estabilidad intervienen los restos glutamato B13. En presencia de Zn^{2+} tres dímeros se asocian para formar hexámeros. Dos átomos de Zn^{2+} se colocan en el eje axial del cilindro, a una distancia de 15.9 Å entre sí, y los seis enlaces de coordinación de cada Zn^{2+} se unen con tres restos Histidina B10, uno de cada dímero, hacia el centro del cilindro y tres moléculas de agua orientadas hacia el exterior.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

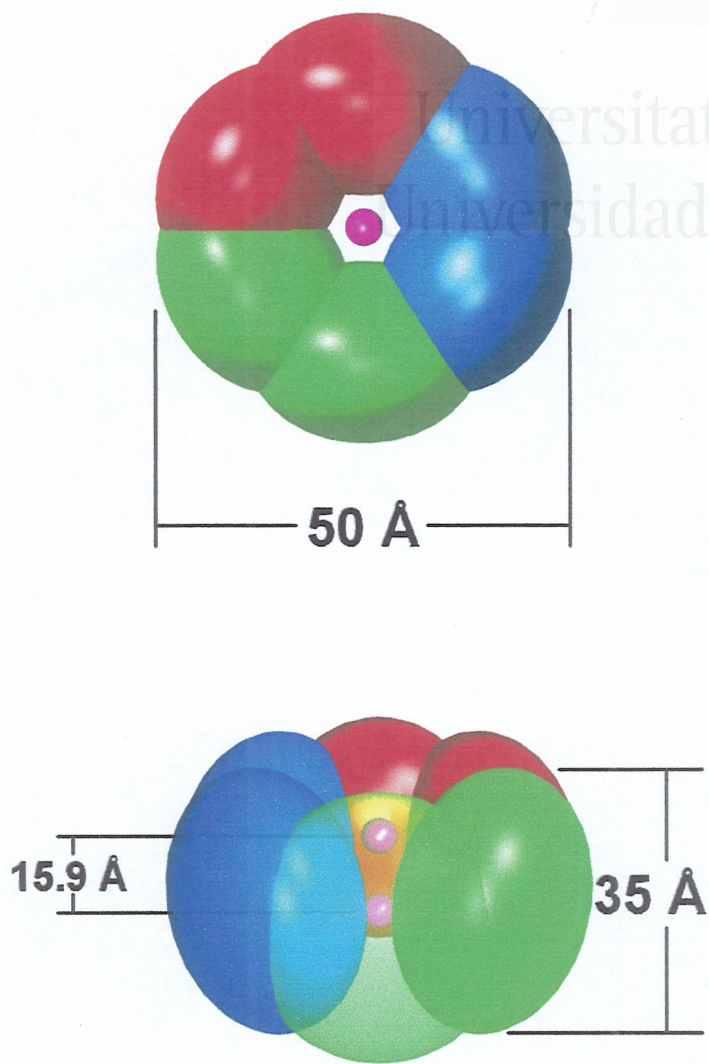


Figura 1.2. Representación del hexámero de insulina (vistas axial y transversal). El hexámero está formado por tres dímeros de insulina coordinados con dos átomos de Zn^{2+} que estabilizan la estructura. *Realizado según datos de Hill et al., 1991.*

La formación de gránulos secretores de insulina se inicia en el retículo de Golgi-*trans*. La maduración se caracteriza por la pérdida de la cubierta de clatrina de la membrana del gránulo y cambios en la morfología del núcleo del gránulo. La conversión proteolítica de proinsulina a insulina se produce en la maduración y se inicia por cambios en la composición iónica del gránulo inmaduro. Las proteínas contenidas en los gránulos pueden tener propiedades físicas comunes que las permiten coagregarse o interactuar con la membrana del retículo de Golgi-*trans*. Muchas tienen puntos isoeléctricos relativamente ácidos, que corresponden al pH del gránulo, y pueden fijar Ca^{2+} .

Los gránulos secretores tienen en su membrana una bomba de H^+ dependiente de ATP, que acidifica el gránulo hasta el pH óptimo de las enzimas convertidoras de la proinsulina, por lo que el aumento de ATP, provocado por el aumento de la concentración de glucosa, activará la maduración de los gránulos inmaduros (Rhodes *et al.*, 1987).

La exposición de los islotes a altas concentraciones de glucosa conduce a mejorar la secreción de insulina estimulada posteriormente por glucosa. La insulina recién sintetizada implica la creación o el aumento de un *pool* de insulina como respuesta al estímulo inicial (Hoenig *et al.*, 1986) (Hutchins y Merrell, 1985).

Después de la exocitosis, la mayoría de las membranas de los gránulos se reciclan hacia el retículo de Golgi-*trans* para incorporarse a las nuevas vesículas. (Hutton, 1994)

La eliminación endoproteolítica de pares de aminoácidos básicos es el mecanismo clave del procesamiento específico de moléculas precursoras de hormonas. En la conversión de proinsulina están implicadas dos endopeptidasas, PC1 (o PC3) y PC2. Ambas siguen un patrón de incremento de densidad gradual en la vía secretora, siendo superior en los gránulos secretores inmaduros. La proinsulina se detecta principalmente en el aparato de Golgi y en los gránulos secretores inmaduros recubiertos, localizados en el área de Golgi. PC1 y PC2 se localizan en los gránulos ricos en proinsulina. La coexpresión de PC1, PC2 y proinsulina indica que estas proteasas están activamente implicadas, probablemente de forma secuencial, en la conversión de proinsulina en insulina. (Malide *et al.*, 1995)

En rata y ratón se encuentran dos insulinas diferentes, Insulina I e insulina II, de genes no alélicos, y ambos animales presentan diferencia en la proporción relativa. En rata la razón es 2:1 y en ratón 1:2. En rata la razón es mayor en la insulina recién sintetizada que en la insulina almacenada, lo que indica una cinética de conversión más lenta de la proinsulina II que de la proinsulina I (Linde *et al.*, 1989). Respecto a la proporción proinsulina/insulina, Leahy (Leahy, 1993) la ha determinado en extractos de páncreas de rata mediante HPLC, encontrando un valor de aproximadamente 11.5%.

La figura 1.3 presenta la estructura primaria de las dos preproinsulinas de ratón; el péptido señal está formado por los 24 primeros aminoácidos, que se eliminan para formar la molécula de proinsulina; los aminoácidos del 25 al 54 corresponden al péptido B y los 21 últimos aminoácidos corresponden al péptido A de la insulina; los aminoácidos intermedios entre B y A constituyen el péptido conector C. La preproinsulina I se diferencia de la II en los aminoácidos subrayados, y posee dos aminoácidos menos que la II debido a una delección de los aminoácidos 73 y 74.

1.2.1.1. Endopeptidasas

Hay una familia de endopeptidasas, estructuralmente relacionadas con la subtilisina bacteriana, responsables del procesamiento de las proproteínas. La proteasa kex2 de *Sacharomyces cerevisiae* es la mejor caracterizada, y se ha identificado un grupo de homólogos de Kex2 en mamíferos denominadas: PC2 y PC3 (o PC1) en células nerviosas y endocrinas, y Furina (PACE) y PACE-4 de mayor ubicuidad.

La biosíntesis de PC3 es estimulada por glucosa de forma paralela a la de proinsulina, la de PC2 no es estimulada por glucosa. La biosíntesis de PC3 y proinsulina es estimulada por encima de 4 mM de glucosa, y alcanza el máximo (7 a 10 veces) con glucosa 10 mM; es rápida, comienza en 20 minutos, alcanzando el máximo a los 60 minutos, y no se afecta por Actinomicina D, lo que indica que la regulación es a nivel de traducción. La señal intracelular para la síntesis de PC3 y proinsulina, estimulada por glucosa, parece similar y requiere el metabolismo de glucosa. PC3 se considera la

Preproinsulina I de ratón

1	Met	Ala	Leu	Leu	Val	His	Phe	Leu	Pro	Leu	10
11	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Trp	Glu	Pro	Lys	20
21	Pro	Thr	Gln	Ala	Phe	Val	Lys	Gln	His	Leu	30
31	Cys	Gly	<u>Pro</u>	His	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr	40
41	Leu	Val	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	50
51	Thr	Pro	<u>Lys</u>	Ser	Arg	Arg	<i>Glu</i>	<i>Val</i>	<i>Glu</i>	<i>Asp</i>	60
61	<i>Pro</i>	<i>Gln</i>	<i>Val</i>	<u><i>Glu</i></u>	<i>Gln</i>	<i>Leu</i>	<i>Glu</i>	<i>Leu</i>	<i>Gly</i>	<i>Gly</i>	70
71	<u><i>Ser</i></u>	<i>Pro</i>	<i>Gly</i>	<u><i>Asp</i></u>	<i>Leu</i>	<i>Gln</i>	<i>Thr</i>	<i>Leu</i>	<i>Ala</i>	<i>Leu</i>	80
81	<i>Glu</i>	<i>Val</i>	<i>Ala</i>	<i>Arg</i>	<i>Gln</i>	Lys	Arg	Gly	Ile	Val	90
91	Asp	Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	100
101	Tyr	Gln	Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn			

Preproinsulina II de ratón

1	Met	Ala	Leu	Trp	Met	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	10
11	Leu	Ala	Leu	Leu	Phe	Leu	Trp	Glu	Ser	His	20
21	Pro	Thr	Gln	Ala	Phe	Val	Lys	Gln	His	Leu	30
31	Cys	Gly	<u>Ser</u>	His	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr	40
41	Leu	Val	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	50
51	Thr	Pro	<u>Met</u>	Ser	Arg	Arg	<i>Glu</i>	<i>Val</i>	<i>Glu</i>	<i>Asp</i>	60
61	<i>Pro</i>	<i>Gln</i>	<i>Val</i>	<u><i>Ala</i></u>	<i>Gln</i>	<i>Leu</i>	<i>Glu</i>	<i>Leu</i>	<i>Gly</i>	<i>Gly</i>	70
71	<u><i>Gly</i></u>	<i>Pro</i>	<u><i>Gly</i></u>	<u><i>Ala</i></u>	<i>Gly</i>	<i>Asp</i>	<i>Leu</i>	<i>Gln</i>	<i>Thr</i>	<i>Leu</i>	80
81	<i>Ala</i>	<i>Leu</i>	<i>Glu</i>	<i>Val</i>	<i>Ala</i>	<i>Gln</i>	<i>Gln</i>	Lys	Arg	Gly	90
91	Ile	Val	Asp	Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	100
101	Ser	Leu	Tyr	Gln	Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn	110

Figura 1.3. Estructura primaria de las preproinsulinas de ratón. Tomado

de ExPASy Molecular Biology Server. Geneva University Hospital and

University of Geneva. (<http://expasy.hcuge.ch>)

endopeptidasa clave de la conversión de proinsulina, e inicia el proceso preferencialmente (Alarcon *et al.*, 1993).

Muchas proteínas secretoras eucarióticas, incluidas hormonas y neurotransmisores, son sintetizadas como moléculas biológicamente inactivas que son procesadas por proteólisis limitada. El corte proteolítico se produce en el extremo C-terminal de una secuencia de dos aminoácidos básicos (generalmente Arg-Arg o Lys-Arg). Este proceso, muy conservado, se produce en todas las células eucarióticas desde levaduras a humanos, siendo común a proteínas que siguen la vía secretora constitutiva (albúmina, receptor de insulina, etc.) o la vía secretora regulada (insulina, etc.). En la proinsulina el corte proteolítico se produce en las secuencias Arg31-Arg32 y Lys64-Arg65, catalizado por dos endoproteasas, tipo I (PC1, PC3) y tipo II (PC2) respectivamente. Además de la secuencia de aminoácidos básicos, también intervienen en el reconocimiento de la secuencia los aminoácidos próximos, así como la estructura secundaria de la proinsulina.

Ambas endoproteasas requieren Ca^{2+} , tipo I (1-2 mM) y tipo II (50-80 μM) y tienen pH óptimo 5.5, pero el tipo II tiene rango más ancho, siendo más activa que el tipo I a pH próximo al neutro. Esto sugiere que el Ca^{2+} y el pH intragránulo controlan el procesamiento de la molécula precursora.

Es raro encontrar las moléculas intermediarias 32,33-split y 65,66-split debido a la gran cantidad de carboxipeptidasa H en los gránulos secretores, que elimina rápidamente los aminoácidos básicos C-terminal expuestos en el corte endoproteolítico. (Rhodes *et al.*, 1992)

PC1 y PC2 son coliberadas con la insulina en la respuesta a glucosa y hay poca evidencia de secreción en la vía constitutiva, lo que indica que son eficientemente dirigidas a la vía regulada. (Hutton, 1994)

A corto plazo (<2h) la estimulación del islote con glucosa incrementa específicamente la biosíntesis de proinsulina y sus enzimas convertidoras PC3 y PC2 a nivel de traducción. A largo plazo (>6h) la glucosa mantiene niveles los de mRNA de PC2 y PC3 paralelos al mRNA de preproinsulina. Después de 48 h los niveles de mRNA de preproinsulina, PC2 y PC3 son 2.9, 3.0 y 5.3 veces superior, respectivamente, con glucosa que en ausencia de glucosa. La expresión génica de

PC2, PC3 y preproinsulina se realiza con glucosa >5.5 mM. La estabilidad de mRNA es PC2 (9 h), PC3 (5 h) y preproinsulina (24 h) y no se afecta por la glucosa. La transcripción de preproinsulina, PC2 y PC3 comienza a inducirse 1 h después de exponerse a 16.7 mM de glucosa. El cAMP aumentado por forskolina no tiene efecto sobre los niveles de mRNA de preproinsulina, PC2, ni PC3. (Schuppin y Rhodes, 1996)

1.2.2. Secreción de insulina

En condiciones fisiológicas, la secreción de insulina, y probablemente de otras hormonas pancreáticas, es regulada principalmente, pero no exclusivamente, por la concentración de nutrientes circulantes, especialmente la glucemia. Estos nutrientes ejercen un efecto directo e inmediato sobre la síntesis de proinsulina y la secreción de insulina, aunque ambos procesos no están ligados uno a otro, y pueden ser regulados independientemente por ciertos agentes insulínotropicos. El control inmediato de la secreción de insulina por nutrientes circulantes representa sólo un aspecto de la regulación de la actividad secretora en la célula B pancreática. Otros agentes, como neurotransmisores colinérgicos, catecolaminas u hormonas gastrointestinales, también participan en el control directo e inmediato de la secreción de insulina, mientras que varios factores, incluyendo nutrientes circulantes, pueden ejercer una modulación retrasada pero sostenida de la secreción hormonal, como los encontrados en situaciones especiales como ayuno, embarazo, lactancia o vejez (Malaisse, 1991).

La regulación de la síntesis de proinsulina y de la secreción de insulina se distingue por su dependencia de la glucosa. El nivel de glucosa necesario para la biosíntesis de insulina es menor que para la secreción (Pipeleers *et al.*, 1973; citado por Malaisse, 1991).

A concentraciones fisiológicas de glucosa, los islotes pancreáticos aislados segregan una pequeña porción de insulina, y esta secreción puede amplificarse por secretagogos, pero no es eliminada, en condiciones que inhiben la secreción regulada desde los gránulos maduros. La facilidad

para estimular la secreción y el perfil bioquímico de los péptidos segregados, relacionados con la proinsulina, indica que esta secreción se origina desde los gránulos inmaduros.

La estequiometría de la secreción de péptido C e insulina, marcados, es 1:1 a altas concentraciones de glucosa. Sin embargo, a concentraciones fisiológicas o bajas, el péptido C es liberado con un exceso molar de insulina, como si las vesículas exocitósicas que conllevan esta secreción procedieran de un compartimento post-Golgi, en el que el lumen estuviera compuesto de insulina condensada y péptido C soluble. Estas observaciones se pueden explicar por un modelo de tráfico regulado de proteínas secretoras, en el que la exocitosis directa de gránulos jóvenes es estimulada por altas concentraciones de glucosa, y la aparición de vesículas secretoras desde los gránulos inmaduros se produce a bajas concentraciones de glucosa. Así, el destino de la insulina de los gránulos maduros presenta características reguladas y constitutivas (Arvan *et al.*, 1991).

La insulina liberada en la exocitosis seguirá coordinada con Zn^{2+} , cuando es vertida al medio extracelular, hasta que algún mecanismo rompa la unión Zn^{2+} -insulina, y, aunque sea soluble, la compactación de las seis moléculas de insulina del complejo de coordinación debería suponer impedimento estérico para unirse a su receptor en las células diana (Berson y Yallow, 1966; citado por Cizak y Smith, 1994) o, como nosotros suponemos, para ser reconocido por el anticuerpo antiinsulina del RIA. En la práctica experimental, se necesita que la albúmina esté presente en el medio de incubación (Ferrer *et al.*, 1984) para que los islotes produzcan secreción de insulina, pero se desconoce como actúa. Si consideramos que, en la sangre, el Zn^{2+} se transporta unido principalmente a la albúmina (Massuoka y Saltman, 1994) (Tibaduiza y Bobilya, 1996) (Kiilerich y Christiansen, 1986), ésta puede actuar como quelante endógeno para captar el Zn^{2+} del hexámero, dejando libre la insulina como monómero. El Zn^{2+} libre, en concentración superior a 0.05 mM, puede alterar la actividad eléctrica de la célula B (Ferrer *et al.*, 1984), pero su concentración en sangre es del orden de nM (Tibaduiza y Bobilya, 1996) y la inhibición de la secreción producida por Zn^{2+} podría deberse a la saturación de la albúmina que captaría menos Zn^{2+} del hexámero.

1.2.2.1. Iniciadores y potenciadores de la secreción de insulina

El principal determinante de la secreción de insulina es el nivel de glucemia; hormonas y neurotransmisores actúan modulando la acción secretora de la glucosa. Los secretagogos de insulina se dividen en dos grupos: iniciadores y potenciadores.

Iniciadores, son sustancias capaces de estimular la secreción de insulina por sí mismos, e incluyen nutrientes (como la glucosa) que son metabolizados por la célula B; sustancias que estimulan el metabolismo de nutrientes endógenos; y drogas como las sulfonilureas. La célula B es excitable eléctricamente, y esta actividad eléctrica, y el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ asociado, es la clave para el inicio de la secreción (Soria., 1989) (Valdeolmillos *et al.*, 1989) (Bolea *et al.*, 1997) (Martín *et al.*, 1997). La glucosa y las sulfonilureas inhiben los canales $K-ATP$ de la membrana plasmática de la célula B. El denominador común para los iniciadores de la secreción de insulina es la capacidad para bloquear los canales $K-ATP$ y despolarizar la célula B (Valdeolmillos *et al.*, 1992).

Potenciadores, hormonas como glucagón, GIP, VIP y neurotransmisores como ACh, que son capaces de potenciar la secreción de insulina, en presencia de glucosa, pero no la inician sin glucosa (Sánchez-Andrés JV *et al.*, 1988).

La secreción se puede inhibir por sustancias como diazóxido, somatostatina, galanina, CGRP (calcitonina gene-related peptide) y agonistas adrenérgicos. Los inhibidores pueden actuar a nivel del metabolismo, de la membrana plasmática o de la misma exocitosis (Ashcroft y Ashcroft, 1991).



1.2.2.2. Metabolismo de nutrientes

El canal de K-ATP es responsable del potencial de membrana de la célula B, y su inhibición despolariza la membrana, lo cual abre los canales de Ca^{2+} dependientes de potencial, que conduce a un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que causa la secreción de insulina (Martín, Sánchez-Andrés y Soria, 1995) (Nadal *et al.*, 1994).

En el citosol, la glucosa se transforma en piruvato, que puede ser oxidado en la mitocondria, pasando por acetil-CoA y el ciclo del ácido cítrico, a CO_2 y agua. El NADH producido se oxida en la cadena respiratoria acoplada a la síntesis de ATP, en la fosforilación oxidativa.

El aumento de la relación ATP/ADP inhibe la piruvato deshidrogenasa, y se acumula piruvato que es reducido a lactato, el cual es liberado al medio extracelular.

Los ácidos grasos se convierten en acil-CoA, que es introducido en la mitocondria, donde se transforma en acetil-CoA, que sigue vía ciclo del ácido cítrico y fosforilación oxidativa para sintetizar ATP.

Los aminoácidos, previa transaminación, se transforman en 2-cetoácidos, que darán lugar a precursores o a intermediarios del ciclo del ácido cítrico para ser oxidados y aumentar la síntesis de ATP (Martín y Soria, 1995). Bolea (Bolea *et al.*, 1997) ha mostrado que cuando las células B son expuestas a concentraciones fisiológicas de aminoácidos y glucosa se explica mas adecuadamente la homeostasis de la secreción de insulina.

1.2.2.3. Calcio intracelular

La secreción de insulina se produce por exocitosis, como consecuencia del aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$; lo cual se ha comprobado en diferentes especies como humanos (Martín y Soria, 1996), rata (Martín, Reig y Soria, 1995) y ratón (Nadal *et al.*, 1994).

Los gránulos secretores se mueven y se fusionan con la membrana plasmática, descargando su contenido al medio extracelular. Hay evidencia de que la fosforilación de proteínas, dependiente de Ca^{2+} , está implicada en la iniciación de la exocitosis, pero los mecanismos moleculares no son bien conocidos.

El efecto potenciador de hormonas y neurotransmisores también puede involucrar la activación de la fosforilación de proteínas, actuando sobre las proteínas quinasas A y C.

La liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares puede estar implicado en ciertos efectos potenciadores; sin embargo, un importante mecanismo para la potenciación de la secreción parece estar en una sensibilización del sistema secretor al Ca^{2+} (Ashcroft y Ashcroft, 1991). En realidad el Ca^{2+} debe aumentar cerca del sensor que dispara la maquinaria exocitótica, en este sentido Martín, Ribas y Soria (1997) han demostrado recientemente que los nutrientes como la glucosa aumentan la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la región submembrana, mientras que el carbacol lo aumenta en la zona central de las células B.

1.2.2.4. Fosforilación de proteínas

Las hormonas y neurotransmisores que aumentan el cAMP o activan el intercambio de inositol fosfátidos, producen poca o ninguna estimulación de la secreción de insulina en ausencia de glucosa u otro iniciador.

La activación de proteínas quinasas dependientes de Ca^{2+} -Calmodulina puede ser central en la iniciación de la secreción de insulina, mientras que a las proteínas quinasas A y C se les asigna un papel modulador en el efecto potenciador de hormonas y neurotransmisores (Ashcroft y Ashcroft, 1991).

1.2.2.4.1. Proteína quinasa A.- El aumento de cAMP, por glucagón y otras hormonas, que potencia la respuesta secretora de la glucosa, se acompaña de una rápida fosforilación de sustratos específicos de la proteína quinasa A (Christie y Ashcroft, 1985), apoyando el papel modulador de ésta en la regulación de secreción de insulina.

Se han estudiado los sustratos de proteína quinasa A en islotes de Langerhans, premarcados con $^{32}\text{P}_i$, y estimulados con forskolina (activador de adenilato ciclasa) (Christie y Ashcroft, 1985), y también en islotes permeabilizados expuestos a cAMP, en presencia de $[\gamma^{32}]\text{ATP}$ (Jones *et al.*, 1988), demostrando rápidos cambios en la fosforilación de péptidos citosólicos y de membrana.

La glucosa eleva por sí misma el cAMP de la célula B, pero es improbable que este efecto contribuya significativamente al mecanismo iniciador de la glucosa, ya que si se aplica cAMP, con baja concentración de glucosa, no se estimula la secreción de insulina (Christie y Ashcroft, 1984); y si se inhibe la proteína quinasa A con un análogo del cAMP, la glucosa sigue estimulando la secreción de insulina (Persaud *et al.*, 1990).

1.2.2.4.2. Proteína quinasa C.- El Ca^{2+} es necesario para la actividad de la proteína quinasa C, pero el principal regulador de la proteína quinasa C es el diacilglicerol (DAG), liberado por la fosfolipasa C sobre el fosfatidilinositol bifosfato, que modula la sensibilidad de la proteína quinasa C al Ca^{2+} (Nishizuka, 1988).

El 12-O-tetradecanoil forbol 13-acetato (TPA), que activa la proteína quinasa C sustituyendo el efecto del DAG, es un intenso potenciador de secreción de insulina, acompañándose de un aumento de la fosforilación de proteínas del islote (Hughes y Ashcroft, 1988) (Howell *et al.*, 1990).

El clomifeno, inhibidor de proteína quinasa C, bloquea el efecto del TPA sobre la secreción de insulina y la fosforilación de proteínas en el islote (Hughes y Ashcroft, 1988).

1.2.2.4.3. Proteín quinasas dependientes de Ca^{2+} -Calmodulina.- Se han descrito varias proteín quinasas dependientes de Ca^{2+} -Calmodulina.

La quinasa de cadena ligera de miosina (MLCK) puede estar involucrada en la translocación de gránulos secretores (Oberwetter y Boyd, 1987).

La proteín quinasa P53 fosforila una proteína endógena de 53 KDa., se activa a concentración μM de Ca^{2+} en presencia de calmodulina, y se inhibe por antagonistas de la calmodulina. Se ha sugerido que la proteín quinasa P53 es un componente del citoesqueleto (Harrison *et al.*, 1984) (Harrison y Ashcroft, 1982), y parece posible un papel mediador en la interacción gránulo-citoesqueleto. La actividad quinasa no ha podido separarse del péptido fosforilado por lo que es posible que se autofosfore. La proteín quinasa P53 tiene características semejantes a la calmodulina quinasa II, y se piensa que podrían ser la misma quinasa (Colbran *et al.*, 1989).

El dehidrouramilo (DHU), un análogo estable del aloxano, inhibe la quinasa P53, en extractos de islotes, pero no la proteín quinasa A, y causa una menor inhibición sobre la proteín quinasa C (Harrison *et al.*, 1986).

En islotes intactos, el DHU altera la respuesta de la secreción de insulina a la glucosa, y bloquea el efecto de la forskolina y del TPA, por lo que se sugiere un papel central para la proteín quinasa P53 en la iniciación de la secreción de insulina.

Proteín quinasa II (CaM-quinasa II): los inhibidores de esta quinasa reducen la secreción de insulina estimulada por nutrientes, así como la respuesta exocitósica a la despolarización, por lo que se supone que esta enzima debe actuar en la exocitosis, probablemente fosforilando proteínas implicadas en el proceso de la secreción de insulina. No se conoce el sustrato de la fosforilación, pero puede estar relacionado funcionalmente con las sinapsinas (las sinapsinas son específicas de las neuronas), regulando la unión entre gránulos secretores y citoesqueleto, como sucede en las neuronas (Ämmälä *et al.*, 1993).

Hay dos mecanismos por los que la activación de proteínas quinasas pueden potenciar la secreción de insulina estimulada por glucosa:

I.- la activación de proteínas quinasas puede conducir a un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ por la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de la membrana citoplasmática, o por la salida desde los reservorios intracelulares al citosol (Hughes *et al.*, 1989).

II.- la activación de proteínas quinasas puede sensibilizar el mecanismo secretor al nivel de Ca^{2+} intracelular, precisando menor $[Ca^{2+}]_i$ para activar la secreción de insulina (Hughes *et al.*, 1987).

Está descrito el efecto activador, en los islotes, del Ca^{2+} , mediado por calmodulina, sobre la adenilato ciclasa, que aumenta el cAMP potenciando la secreción de insulina, pero no la inicia, y sobre la fosfodiesterasa, que reduce el nivel de cAMP reduciendo la secreción de insulina (Christie y Ashcroft, 1985).

Los potenciadores de la secreción actúan a varios niveles:

- pueden estimular la actividad eléctrica de la célula B (Henquin *et al.*, 1988),
- alteran las concentraciones de segundos mensajeros como Ca^{2+} , diacilglicerol o cAMP (Hughes *et al.*, 1990) (Malaisse y Malaisse-Lagae, 1984) (Christie y Ashcroft, 1985),
- sensibilizan la maquinaria secretora a los niveles de Ca^{2+} (Hughes *et al.*, 1987).

Los secretagogos secundarios comprenden dos grupos principales:

- I.- los que elevan el cAMP para activar la proteína quinasa A
- II.- los que estimulan la vía del fosfatidilinositol y elevan la $[Ca^{2+}]_i$ para activar la proteína quinasa C.

Las células B purificadas contienen receptores de glucagón. El glucagón activa la enzima adenilato ciclasa, con la intervención de GTP y Ns (proteína reguladora de la unión al receptor), aumentando el cAMP. El cAMP puede favorecer el catabolismo de nutrientes endógenos, que ejercerían un efecto semejante al de los nutrientes sobre la biosíntesis de proinsulina o la

conductividad de K^+ (Malaisse *et al.*, 1974; citado por Malaisse 1991) (Carpinelli y Malaisse, 1980; citado por Malaisse 1991).

Ciertos estudios han revelado que las células del islote contienen un glucofosfolípido, similar al de las células sensibles a insulina, precursor de un fosfoligosacárido que actúa como segundo mensajero de la insulina. Este fosfoligosacárido inhibe la biosíntesis de proinsulina y la secreción de insulina en islotes pancreáticos intactos (Albor *et al.*, 1989). La existencia de un feedback inhibitorio directo por la insulina, sobre su propia secreción, aún se desconoce. Algunos estudios sugieren que las células B carecen de receptores de insulina de alta afinidad, y sólo poseen receptores de IGF-I (insulin-like growth factor type I). Aunque la insulina en alta concentración podría actuar, de forma limitada, por unión a los receptores de IGF-I, su efecto no es sospechoso de producir activación de la fosfolipasa C, que catalice la síntesis del fosfoligosacárido a partir del glucofosfolípido sensible a la insulina. Tampoco se ha visto que el IGF-I ejerza efecto sobre secreción de insulina, incluso en presencia de exceso de anticuerpos antiinsulina, para neutralizar el efecto de la insulina segregada (Malaisse, 1988).

1.2.2.5. Exocitosis

En el mecanismo de la exocitosis se distinguen dos pasos principales, la migración de los gránulos secretores, unidos al citoesqueleto, hacia la membrana y la fusión de la vesícula con la membrana citosólica.

Translocación de gránulos.- La célula B tiene un citoesqueleto muy desarrollado; la miosina puede provocar el movimiento de los gránulos ligados al citoesqueleto, probablemente por interacción con microfilamentos de actina (Howell, 1984). En células B se encuentra el enzima Kinesina, que es una ATPasa dependiente de microtúbulos, que se supone implicada en el transporte intracelular de vesículas y orgánulos (Balczon *et al.*, 1992). La activación de proteínas quinasas A y C, o la inhibición de proteínas fosfatasa, aumentan la secreción de insulina, como respuesta a la

despolarización de las células B aisladas, lo que indica que la modulación de la exocitosis por proteínas quinazas o por proteínas fosfatasa, en un estadio distal al aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, es importante para la secreción de insulina (Ämmälä *et al.*, 1994) (Martín, Reig y Soria, 1995).

Papel del GTP.- Muchas células no excitables no requieren Ca^{2+} para la secreción, pero el GTP tiene un papel esencial. El GTP induce la secreción de insulina, independiente de Ca^{2+} , y parece intervenir una proteína G_e en el proceso de exocitosis (Martín, Salinas *et al.*, 1996) (Gomperts, 1990) (Melancon *et al.*, 1987).

Fusión de vesículas.- Subsecuente a la apertura de canales de Ca^{2+} , la exocitosis se inicia con una latencia <100 ms. La entrada de Ca^{2+} que precede a la exocitosis está desigualmente distribuida en la célula y se concentra en la región con alta densidad de gránulos secretores. En esta zona, la $[Ca^{2+}]_i$ es 5-10 veces superior que en el resto de la célula, alcanzando concentraciones μ M. Los registros de canal único confirman que los canales de Ca^{2+} tipo L están agrupados en la parte de la célula que contiene los gránulos secretores. (Bokvist *et al.*, 1995)

El Ca^{2+} puede iniciar la fosforilación de una proteína de membrana, cuyo estado de fosforilación determina que las vesículas secretoras se puedan anclar a la membrana plasmática, por interacción con proteínas de la membrana vesicular. La syntaxina-1, proteína implicada en la fijación de vesículas sinápticas a las zonas activas presinápticas, también se encuentra en las células B de los islotes de ratón (Martín, Moya *et al.*, 1995). Se ha comprobado que partes específicas de la región H3 de la syntaxina-1 están implicadas específicamente en las interacciones proteína-proteína durante la secreción de insulina inducida por $[Ca^{2+}]_i$ (Martín, Salinas *et al.*, 1996).

La fusión se inicia cuando se abre el canal iónico, formando un poro de fusión, que se dilata al fusionarse los lípidos de las membranas vesicular y citosólica, y se excreta el contenido de los gránulos al medio extracelular, esperándose un proceso de endocitosis para mantener la superficie de la célula y recuperar los componentes de las membranas vesiculares (Almers, 1990).

1.3. Esquema general del control de la secreción de insulina

En resumen, puede concluirse, como representa la figura 1.4, que la célula B responde a tres clases de estimulantes fisiológicos: metabolitos, hormonas y neurotransmisores. La iniciación de la secreción de insulina por glucosa implica metabolismo del azúcar y aumento del $[Ca^{2+}]_i$ vía inhibición de canales $K-ATP$. La activación de proteínas quinasas dependientes de Calmodulina conduce a la fosforilación de componentes clave del sistema liberación y descarga exocitótica de insulina. Como respuesta a hormonas y neurotransmisores, los segundos mensajeros que intervienen en el intercambio de inositolfosfátidos y en la activación de la adenilato ciclasa generan señales que modulan la vía iniciadora. Los mecanismos de fosforilación adicional involucrados en la activación de proteína quinasa A y proteína quinasa C funcionan sensibilizando la vía iniciadora a los niveles de Ca^{2+} . El Ca^{2+} también ejerce una acción directa sobre la maquinaria exocitótica.

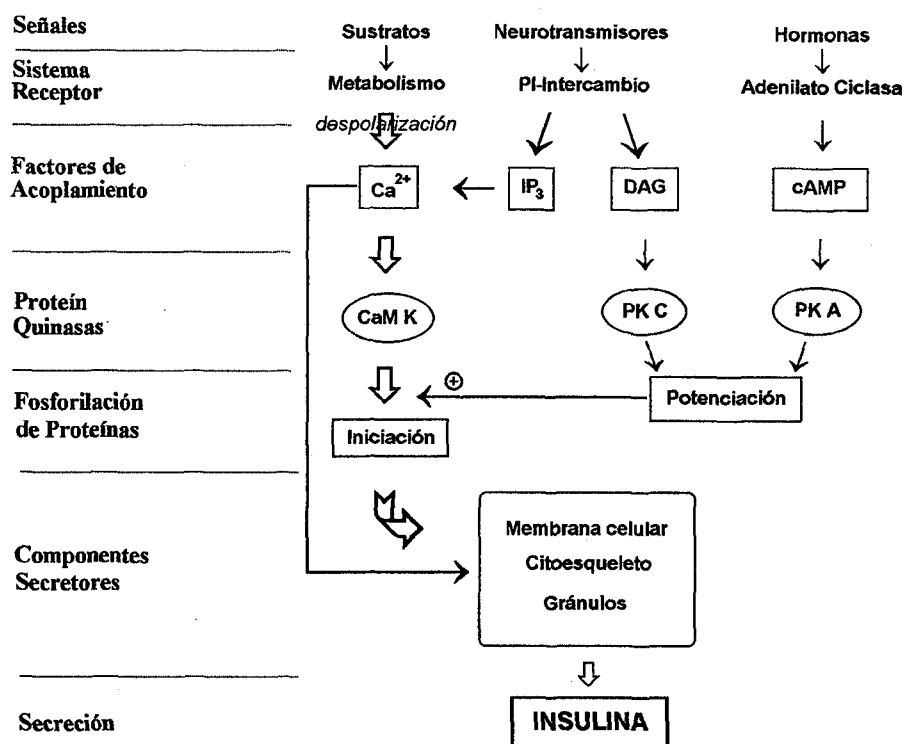


Figura 1.4. Esquema general del control de la secreción de insulina.

Modificado de Ashcroft y Ashcroft, 1991 (página 135).

1.4. Heterogeneidad y Variabilidad del islote de Langerhans

En el Diccionario de la Lengua Española de la Real Academia Española se definen los conceptos Variabilidad y Heterogeneidad como:

Variabilidad. Calidad de variable.

Variable. Inestable, inconstante y mudable. Magnitud que puede tener un valor cualquiera de los comprendidos en un conjunto.

Heterogeneidad. Calidad de heterogéneo. Mezcla de partes de diversa naturaleza en un todo.

Los términos variabilidad y heterogeneidad a veces se utilizan erróneamente como sinónimos. Los islotes que manifiestan secreción de insulina de forma dosis-dependiente de glucosa, cuando responden todos, son variables en función de la dosis de glucosa a que se exponen, pero si los islotes responden a la glucosa en distinta proporción, es decir, formando poblaciones que se pueden describir en términos estadísticos, son heterogéneos.

1.4.1. Heterogeneidad celular en células aisladas (Pipeleers, 1994)

Existen numerosos estudios que muestran que las células B aisladas se comportan de forma heterogénea, es decir, agrupadas en poblaciones con distinto comportamiento.

A partir del estudio de Van De Winkel y Pipeleers, (1983), que mostraron la heterogeneidad celular en términos de respuesta metabólica a nutrientes, mediante autofluorescencia de NADPH, se han sucedido trabajos en los que se ha mostrado que las células B aisladas son heterogéneas en la secreción de insulina estudiada por el ensayo de placa hemolítica (RHPA: reverse hemolytic plaque assay) (Salomon y Meda, 1986) (Soria *et al.*, 1991); efecto sobre el canal de K_{ATP} y respuesta subsecuente de $[Ca^{2+}]_i$ (Valdeolmillos *et al.*, 1992); etc.. En un estudio, que no recibió confirmación por parte de otros autores, Hiriart y Matteson, (1988), sugirieron que las células B de rata son heterogéneas en términos de canales iónicos.

La determinación fluorimétrica de la $[Ca^{2+}]_i$ indica que las células B difieren mucho en su respuesta a la glucosa, un 70% de células B aumentan la $[Ca^{2+}]_i$ por efecto de la glucosa y 30% restante no responde. El aumento de cAMP por teofilina o por glucagón transforma las células B que no responden, aumentando su $[Ca^{2+}]_i$ y las que responden, presentan aumentos en la $[Ca^{2+}]_i$ y en la amplitud de las oscilaciones. El carbacol y el TPA, que activan la proteína quinasa C, no aumentan el cAMP, pero aumentan el número de células que elevan la $[Ca^{2+}]_i$ y la amplitud de las oscilaciones. La capacidad de cAMP o de los activadores de la proteína quinasa C para aumentar la $[Ca^{2+}]_i$ en las células B correlaciona directamente con la capacidad de secreción de insulina estimulada por glucosa. Las células B aisladas y purificadas no segregan insulina en forma dosis dependiente de glucosa (Wang *et al.*, 1993). En células B, la secreción de insulina, inducida por glucosa, es altamente dependiente de la presencia de péptidos que activan la Adenilato ciclasa celular.

La citometría de flujo permite separar células B según el estado redox metabólico, determinando la fluorescencia celular de NAD(P)H, después de 15 minutos de incubación en un medio con glucosa. El % de células B con elevado nivel de NAD(P)H aumenta con la concentración de glucosa del medio de incubación; el cambio de glucosa de 1 mM a 5 mM aumenta el número de células B con alto nivel de NAD(P)H en un 25%, y de 5 mM a 20 mM en un 30%.

La autorradiografía de células B aisladas permite contar las células que se activan en la síntesis de proteínas a una determinada concentración de glucosa: 1 mM (5%), 3 mM (27%), 5 mM (50%) y a 10 mM (70%) (Schuit *et al.*, 1988).

Características típicas como baja respuesta a bajos niveles de glucosa, estimulación de varias veces a altos niveles de glucosa y variación dosis dependiente, en el rango intermedio de concentración de glucosa, sugieren la existencia de subpoblaciones con diferente sensibilidad a la glucosa. Sus proporciones relativas determinarán la forma de las curvas, así como la amplitud de la respuesta a la glucosa.

Estudios sobre la población total de células B indican que la amplitud de la secreción de insulina, inducida por glucosa, depende de la interacción sinérgica entre el nutriente y los niveles celulares de cAMP.

Con glucosa 7.5 mM responden aproximadamente el 50% de las células B, aumentando los niveles de NAD(P)H (alta respuesta), y se pueden separar de las que no responden (baja respuesta) para comparar ambas subpoblaciones en sus propiedades metabólicas, funcionales y morfológicas. Realizando una segunda incubación de 60 minutos a 7.5 mM de glucosa, para medir la actividad biosintética, en el grupo de alta respuesta todas las células son activas, mientras que en el de baja respuesta presentan poca actividad biosintética. Mediante perfusión de 2-4 horas, el grupo de alta respuesta muestra la primera fase de secreción a partir de 4.2 mM, y un nivel de secreción dosis dependiente de glucosa 2 veces superior al del grupo de baja respuesta. El grupo de baja respuesta presenta la primera fase de secreción de insulina a partir de 8.3 mM. Por tanto, la dependencia de dosis de glucosa en la actividad biosintética y secretora se debería a un paso en su metabolismo celular. En poblaciones de células B de rata normales, el aumento de la concentración de glucosa reduce, pero no llega a eliminar, el % de células B inactivas.

Las células del grupo de alta respuesta aumentan la utilización y oxidación de glucosa, 2-4 veces, más que las del grupo de baja respuesta. En ambas subpoblaciones, la biosíntesis proteica está muy correlacionada con la utilización y oxidación de glucosa. Las cinéticas más altas de degradación de glucosa en el grupo de alta respuesta no son atribuibles a un aumento en el transporte de glucosa, pero sí a un aumento de la fosforilación de la glucosa. La subpoblación de alta respuesta presenta mayor actividad de enzima glucoquinasa, así como mayor nivel de mRNA de glucoquinasa, mientras que el nivel de mRNA del transportador de glucosa GLUT2 es similar al del grupo de baja respuesta. Estos datos indican que la diferencia intercelular en la fosforilación de glucosa, y no en el transporte de glucosa, contribuye a la heterogeneidad de las células B en la sensibilidad a la glucosa. Pero la fosforilación de la glucosa no es el único punto clave en las funciones dependientes de glucosa.

La subpoblación de alta respuesta contiene la mayor parte de la hormona recién sintetizada en los gránulos secretores claros, con una densidad tres veces superior a la de baja respuesta. Los gránulos claros, ricos en proinsulina, están heterogéneamente distribuidos en las células B pancreáticas, con una mayor densidad en las células sensibles a concentración de glucosa más baja,

por lo que podrían tomarse como marcador morfológico para las células B que sintetizan y segregan hormona a niveles fisiológicamente más bajos.

Si se aíslan células B, de rata, y se exponen crónicamente, durante 10 días, a glucosa 6 mM o 20 mM, y se analiza la respuesta posterior a distintas concentraciones de glucosa, se observa que en el grupo de 6 mM existen diferencias en la sensibilidad a cambios de glucosa, a 1 mM <20% de las células son activas metabólicamente o biosintéticamente, al cambiar a 10 mM las células activas llegan al 50%. En el grupo de glucosa 20 mM, a 1 mM >60% de las células ya son activas, y a 5 mM lo son casi todas las células. Estos datos indican que la heterogeneidad metabólica entre células B está sujeta a variación. La glucosa actúa como regulador fisiológico de la proporción de células B con diferente sensibilidad a la glucosa. El patrón de heterogeneidad metabólica y biosintética es válido tanto para células aisladas de islotes grandes como de islotes pequeños.

El patrón de heterogeneidad puede variar según las condiciones *in vivo* a que se somete la población de células B en el animal antes de su aislamiento. Después de dos días de tratamiento con glibenclamida, a concentraciones que producen desgranulación de la célula B y mejoran su unión, hay mayor proporción de células B que ya son activas en ausencia de glucosa. Esta alteración se asocia con un desplazamiento de la curva dosis-respuesta hacia mayores cinéticas de síntesis de insulina. Estos datos indican que las condiciones *in vivo* influyen en el patrón de heterogeneidad.

Como en todos los estudios *in vitro*, no se puede excluir que el proceso de aislamiento no altere ciertas características *in vivo*, por lo que la célula B sería mejor examinarla *in situ*. La población de células B también presenta heterogeneidad funcional en su localización *in situ*. Estudios de perfusión en páncreas de rata indican que la secreción de insulina es dosis dependiente de glucosa, en un rango de concentración similar al de las células B purificadas. El páncreas intacto también presenta % incrementado de forma dosis dependiente de glucosa en su actividad biosintética, con todas las células B marcadas a glucosa 10 mM.

En ratas adultas, la estimulación prolongada con glucosa no conduce al mismo grado de desgranulación en todas las células B, sugiriendo diferencias en la respuesta celular o en el estado de desgranulación inicial. En animales no tratados, la intensidad de la inmunotinción de insulina varía

considerablemente entre células B; la mayoría de las células son débilmente positivas para proinsulina, pero unas pocas presentan intensa positividad. Esta variabilidad en la tinción de hormona se observa también en las preparaciones de células de islotes; la intensidad más fuerte en las células B que están estructuralmente acopladas a las células que contienen somatostatina indica diferencias topográficas en la funcionalidad de las células B.

Un análisis *in vivo* sería necesario para comprobar la hipótesis de que la heterogeneidad entre células B juega un papel importante en la fisiología y patología del páncreas endocrino.

1.4.2. Variabilidad morfológica del islote de Langerhans

Los islotes de un páncreas no son todos iguales (Bonner-Weir, 1991). Los islotes difieren en su composición celular. Hay una distribución regional de células A y de células PP, basada en la derivación embriológica. La porción dorsal o esplénica del páncreas (cola, cuerpo y parte de la cabeza) es rica en glucagón y pobre en PP, mientras que la parte duodenal o ventral del páncreas (mayor parte de la cabeza) es pobre en glucagón y rica en PP. Estas diferencias regionales pueden dar lugar a un funcionamiento diferente del islote de Langerhans. Datos fisiológicos de islotes y de perfusión de páncreas indican que los islotes esplénicos liberan más insulina que los duodenales en respuesta a la glucosa. Además, los islotes presentan diferente relación vascular respecto del tejido exocrino, según el tamaño del islote. Estas diferencias morfológicas pueden afectar a la funcionalidad del islote.

Experimentos que utilizan hormonas exógenas, sobre islotes aislados o en páncreas perfundidos, indican que las hormonas de los islotes son capaces de influir sobre otras células del islote por un mecanismo de feedback. Así, la insulina puede inhibir tanto a las células A como a las D, la somatostatina puede inhibir a las células A y B y el glucagón puede estimular a las células B y D. Esto ha conducido a pensar que la secreción hormonal del islote puede estar regulada por interacciones específicas intraislote (Bonner-Weir, 1991).



Hay tres niveles posibles de interacción intraislote:

- I.- célula-célula vía uniones intercelulares (gap junctions),
- II.- vía vascularidad, y
- III.- paracrina, vía intersticial.

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Existen otras diferencias, por ejemplo, las células B centrales de islotes grandes tienen el núcleo más pequeño que las periféricas, o que las de islotes pequeños. También se desgranulan antes que las periféricas cuando la rata se estimula *in vivo* con glucosa o glibenclamida.

1.4.3. Heterogeneidad células-islotes

El hecho de que las células B presenten múltiples subpoblaciones en la respuesta a la glucosa, con diferentes propiedades en la secreción de insulina, ha conducido a un modelo, en la secreción de insulina dependiente de glucosa, del islote basado en el reclutamiento de células B individuales. Sin embargo, la actividad sincrónica y uniforme del Ca^{2+} y de la respuesta eléctrica, indican que la conducta de las células B en el islote es más uniforme. Por tanto permanece la incertidumbre sobre si la heterogeneidad metabólica en el islote intacto es importante funcionalmente.

La autofluorescencia del NAD(P)H inducida por glucosa manifiesta que en el islote el 90% de las células B responden a la glucosa con elevados niveles de NAD(P)H, mientras que en células B aisladas se queda en un 70%. En el islote las células B presentan comportamiento sigmoidal en la curva dosis respuesta a la glucosa, con inflexión en 8 mM, semejante a la K_m de la glucoquinasa.

Estos resultados sugieren que la heterogeneidad en las células B puede ser funcionalmente menos importante en los islotes de lo que se ha predicho mediante los estudios con células aisladas, y apoya el papel de la glucoquinasa como enzima limitante en la respuesta de la célula B a la glucosa.

Hay dos explicaciones posibles para la diferencia observada entre células B e islotes:

1.- El daño proteolítico producido, en el aislamiento de células B y de islotes, puede degradar la respuesta del NAD(P)H de algunas células sin afectar su viabilidad. En islotes enteros, todas las células que no responden están en la periferia, y estas células podrían estar afectadas por este tipo de daño. En contra de esta interpretación está el hecho de que las células B aisladas mantienen intactos sus receptores de membrana, por ejemplo los receptores de glucagón, acetilcolina, etc.; sus canales iónicos están intactos (Soria *et al.*, 1991); etc..

2.- La comunicación celular en el islote puede superar la heterogeneidad de las células B individuales. El contacto célula-célula puede hacer que las células que menos responden se activen por las que responden más, pero esto no se observa en células disociadas, donde células en contacto no responden más uniformemente que las completamente aisladas. En el islote, las células B no presentan respuesta más rápida que las vecinas, por lo que el mecanismo involucrado debería actuar en tiempo inferior a algún segundo.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es estudiar la variabilidad funcional del islote de Langerhans. Para ello se determinarán la secreción de insulina y el contenido de insulina de un único islote, y su relación con el tamaño del islote, a distintas concentraciones de glucosa, y en presencia o ausencia de inhibidores o de potenciadores de la secreción.

El planteamiento del problema lo presentamos a los siguientes niveles:

- I. Determinación de la secreción de insulina.
- II. Determinación del contenido de insulina del islote.
- III. Relación entre la secreción y el contenido de insulina.
- IV. Medida del tamaño del islote y su relación con la secreción y contenido de insulina.

2.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos se organizan en tres grandes grupos:

2.2.1. Estudio de la variabilidad funcional de los islotes pancreáticos

¿Existen islotes silentes?

La heterogeneidad funcional de las células B revela que en todas las células estudiadas, procedentes de distintos islotes, hay un porcentaje de células que no responde a la glucosa, y esto podría ser debido a la presencia de islotes silentes, que no responden a la glucosa, o también a que en un mismo islote haya un porcentaje de células con menor sensibilidad a la glucosa.



¿Es concentración-dependiente la respuesta del islote único a la glucosa?

La respuesta de los islotes a la glucosa además de ser concentración-dependiente puede tener distintos umbrales o distinta sensibilidad interindividuo.

¿La variabilidad en el tamaño de los islotes implica variabilidad en la secreción de insulina?

Los islotes responden a la glucosa liberando insulina, pero la sensibilidad a la glucosa o el control de la secreción de insulina, puede estar regulado a nivel celular o en conjunto como un sincitio.

¿Cómo es la relación de la secreción de insulina, inducida por glucosa, y del contenido de insulina con el tamaño del islote?

El tamaño del islote es proporcional al número de células B, por lo que los islotes de mayor tamaño deben liberar más insulina que los islotes pequeños, tanto si todas las células responden por igual, como si el número de células que responden depende de la concentración de glucosa. Si el islote controla la secreción de insulina como una unidad funcional, la secreción de insulina debería ser independiente del tamaño del islote.

2.2.2. Efecto de la metodología utilizada

¿Es necesaria la presencia de albúmina en el medio de incubación para la determinación de la insulina inmunorreactiva?

La secreción de insulina por los islotes procede de los gránulos maduros, por lo que la insulina estará coordinada con Zn^{2+} en forma de hexámero, y, según suponemos, no se podrá determinar con RIA, por impedimento estérico para unirse al anticuerpo antiinsulina, a no ser que intervenga algún mecanismo que rompa la unión Zn^{2+} -Insulina, como puede ser el medio ácido que

protone los restos histidina a los que está ligado el Zn^{2+} , dejando a éste separado de la insulina, o también en presencia de un quelante de Zn^{2+} . Considerando que el Zn^{2+} se transporta, en la sangre, unido principalmente a la albúmina (Masuoka y Saltman, 1994) (Tibaduiza y Bobilya, 1996) (Küllerich y Christiansen, 1986), podría ser esta molécula la que capte Zn^{2+} dejando libre la insulina, y esta podría ser la explicación por la que se necesita albúmina en el medio de incubación para determinar la secreción de insulina.

Debido a este efecto de la albúmina, el contenido total de insulina del islote se podría determinar añadiendo ácido o albúmina al agua, después de romper en ella el islote.

2.2.3. Estudio de la variabilidad debida a los depósitos de insulina

¿Se pueden cuantificar, con RIA inespecífico, las distintas insulinas inmunorreactivas contenidas en el islote?

En la célula B la insulina inmunorreactiva se encuentra almacenada en gránulos secretores, como proinsulina en los gránulos inmaduros, y como insulina en los gránulos maduros, en forma cristalina, coordinada con Zn^{2+} .

Si se rompe el islote (volumen $\approx 10^5$ - $10^6 \mu m^3$), por sonicación, en 2 ml de agua, la dilución de los componentes del islote será del orden de 10^6 - 10^7 veces, y se solubilizarán la proinsulina y la insulina.

Se acepta que el método de etanol-ácido, para determinar el contenido total de IRI, consiste en la solubilización o extracción de toda la IRI de los islotes, también se supone que el etanol sirve para solubilizar lípidos y que el ácido elimina interferencias de otras proteínas. Esto podría ser así cuando se tratan grandes cantidades de islotes, respecto de un pequeño volumen para solubilizar la IRI total, pero no cuando el contenido del islote se diluye 10^6 veces en agua.

Puesto que en los gránulos maduros la insulina se encuentra coordinada con Zn^{2+} , debe haber impedimento estérico para la unión del anticuerpo antiinsulina del RIA, y por tanto sólo se podrá determinar, rompiendo el islote en agua, la proinsulina y también la insulina que se encuentre

libre como monómero. La acción del ácido, añadido posteriormente, sería romper la unión Zn^{2+} -Insulina (Bryant *et al.*, 1993) (Bentley *et al.*, 1992), quedando libre, como monómero, toda la insulina contenida en el islote para ser determinada por RIA. Pero se sabe, y lo hemos comprobado, que el medio muy ácido produce una interferencia que se interpreta como positiva en el RIA, es decir, a más ácido se detectan menos c.p.m. que se transforman como mayor concentración de insulina, y por ello hay que diluir la muestra para aumentar el pH y disminuir la interferencia.

De esta forma se podrá determinar la insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI), que será proporcional al contenido de proinsulina del islote, y el contenido total en ácido (A-IRI), al mismo pH que en el método de etanol-ácido, constituido por insulina+proinsulina inmunorreactivas.

¿La secreción de insulina, potenciada por IBMX o la inducida por K^+ se relacionan con el contenido de insulina inmunorreactiva en agua?

La metilxantina (IBMX) es un inhibidor de la fosfodiesterasa, que transforma el cAMP en AMP de forma irreversible, por lo cual su presencia en el medio de incubación aumenta los niveles de cAMP en la célula B.

El cAMP activa la proteína quinasa A, que parece intervenir en el proceso de migración de los gránulos maduros, en relación al citoesqueleto, hacia la membrana plasmática, favoreciendo la probabilidad de exocitosis (Christie y Ashcroft, 1985) (Christie y Ashcroft, 1984) (Persaud *et al.*, 1990) (Ämmälä *et al.*, 1994) (Howell, 1984). Por lo tanto la secreción de insulina, inducida por glucosa y potenciada por IBMX, disminuirá el contenido de gránulos maduros, y con ellos el de insulina, que se repondrá a partir del *pool* de proinsulina rápidamente, el cual deberá disminuir en la misma cantidad hasta que se sintetice nueva proinsulina.

El K^+ 50 mM, en el medio de incubación, promueve la entrada de Ca^{2+} a la célula B e inicia el proceso de exocitosis que libera insulina, de los gránulos maduros, que se repondrá rápidamente a partir del *pool* de proinsulina, el cual deberá sintetizarse en la misma cantidad que la secretada.



¿Induce la glucosa la síntesis de insulina inmunorreactiva en agua?

La glucosa activa tanto la síntesis como la secreción de insulina, manteniendo las reservas celulares de insulina, para responder fisiológicamente, en cualquier momento, al estímulo de la glucemia. La célula B necesita ATP, y por tanto glucosa, para la síntesis de proinsulina, a nivel de traducción, y de insulina, en el proceso de maduración (Howell, 1972; citado por Howell y Tyhurst, 1982) (Rhodes *et al.*, 1987) (Schuit *et al.*, 1991). En las condiciones experimentales, el islote sólo cuenta con las reservas celulares de aminoácidos para la síntesis de proinsulina, o con los procedentes de la captación-degradación de la albúmina del medio de incubación.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

MATERIAL Y MÉTODOS



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Animales de experimentación

Los animales empleados en los experimentos que aquí se tratan fueron ratones OF-1, de 27-50 gramos de peso y aproximadamente de 3 meses de edad, criados en el estabulario de la Facultad de Medicina. Los progenitores originales fueron suministrados por Panlab S.A. de Barcelona. Fueron alimentados con la dieta estándar para ratón AO4 de Panlab S.A. y hasta el momento de su sacrificio tuvieron libre acceso al alimento y al agua.

3.1.2. Reactivos

Reactivos generales:

Las sales empleadas para preparar las soluciones y la glucosa-anhidra proceden de Panreac (Barcelona, España).

La albúmina sérica bovina (BSA) fracción V, Adrenalina y Diazóxido, de Sigma (St. Louis, MO, USA).

La enzima digestiva, colagenasa tipo A, de Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany).

Agua estéril y apirógena, de laboratorios Grifols, S.A. (Barcelona, España).

El kit para radioinmunoanálisis de insulina (DIPESA, Madrid, España).

Compuesto por:

Estándares de insulina de rata, de concentraciones ng/ml : 0.0, 0.2, 0.6, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0.

Insulina marcada con ^{125}I en el residuo Tyr-A19.

Tubos de ensayo de 12x75mm revestidos con anticuerpo antiinsulina.

3.1.3. Aparataje

General

Balanza de precisión M150 SX (Cobos S.A., Barcelona, España).

pH-metro microph 2001 (Crison Instruments, Alella, España).

Lupa Olympus SZ60. (Olympus Optical CO. (EUROPA) GMBH, Hamburgo, Alemania).

Fuente de luz fría KL 1500 (Schott. Glaswerke, Wiesbaden, Germany).

Aislamiento de islotes

Centrífuga de mesa (Selecta, Barcelona, España).

Baño termostatzado: termostato electrónico Atom 131 (Atom S.A., Barcelona, España).

Incubación de islotes

Baño termostatzado: termostato electrónico Atom 131 (Atom S.A., Barcelona, España).

Sonicación

Sonic Dismembrator Model 300 (Artek Systems Corporation, Farmingdale, N.Y., USA)

A 30% de potencia máxima.



Centrífuga

GS-6R (Beckman Corp., Palo Alto, Calif., USA).

Medida del tamaño del islote

Cámara de vídeo Sony AVC-D7CE CCD.

Microscopio Olympus BH2-RFCA (Instrumentos científicos S.A., Valencia).

Ordenador 486. Tarjeta video Screen Machine (Fast Electronic, Alemania).

Software Neurograph (Microptic, Barcelona).

RIA de insulina

Magnetoagitador SBS A-06 (Lab-line Instruments inc., Melrose Park, ILL, USA).

Contador de centelleo Beckman Gamma 5500 (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA).

3.1.4. Software

Microsoft Windows 3.1 (Microsoft Corp., USA).

Sigmaplot 2.0 (Jandel Corp., San Rafael, CA, USA).

Excel 5.0 (Microsoft Corp., USA).



3.1.5. Soluciones

Buffer para la extracción de islotes por digestión con colagenasa

Solución A

NaCl	115.0 mM
KCl	5.0 mM
NaHCO ₃	10.0 mM
NaH ₂ PO ₄	1.2 mM
MgCl ₂	1.2 mM
HEPES ácido	25.0 mM
CaCl ₂	2.5 mM
BSA	30.0 g/l
Glucosa	5.0 mM

La solución, mantenida sobre hielo, se gasea de forma continua con carbógeno (O₂ 95% + CO₂ 5%).

Buffer de incubación. Solución Krebs-Ringer-Bicarbonato-Albúmina

(KRB-BSA) Solución B

NaCl	120.0 mM
NaHCO ₃	25.0 mM
KCl	5.0 mM
CaCl ₂	2.5 mM
MgCl ₂	1.1 mM
BSA	7.5 g/l

La solución se gasea de forma continua con carbógeno (O₂ 95% + CO₂ 5%).



3.2. MÉTODOS

3.2.1. Obtención de islotes de Langerhans

Los islotes de Langerhans se aislaron por digestión del páncreas de ratón con colagenasa.

Protocolo: Los animales se sacrifican mediante luxación cervical; a continuación se practica una laparotomía media completa, abatiendo la pared abdominal lateralmente mediante dos secciones horizontales, inmediatamente por debajo de los rebordes costales inferiores. Se tracciona del hígado y se fija a la pared costal mediante una gasa. Se desplazan los intestinos a partir del yeyuno hacia la derecha del animal, de forma que quedan expuestos el páncreas, la vesícula biliar y la porción proximal del conducto biliar común. Se tracciona del duodeno con el fin de localizar la porción distal del conducto biliar común; se liga el colédoco en su unión al duodeno; a unos dos o tres milímetros por debajo de la vesícula biliar se introduce, en el conducto biliar, una aguja de insulina de punta roma, previamente doblada en ángulo recto; a continuación se pasa una ligadura que fija la aguja en su posición. Se inyecta con una jeringa 8 ml de la solución A, suplementada con la cantidad necesaria de colagenasa, según actividad específica. De este modo, se logra una buena distensión del tejido pancreático, que facilita su extracción, además de permitir un buen acceso de la colagenasa a todo el páncreas. Se extrae el páncreas de la cavidad abdominal por disección y se transfiere a un tubo de ensayo de 15 ml, que se incuba en un baño termostatzado, a 37°C durante 10 minutos. La digestión se detiene mediante la adición de Solución A, fría. A partir de este momento comienza la primera fase de lavado; el digerido se agita suavemente con una pipeta, para disgregar y resuspender el tejido, después se sedimenta mediante centrifugación (1200 rpm, durante 50 segundos), y por último se decanta el líquido sobrante, dejando sólo el sedimento de tejido; se termina llenando el tubo con solución A. Este proceso se repite otras dos veces, con el fin de eliminar la colagenasa del medio. Del digerido se recuperan los islotes, uno a uno, mediante succión con pipeta automática, con la finalidad de separar bien los islotes del resto de tejido exocrino. Posteriormente se preincuban en una placa de petri, en Solución A, durante una hora, a temperatura ambiente, y en atmósfera de carbógeno (95% de O₂ + 5% de CO₂).



3.2.2. Incubación de los islotes

Se incuba cada islote, por separado, tomándolo del medio de preincubación, por succión con pipeta automática (4 μ l), y poniéndolo en tubo de ensayo con 200 μ l de Solución B, con la glucosa necesaria para estimular la secreción de insulina, a 37 °C durante 30 minutos, en atmósfera de carbógeno. Al terminar la incubación se saca el islote del medio de incubación, por succión con pipeta automática (4 μ l). Con este medio de incubación se determina la insulina inmunorreactiva (EX-IRI) segregada por el islote.

3.2.3. Tamaño del islote

Se utiliza un sistema compuesto por microscopio, cámara de video y ordenador con tarjeta digitalizadora y software Neurograf. Se calibra con rejilla de 200 μ m para los objetivos de x4 y x10.

Se coloca el islote en un pocillo portaobjetos del microscopio, se utiliza el objetivo de x4 o de x10, y se enfoca y centra la imagen del islote en el monitor. Se dibujan, mediante el ratón del ordenador, la silueta y los ejes mayor y menor del islote. Los datos de las coordenadas se almacenan en el fichero correspondiente. El islote medido se pone en el tubo de ensayo con 2 ml de agua para sonificarlo. El proceso de medición se repite con cada islote.

Los datos obtenidos se procesan con el programa Neurograf o con una hoja de cálculo para determinar los tamaños de los ejes del islote en μ m y de la superficie de la silueta del islote en μ m².

3.2.4. Contenido de insulina del islote

El islote extraído del medio de incubación se coloca en tubo de ensayo con 2 ml de agua fría, para detener la síntesis y secreción de insulina, y se rompe con ultrasonidos durante 20 segundos.

Se centrifuga durante 10 minutos a 4000 r.p.m., y se toman 400 μ l del sobrenadante para determinar la insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI).

A los 1600 µl restantes se añaden 2400 µl de HCl 0.75 M, se agita, con el agitador magnético, y se centrifuga durante 10 minutos a 4000 r.p.m.; se diluyen 100 µl del sobrenadante, a 1/10 en Solución B, para determinar la insulina inmunorreactiva en ácido (A-IRI).

3.2.5. Radioinmunoanálisis de insulina

La técnica de radioinmunoanálisis (RIA) fue introducida originalmente por Yalow y Berson en 1960 para medir la insulina plasmática; actualmente se emplea para determinar cantidades mínimas de ésta y otras hormonas, así como de enzimas y drogas.

El RIA consiste en la medición de la concentración de una sustancia en una muestra mediante la comparación de su reactividad inmunoquímica con la de una serie de soluciones estándar que contienen concentraciones conocidas de la sustancia problema.

Principio del método.- El anticuerpo antiinsulina está unido al tubo de ensayo. La insulina de la muestra y la insulina marcada con ^{125}I compiten en la unión al anticuerpo antiinsulina, de modo que cuando mayor sea la cantidad de insulina en la muestra, menos insulina marcada se une al anticuerpo. La solución con la insulina libre (no unida al anticuerpo) es desechada por decantación, mientras los complejos anticuerpo-insulina quedan adheridos al tubo. Finalmente se leen las c.p.m. en un contador de centelleo gamma. Para determinar la concentración de insulina se construye una curva estándar y se calculan los valores de las muestras problema.

El uso de estándares comerciales, y el hecho de que el anticuerpo viene adherido a los tubos, aumenta la efectividad del método al eliminar posibles factores de variabilidad. Con este método se impide la pérdida de complejo anticuerpo-insulina durante la decantación, las concentraciones de los estándares son las exactas y la concentración de anticuerpo en cada tubo es exactamente la misma.



Protocolo:

Las concentraciones de insulina utilizadas en los estándares son:

0.0 ng/ml, 0.2 ng/ml, 0.6 ng/ml, 2.0 ng/ml, 4.0 ng/ml, 8.0 ng/ml, 16.0 ng/ml

1. Añadir a los tubos, con anticuerpo antiinsulina, 200 μ l de estándar y muestra por duplicado.
2. Añadir 1 ml de insulina marcada a todos los tubos con muestra, estándares, cuentas totales y NSB.
3. Agitar todos los tubos para homogeneizar las soluciones.
4. Incubar todos los tubos durante 24 horas.
5. Decantar todos los tubos, excepto los tubos de cuentas totales.
6. Medir las c.p.m. de cada tubo en el contador gamma.
7. Calcular la concentración de insulina en cada muestra.

La figura 3.1 representa un esquema del método utilizado para determinar secreción y contenido de insulina de cada islote único.

3.2.6. Análisis estadístico

Corrección del efecto del tamaño de los islotes sobre la IRI determinada.

La naturaleza y la intensidad de las relaciones entre variables puede estudiarse por medio del análisis de regresión y correlación.

El análisis de regresión es útil para averiguar la forma probable de la relación entre las variables y, cuando se utiliza este método de análisis, el objetivo final es por lo general predecir o estimar el valor de una variable que corresponde a un valor determinado de otra variable.

Cuando dos variables están correlacionadas, tanto la variable independiente como la variable dependiente tienen su media y desviación estándar de la muestra, pero para cada valor de variable independiente hay una subpoblación de variable dependiente, cuya media se encuentra en la recta de regresión y una desviación estándar afectada de la variable independiente.

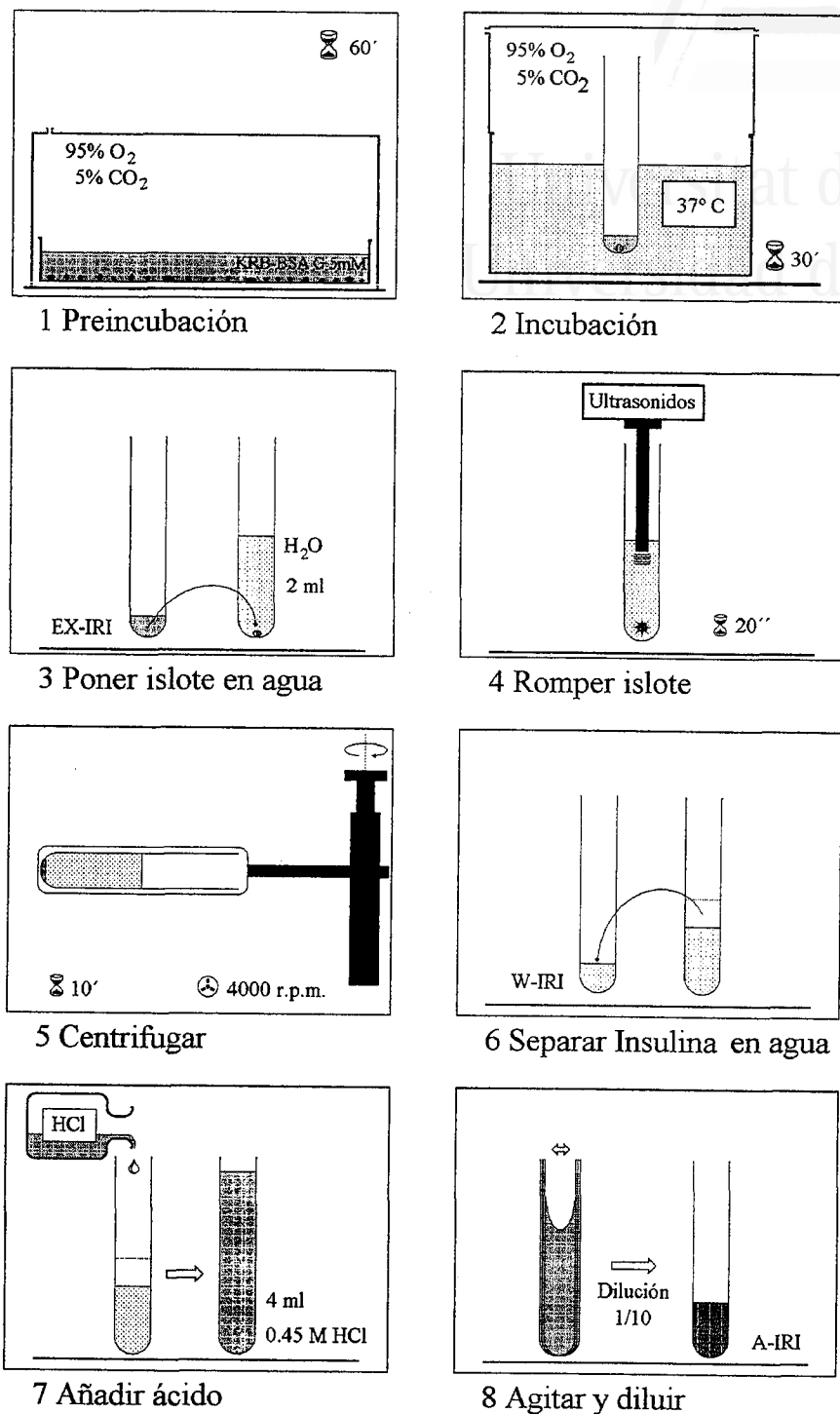


Figura 3.1. Esquema del método utilizado para determinar secreción y contenido de insulina de cada islote único.

Si se quiere comparar una variable de dos muestras (secreción de insulina a dos concentraciones distintas de glucosa) y ambas son dependientes de otra variable (tamaño del islote, contenido total de insulina del islote, etc.), tanto la media como la desviación estándar de ambas muestras estarán afectadas por la variable independiente. Por lo tanto, si la media de la variable independiente difiere en ambas muestras, puede suceder que la diferencia entre las medias de la variable dependiente de las dos muestras sea positiva, nula o negativa, cuando en realidad, al estar afectadas por la variable independiente, la diferencia en la variable dependiente de ambas muestras es la diferencia observada, según la recta de regresión calculada para cada muestra, para un valor dado de la variable independiente.

Hay distintas formas de corregir el efecto de la variable independiente:

1.- Cálculo de la razón entre la variable dependiente y la variable independiente, que se puede expresar como tanto por 1, tanto por 100, o respecto de un valor escogido según el significado físico de la variable independiente (contenido medio de insulina de los islotes en todas las muestras); pero esto sólo es válido cuando la ordenada en el origen de la recta de regresión pase por el origen de coordenadas, pues sino, también presentará dependencia de la variable independiente, esto es, correlación inversa cuando la ordenada en el origen sea positiva y correlación directa cuando la ordenada en el origen sea negativa.

2.- Calcular el valor correspondiente de la variable dependiente de cada muestra, mediante la recta de regresión, para un mismo valor de la variable independiente (contenido medio de insulina de los islotes en todas las muestras).

La desviación estándar de la variable dependiente, de cada muestra, se debe calcular respecto de la variable independiente y puede hacerse de dos formas:

1.- Mediante los residuales: $s_{y/x} = \{[\sum(y_i - y_c)^2] / (n-2)\}^{1/2}$

2.- Mediante las varianzas de ambas variables: $s_{y/x} = \{[(n-1)/(n-2)](s_y^2 - b^2 s_x^2)\}^{1/2}$

De esta forma se dispone de la media de la variable dependiente correspondiente a cada muestra, en las mismas unidades (sin calcular la razón entre la variable independiente y la variable dependiente), y referido a un valor con significado físico (contenido de insulina o tamaño del islote),

y también de la desviación estándar de los datos de cada muestra respecto de la variable independiente, y no respecto de la muestra total.

Otra forma de corregir el efecto de la variable independiente es transformar los datos respecto de un valor de referencia de la variable independiente R_x (contenido medio de insulina de todos los islotes) y girar la recta de regresión de pendiente m , respecto de dicha referencia, a una recta de pendiente nula, mediante la ecuación:

$$y_i = y_i + (R_x - x_i)b$$

La media y la desviación estándar de estos datos transformados nos permite comparar las medias de las muestras sin estar influidas por la variable independiente.

Comparación de medias

Para el análisis estadístico se emplea el test de la t de Student, considerando como diferentes las muestras entre las que existe una diferencia entre medias con $p < 0.05$.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

RESULTADOS



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

4. RESULTADOS

4.1. En el páncreas de ratón no existen islotes silentes

Calculando el límite de detección de la técnica de RIA, utilizando de muestra el medio de incubación (KRB-BSA), como el valor medio + 3DS, se obtiene un resultado de 16 pg; por tanto, todos los valores de secreción de insulina inmunorreactiva (EX-IRI) inferiores a 16 pg/islote/30 minutos se consideran procedentes de islotes silentes.

La **figura 4.1a** muestra la secreción de insulina inmunorreactiva (EX-IRI) de 491 islotes, estudiados a distintas concentraciones de glucosa, y sólo uno (13 pg/islote/30 minutos) cae por debajo del límite de detección, por lo que el 99.8% de los islotes han producido secreción de insulina inmunorreactiva en un rango de 21 a 2679 pg cada islote en 30 minutos.

La **figura 4.1b** representa una ampliación de la **figura 4.1a** en el rango de secreción de insulina inmunorreactiva (EX-IRI) de 0 a 300 pg/islote/30 minutos, para observar mejor el comportamiento de los islotes con menor secreción de insulina inmunorreactiva.



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

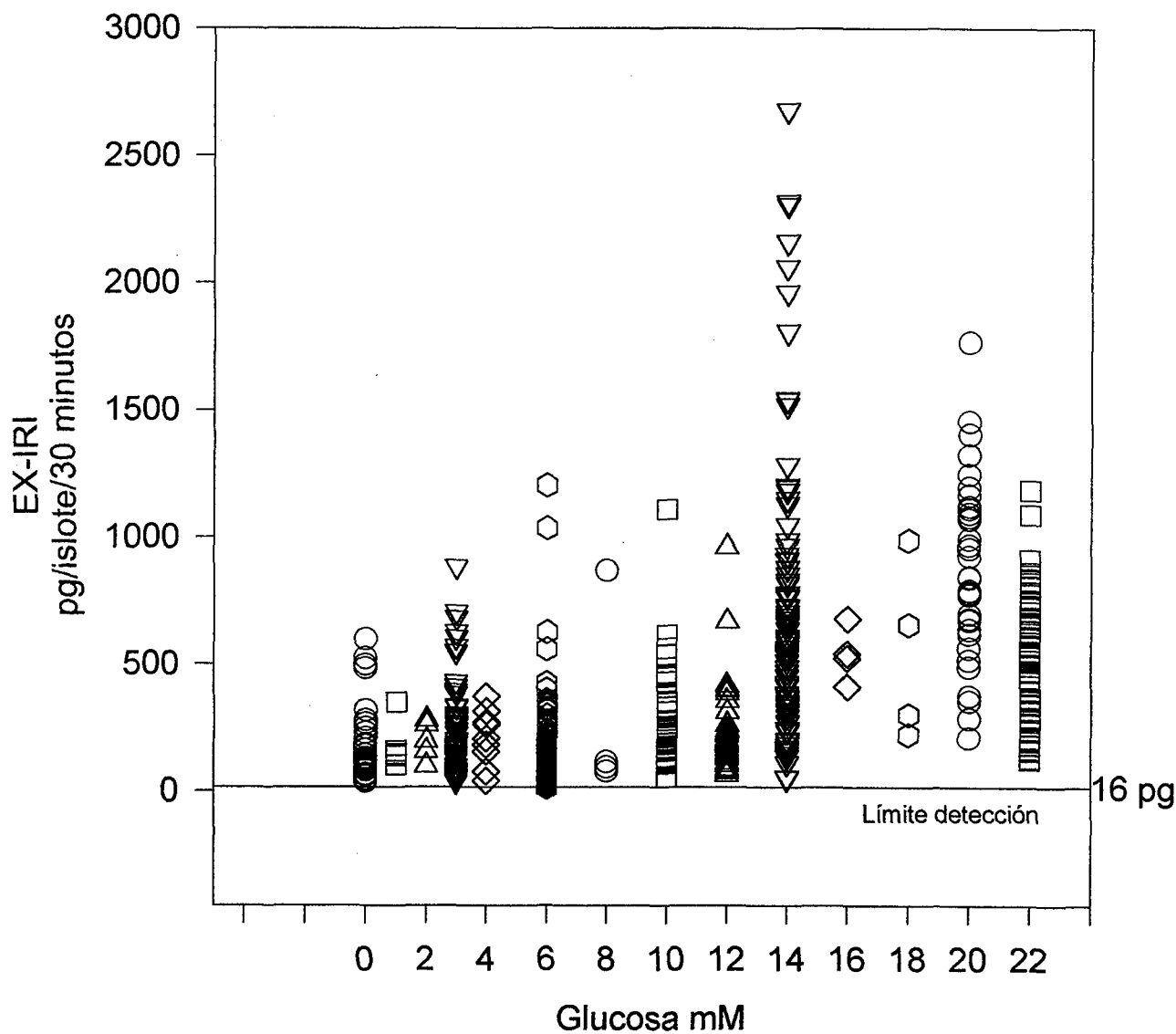


Fig.- 4.1a. Secreción de insulina (EX-IRI) de 491 islotes únicos, estudiados a distintas concentraciones de glucosa. El límite de detección del RIA es 16 pg. Sólo uno de los islotes (13 pg/islote/30 minutos a 6 mM G) cae por debajo del límite de detección

Ampliación de la figura 4.1a

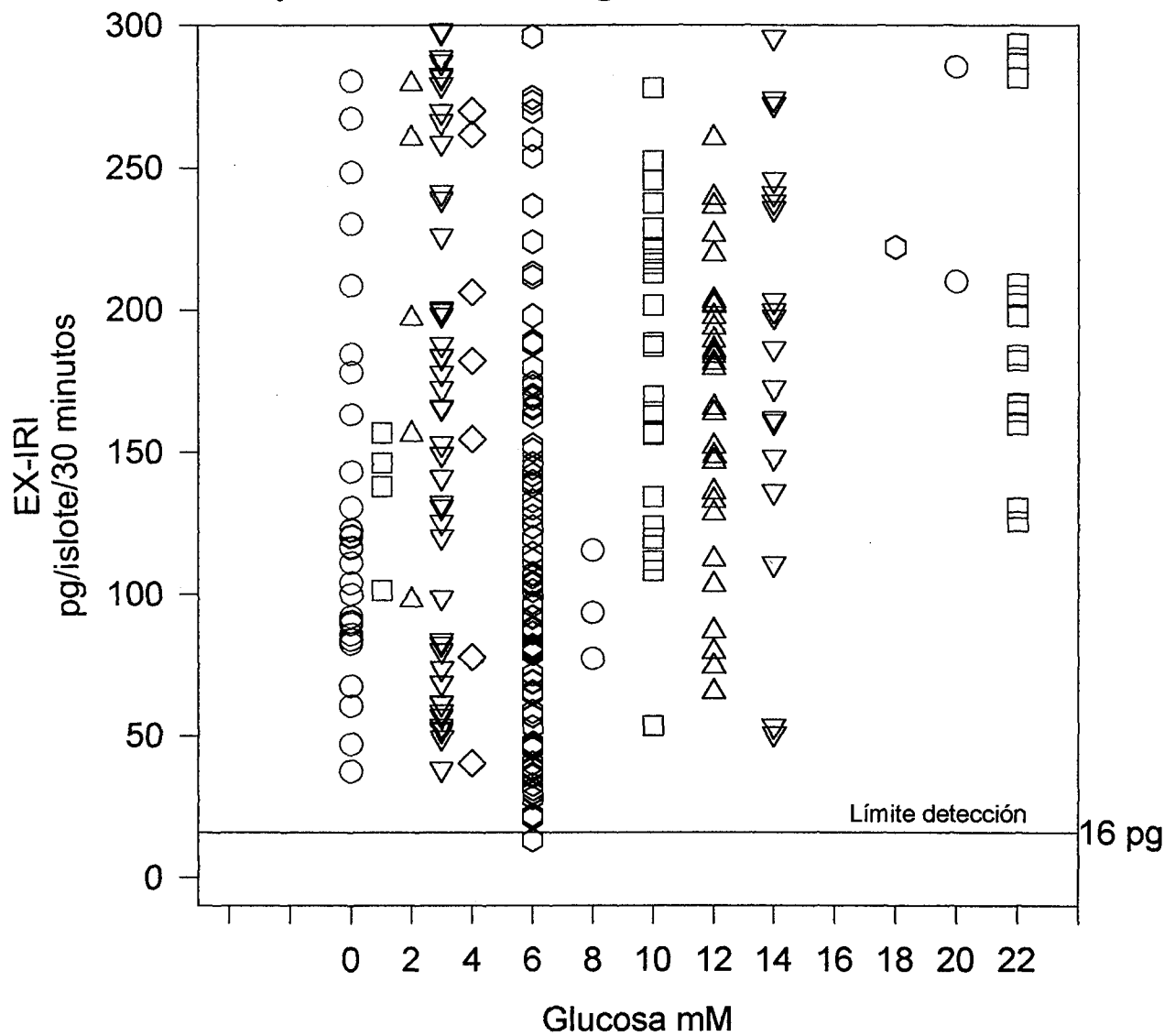


Fig.- 4.1b. Secreción de insulina (EX-IRI) de 491 islotes únicos, estudiados a distintas concentraciones de glucosa. El límite de detección del RIA es 16 pg. Sólo uno de los islotes (13 pg/islote/30 minutos a 6 mM G) cae por debajo del límite de detección

4.2. La respuesta de los islotes únicos depende de la concentración de glucosa

La **figura 4.2** muestra la secreción media de insulina (EX-IRI), de los islotes únicos, con su error estándar (ES), para cada concentración de glucosa; en cada experimento están unidos por una línea los puntos correspondientes a un mismo ratón.

En la **figura 4.3** se observa la respuesta media de los datos de la **figura 4.2**, como fracción de la secreción de insulina (%FEX), esto es, la secreción de insulina inmunorreactiva (EX-IRI) por cada 100 unidades de contenido de insulina inmunorreactiva en ácido (A-IRI).

En las dos figuras se observa variabilidad entre individuos, y se puede comprobar que la corrección respecto del contenido disminuye la variabilidad intra e interindividuos.

Para observar la secreción de insulina de los islotes obtenidos de un solo ratón, en el rango de concentración de glucosa de 4 mM a 22 mM, a incrementos de 2 mM, con $n=4$ en cada concentración de glucosa, se ha realizado la incubación de cada islote por separado, determinando la secreción de insulina inmunorreactiva (EX-IRI) y el contenido de insulina inmunorreactiva en ácido por el método tradicional de etanol-ácido (A-IRI).

Como se observa en la **figura 4.4**, los islotes presentan una gran variabilidad en la secreción de insulina, como respuesta a la glucosa; comprobando que hay islotes que liberan mucha más insulina, a concentración media de glucosa, que otros a mayor concentración de glucosa. Sin embargo, en todos los casos la liberación de insulina está en relación directa con la concentración de glucosa. El ajuste de los datos, a un polinomio de orden dos, muestra que la relación secreción-glucosa es semejante a la curva sigmoideal descrita en la literatura, a pesar del bajo número de puntos para cada concentración de glucosa.

En la **figura 4.5** se representa % de la fracción de secreción de insulina (%FEX) y, aunque se sigue observando variabilidad, el comportamiento de la curva ajustada de orden dos es más próxima a la clásica curva sigmoideal, aumentando la pendiente del tramo proporcional.

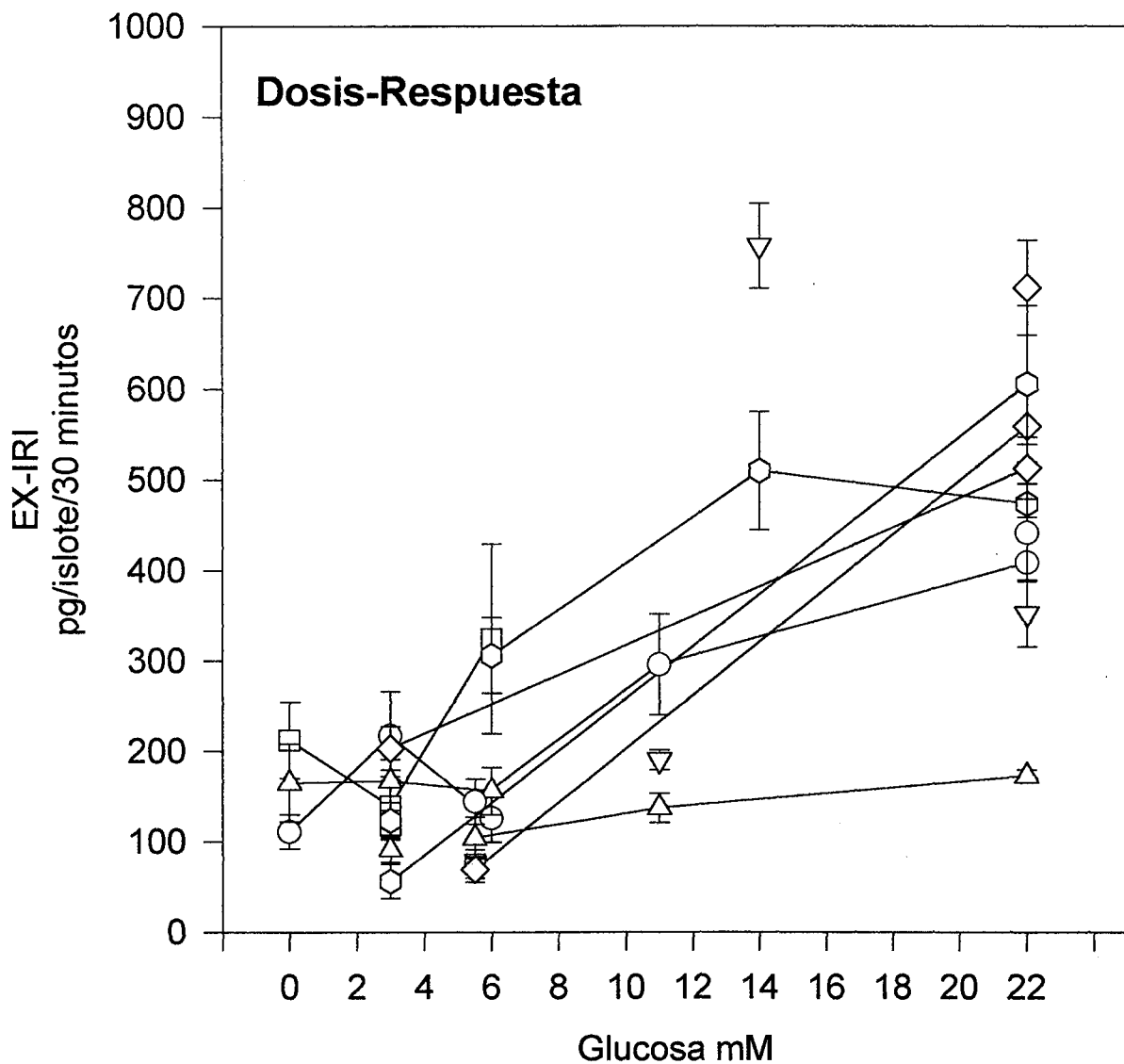


Fig.- 4.2. Secreción media ($M \pm ES$) de insulina (EX-IRI), por islote único, a distintas concentraciones de glucosa. Los puntos correspondientes a un mismo ratón están unidos por una línea.

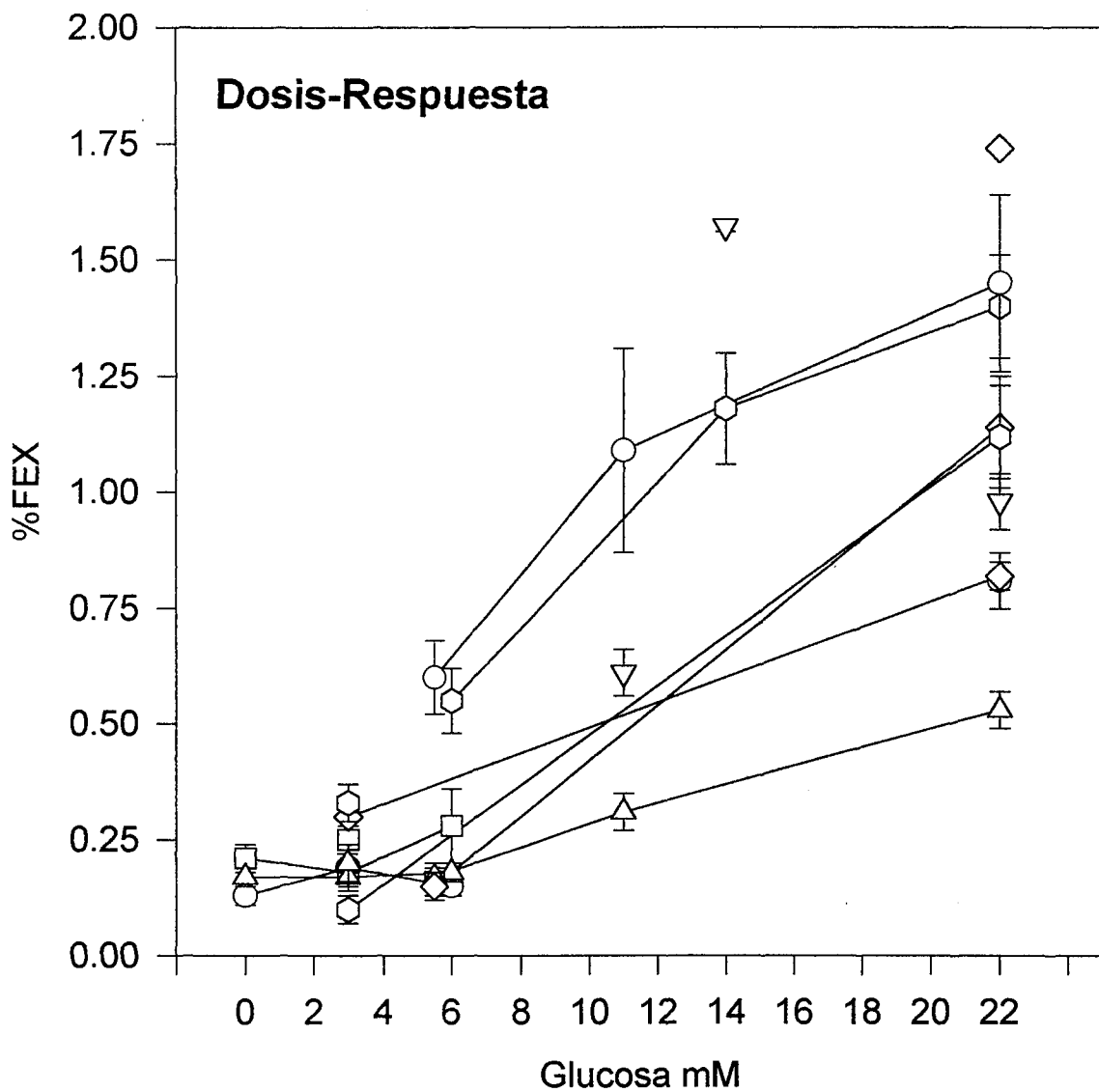


Fig.- 4.3. Fracción (%FEX) de secreción de insulina ($M \pm ES$), de cada islote, a distintas concentraciones de glucosa. Los puntos correspondientes a un mismo ratón están unidos por una línea. Los resultados indican variabilidad entre individuos.

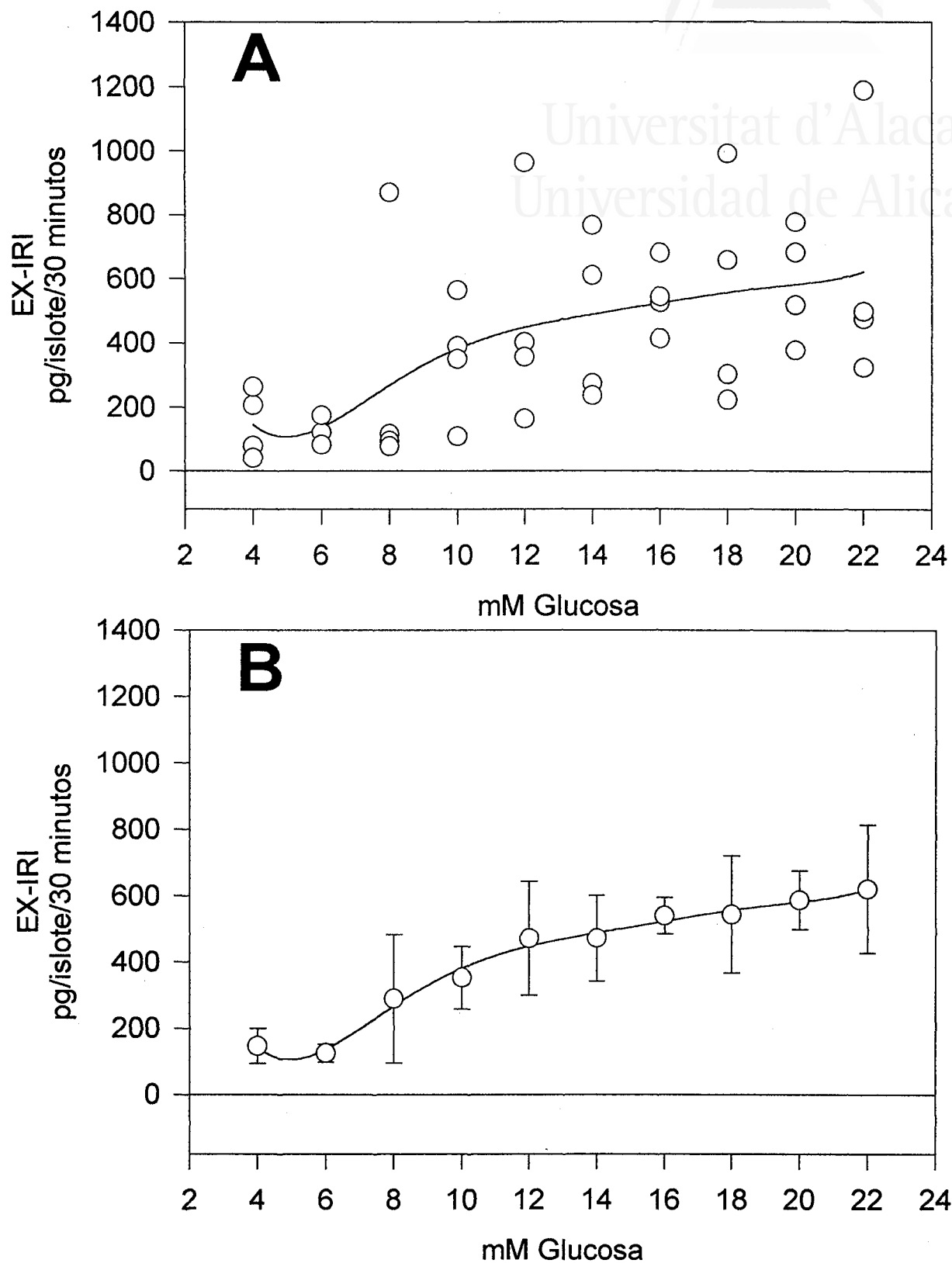
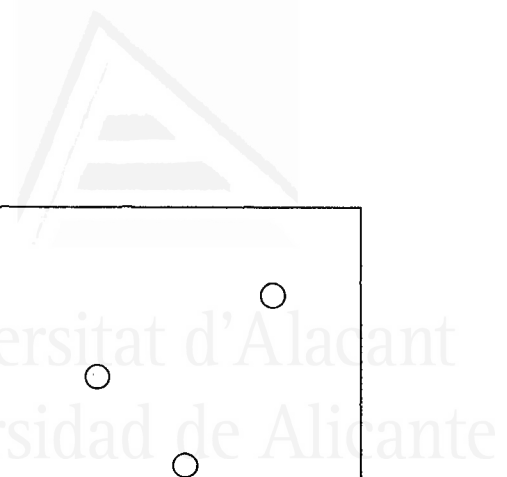


Fig.- 4.4. Secreción de insulina (EX-IRI) por islote único a distintas concentraciones de glucosa. La gráfica **A** muestra la dispersión de los datos y la **B** la media de cada grupo con su error standard. Los islotes proceden de un único ratón.

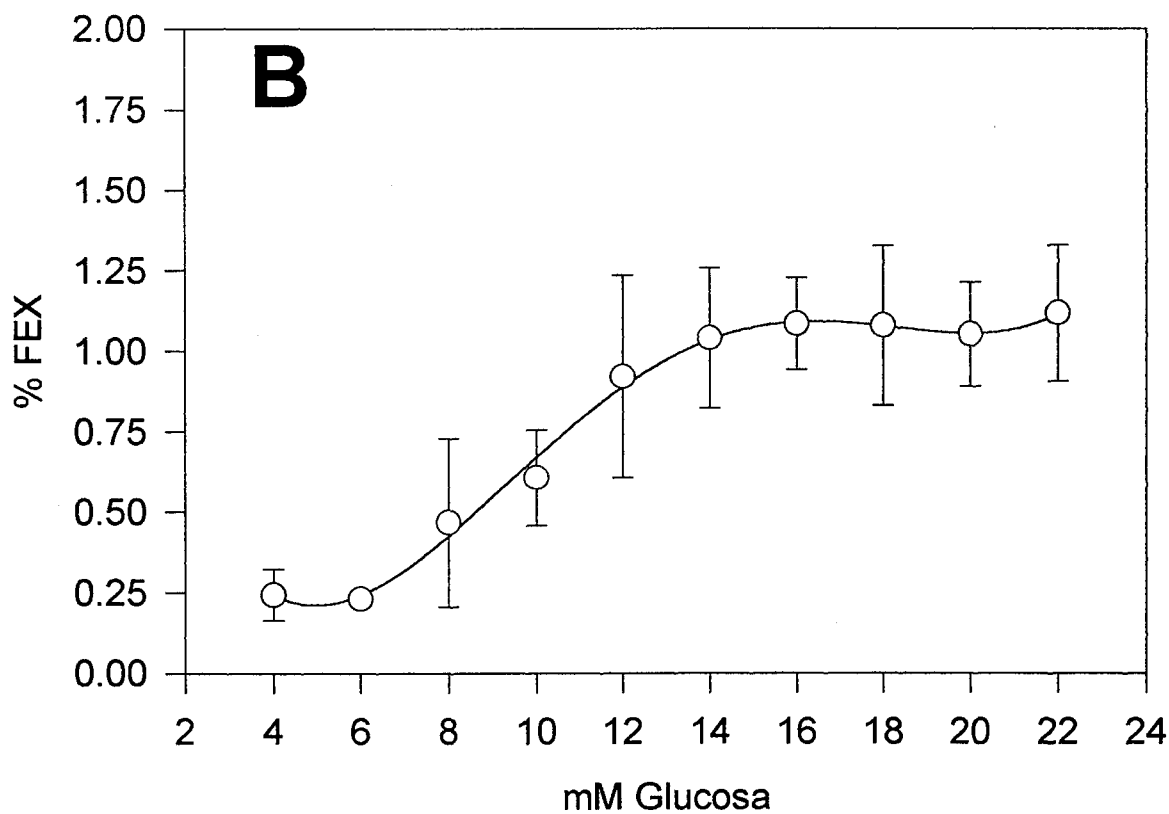
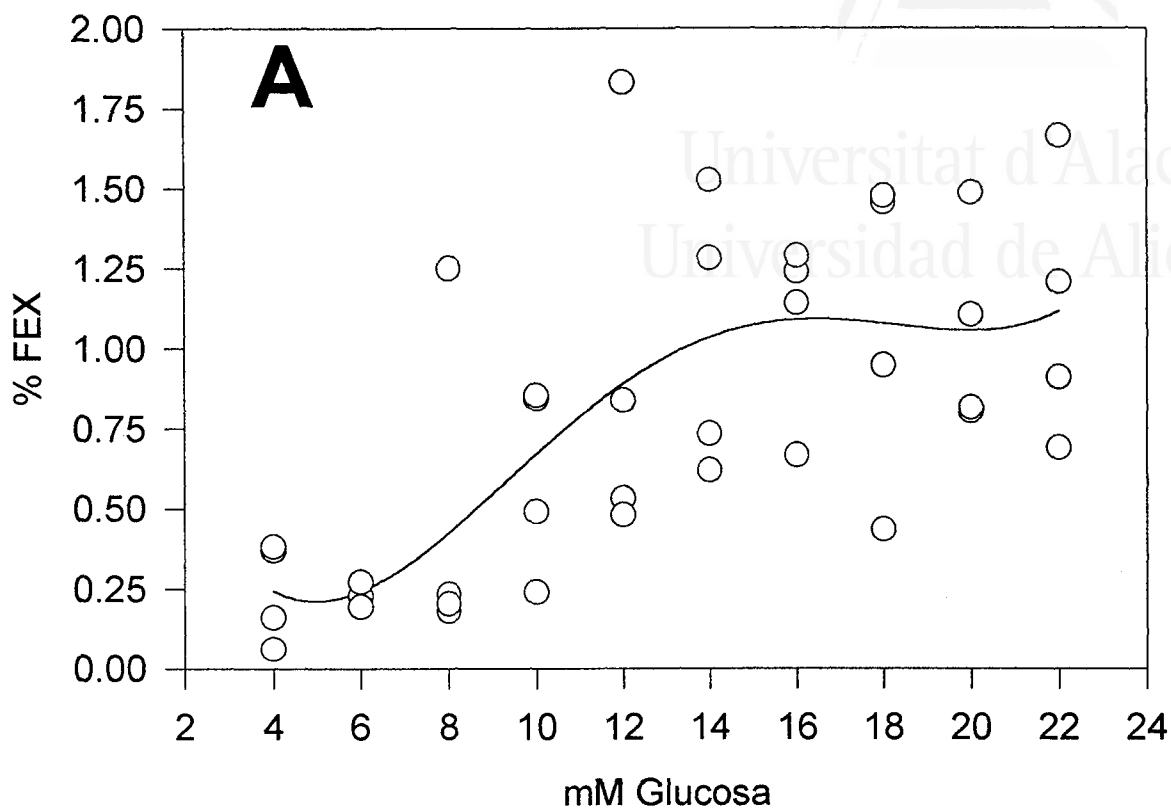


Fig.- 4.5. Fracción de secreción de insulina (%FEX), por islote único, a distintas concentraciones de glucosa. La gráfica **A** muestra la dispersión de los datos y la **B** la media de cada grupo con su error standard. Los islotes proceden de un único ratón.

4.3. Relación de la secreción de insulina, inducida por glucosa, y del contenido de insulina con el tamaño del islote

Para observar si existe correlación entre el tamaño del islote y la secreción de insulina o el contenido de insulina, se ha realizado la medida de los diámetros mayor y menor del islote, así como el área comprendida por la silueta del islote visto al microscopio, además de la secreción de insulina inmunorreactiva (EX-IRI), y el contenido de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI) y de insulina inmunorreactiva en ácido (A-IRI) de cada islote.

4.3.1. Secreción

La **figura 4.6a** muestra la curva de regresión de orden 2 entre el diámetro medio y la secreción de insulina inmunorreactiva (EX-IRI) (gráfico A), y entre el área del islote y la secreción de insulina inmunorreactiva (EX-IRI) (gráfico B), a una concentración de glucosa 14 mM, (n=20); se observa que los islotes de mayor tamaño (>300 μm) se desvían del comportamiento lineal que parecen presentar los islotes más pequeños.

La **figura 4.6b** muestra la recta de regresión simple del mismo experimento de la **figura 4.6a**, excluyendo los dos islotes de mayor tamaño, (n=18), mostrando los siguientes estadísticos:

Diámetro	Media = 163 μm
	DS = 42 μm
	Rango (90 - 232)
Area	Media = 22602 μm^2
	DS = 11215 μm^2
	Rango (6550 - 41410)

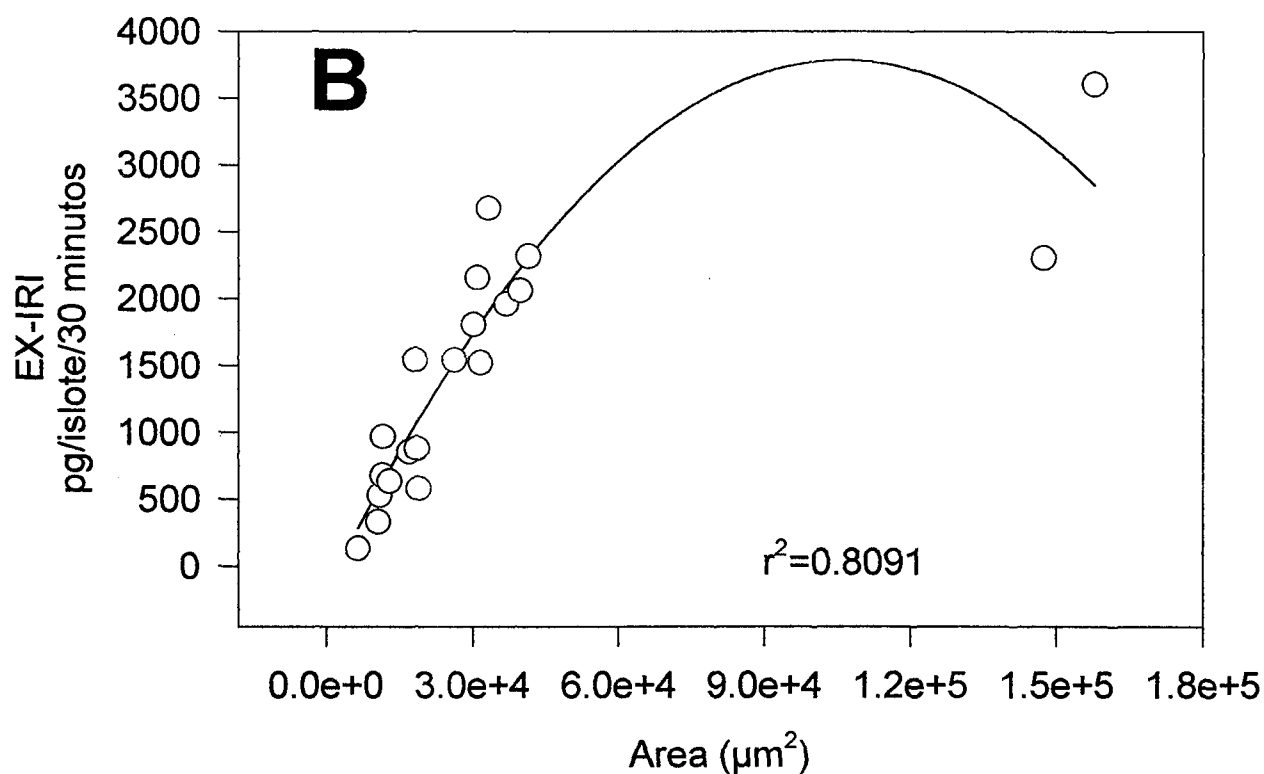
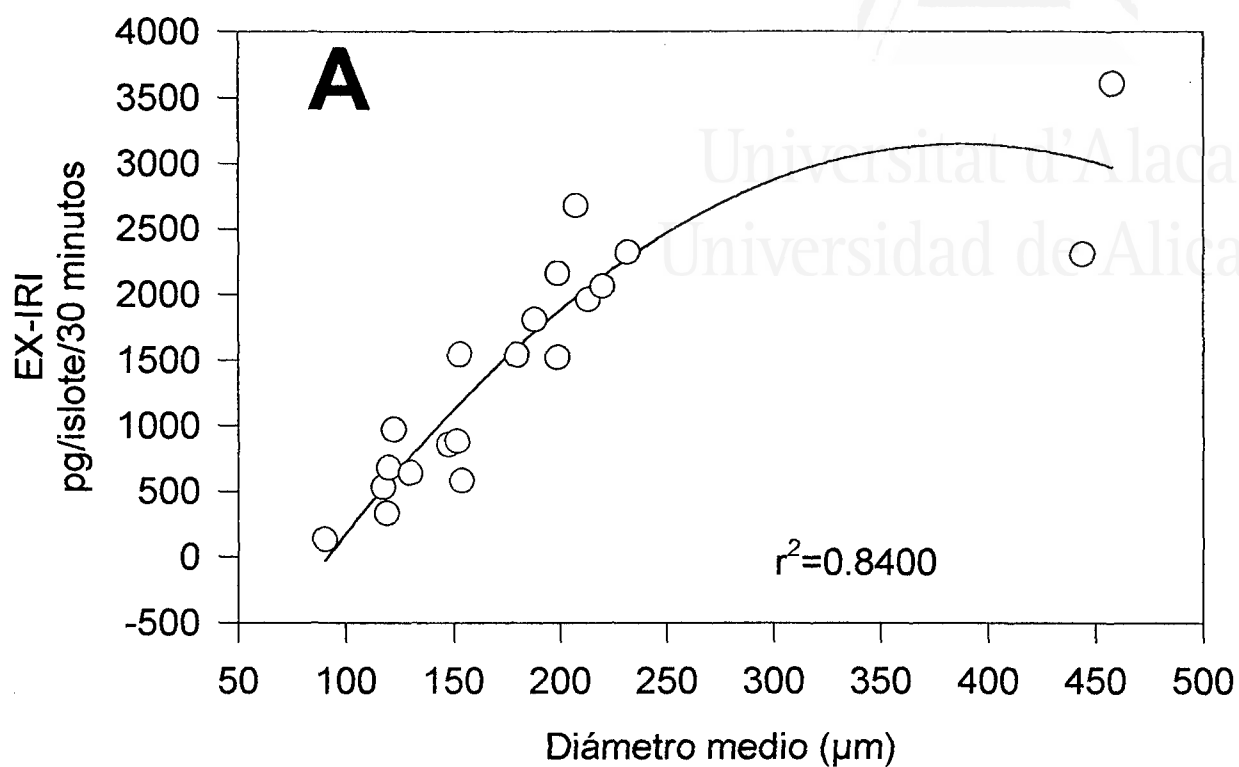
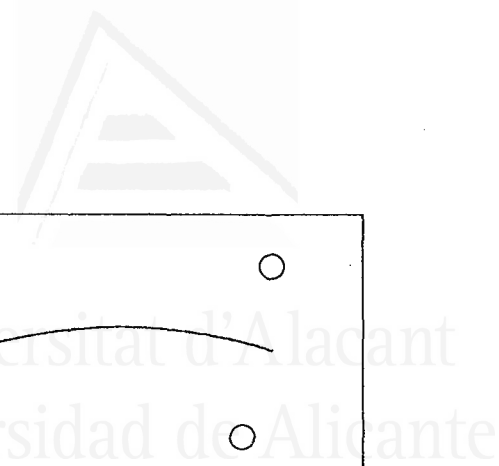


Fig.- 4.6a. Secreción de insulina (EX-IRI), por islote único, inducida por glucosa 14 mM, en relación con el tamaño del islote. Gráfica A respecto del diámetro medio del islote; gráfica B respecto del área plana del islote.

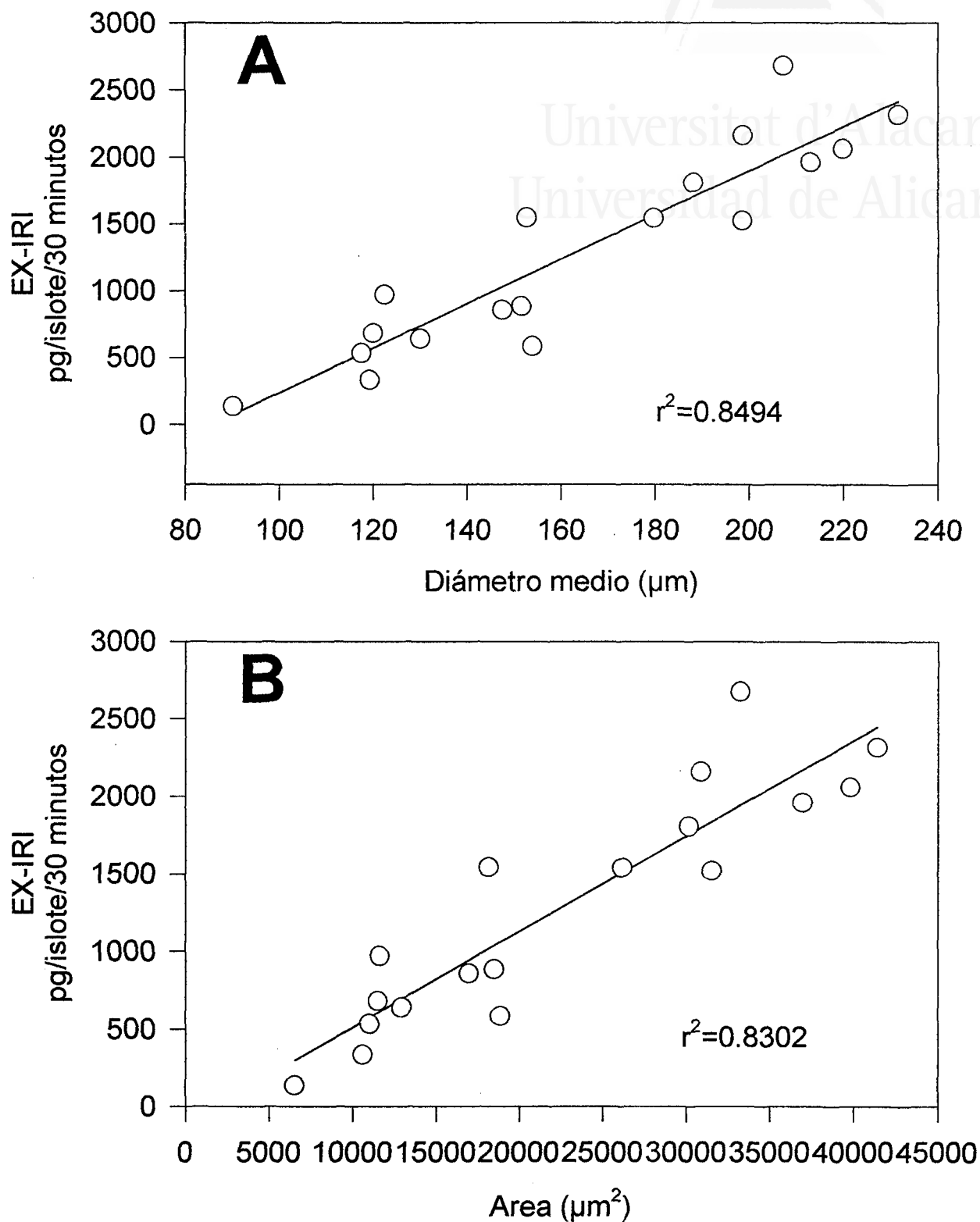
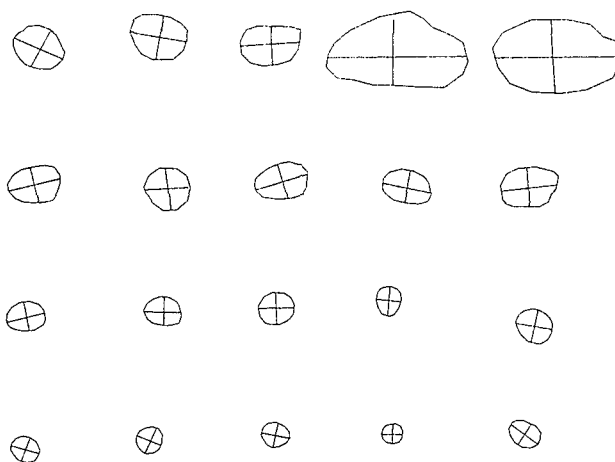


Fig.- 4.6b. Secreción de insulina (EX-IRI), por islote único, inducida por glucosa 14 mM, en relación con el tamaño del islote. Gráfica **A** respecto del diámetro medio del islote; gráfica **B** respecto del área plana del islote.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



I
└──┘
200 μm

Figura 4.7. Tamaño y forma de los islotes utilizados en el experimento de la figura 4.6.

EX-IRI Media = 1290 pg/islote/30 minutos
 DS = 760 pg/islote/30 minutos
 Rango (136 - 2680)
 C.V.=58.9%

Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

Se observa que hay relación directa entre tamaño y secreción de insulina, con los siguientes parámetros:

Diámetro $r^2=0.8494$, $a=-1421$, $b=16.586$, $s_{y/x}=313$, C.V.=24.3%

Area $r^2=0.8302$, $a=-106$, $b=0.062$, $s_{y/x}=323$, C.V.=25.0%

Como se comprueba en los resultados, la desviación estándar de la muestra de la secreción de insulina inmunorreactiva (EX-IRI) (DS=760) se reduce considerablemente cuando se corrige el efecto del tamaño ($s_{y/x}=313$).

La **figura 4.7** presenta el tamaño y la forma de los islotes utilizados en el experimento de la **figura 4.6**.

4.3.2. Contenido

Puesto que en los gránulos maduros la insulina se encuentra coordinada con Zn^{2+} , debe haber impedimento estérico para la unión del anticuerpo antiinsulina del RIA, y por tanto sólo se podrá determinar, rompiendo el islote en agua, la proinsulina y también la insulina que se encuentre libre como monómero. La acción del ácido, añadido posteriormente, sería romper la unión Zn^{2+} -Insulina (Bryant *et al.*, 1993) (Bentley *et al.*, 1992), quedando libre, como monómero, toda la insulina contenida en el islote para ser determinada por RIA.

La **figura 4.8a** muestra la curva de regresión de orden 2 entre el diámetro medio y la insulina inmunorreactiva en ácido (A-IRI) (gráfico A) y entre el área del islote y la insulina inmunorreactiva en ácido (A-IRI) (gráfico B), de los islotes ($n=43$) en preincubación con glucosa 5 mM mantenidos sobre hielo. Se observa que los islotes de mayor tamaño ($>300 \mu m$) se desvían del comportamiento lineal que parecen presentar los islotes menores.



La **figura 4.8b** muestra la recta de regresión simple del mismo experimento de la **figura 4.8a**, excluyendo los dos islotes de mayor tamaño, ($n=41$), mostrando los siguientes estadísticos:

Diámetro	Media = 197 μm DS = 40 μm Rango (125 - 295)
Area	Media = 31020 μm^2 DS = 12488 μm^2 Rango (12103 - 67342)
A-IRI	Media = 38184 pg/islote DS = 12460 pg/islote Rango (16220 - 70130) C.V.=32.6%

Se observa que hay relación directa entre tamaño y contenido de insulina inmunorreactiva en ácido, con los siguientes parámetros:

Diámetro	$r^2=0.8412$, $a=-18673$, $b=287.963$, $s_{y/x}=4812$, C.V.=12.6%
Area	$r^2=0.8383$, $a=9846$, $b=0.9135$, $s_{y/x}=5075$, C.V.=13.3%

Como se comprueba en los resultados, la desviación estándar de la muestra de insulina inmunorreactiva en ácido (A-IRI) (DS=12460) se reduce considerablemente cuando se corrige el efecto del tamaño ($s_{y/x}=4812$).

La **figura 4.9a** muestra la curva de regresión de orden 2 entre el diámetro medio y la insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI) (gráfico A), y entre el área del islote y la insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI) (gráfico B), de los islotes ($n=43$) en preincubación con glucosa 5 mM mantenidos sobre hielo (mismo experimento que el de la **figura 4.8**). Se observa que los islotes



de mayor tamaño ($>300 \mu\text{m}$) se desvían del comportamiento lineal que parecen presentar los demás islotes menores.

La **figura 4.9b** muestra la recta de regresión simple del mismo experimento de la **figura 4.9a**, excluyendo los dos islotes de mayor tamaño, ($n=41$), mostrando los siguientes estadísticos:

Diámetro	Media = $197 \mu\text{m}$ DS = $40 \mu\text{m}$ Rango (125 - 295)
Area	Media = $31020 \mu\text{m}^2$ DS = $12488 \mu\text{m}^2$ Rango (12103 - 67342)
W-IRI	Media = 3591 pg/islote DS = 894 pg/islote Rango (1712 - 4997) C.V.=24.9%

Se observa que hay relación directa entre tamaño y contenido de insulina inmunorreactiva en agua, con los siguientes parámetros:

Diámetro $r^2=0.7270$, $a=-203$, $b=19.216$, $s_{y/x}=462$, C.V.=12.9%

Area $r^2=0.6857$, $a=1751$, $b=0.0593$, $s_{y/x}=507$, C.V.=14.1%

Como se comprueba en los resultados, la desviación estándar de la muestra de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI) (DS=894) se reduce considerablemente cuando se corrige el efecto del tamaño ($s_{y/x}=462$).

La **figura 4.10** presenta el tamaño y la forma de los islotes utilizados en el experimento de las **figuras 4.8 y 4.9**.

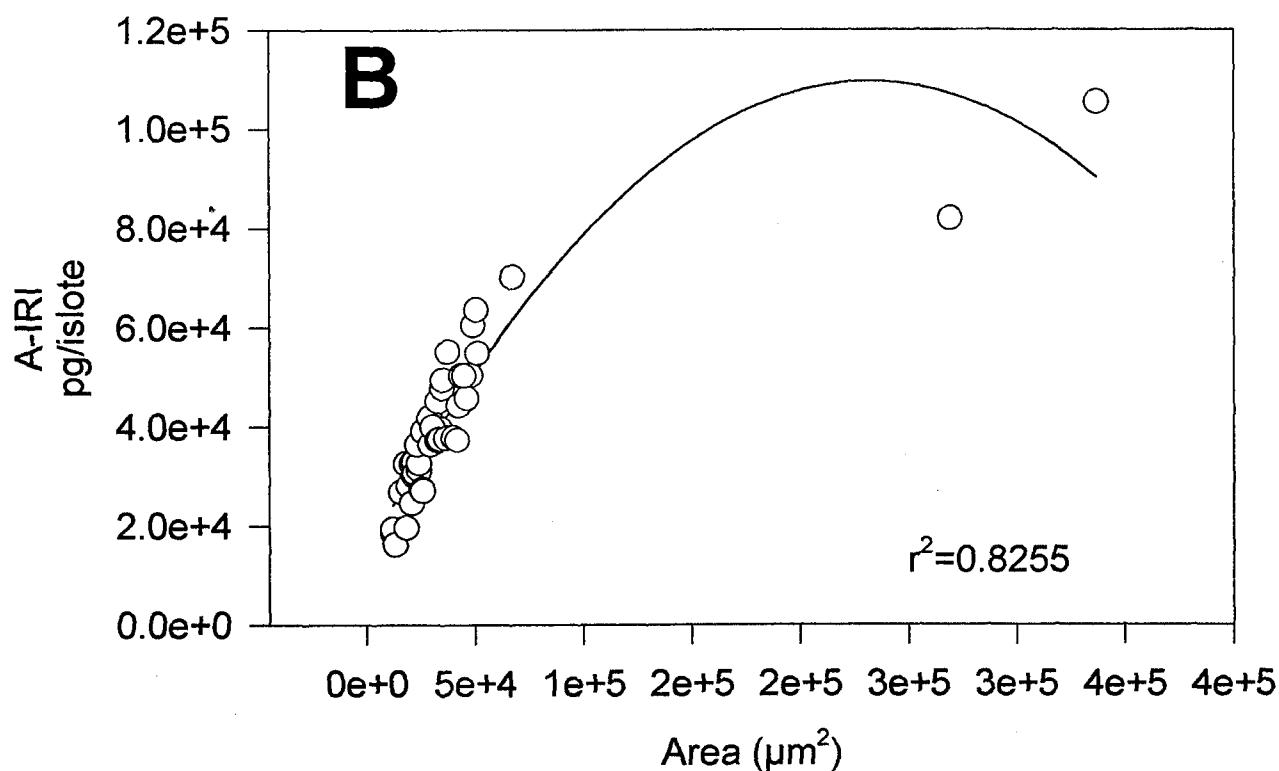
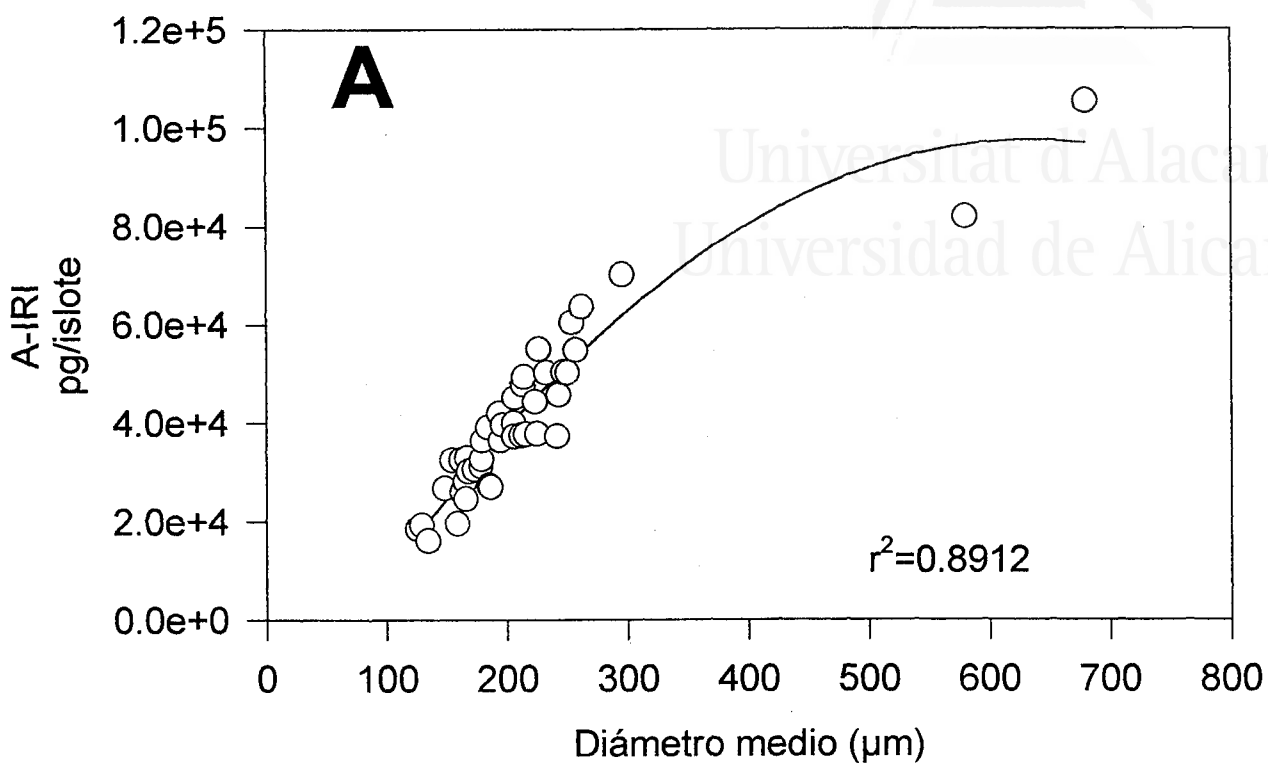


Fig.- 4.8a. Contenido de insulina inmunorreactiva en ácido (A-IRI), de islote único, en relación con el tamaño del islote. Gráfica A respecto del diámetro medio del islote; gráfica B respecto del área plana del islote.

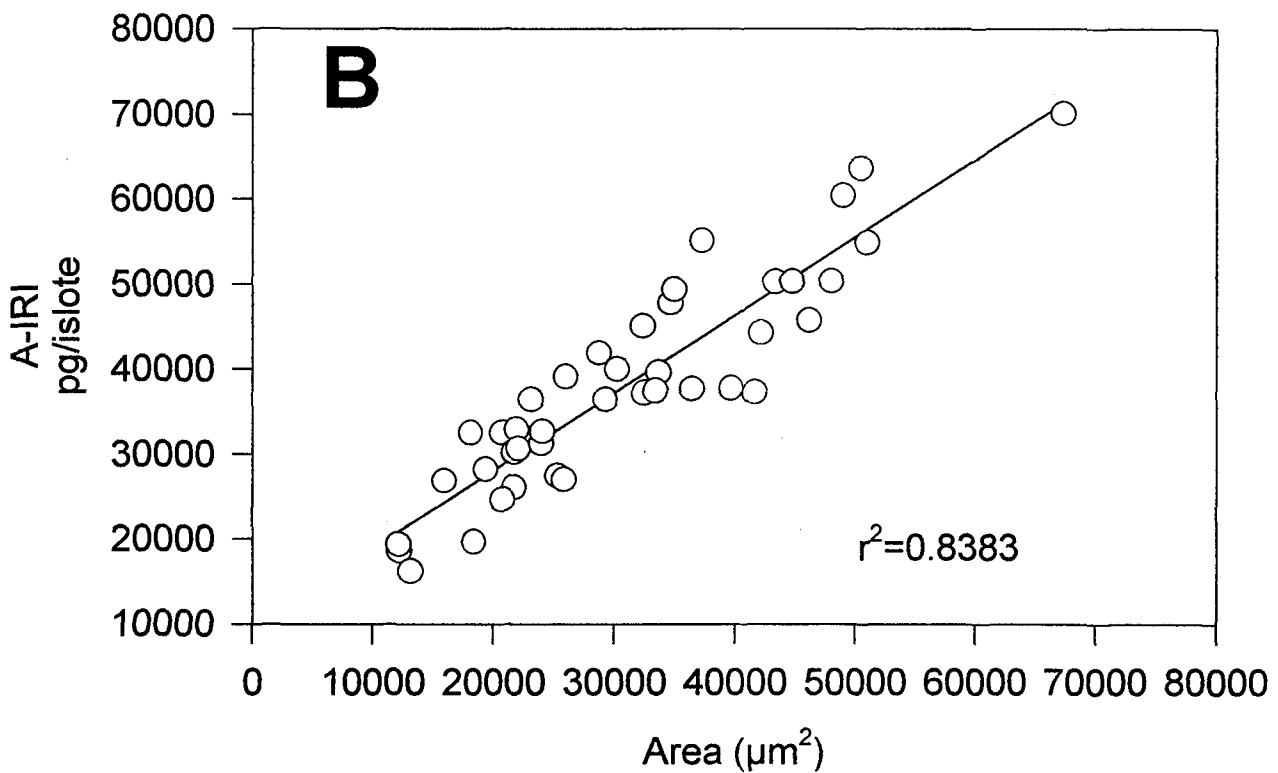
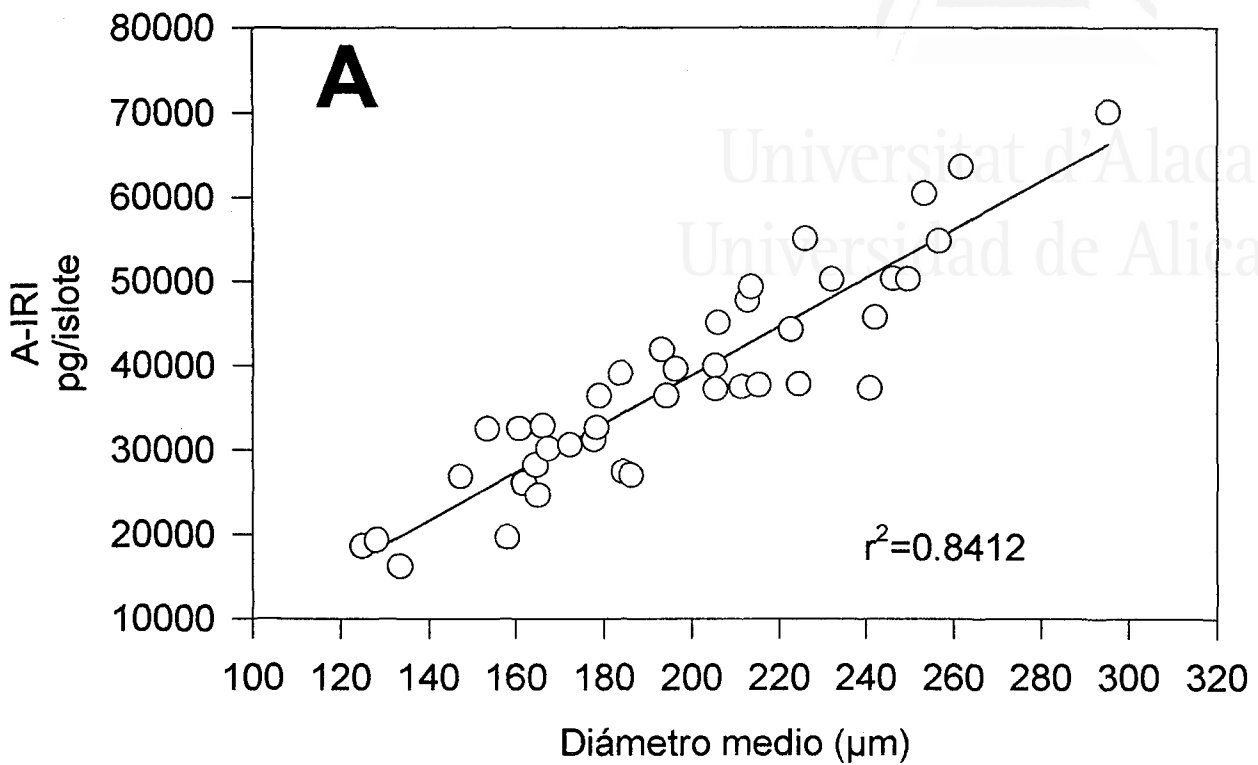


Fig.- 4.8b. Contenido de insulina inmunorreactiva en ácido (A-IRI), de islote único, en relación con el tamaño del islote. Gráfica **A** respecto del diámetro medio del islote; gráfica **B** respecto del área plana del islote.

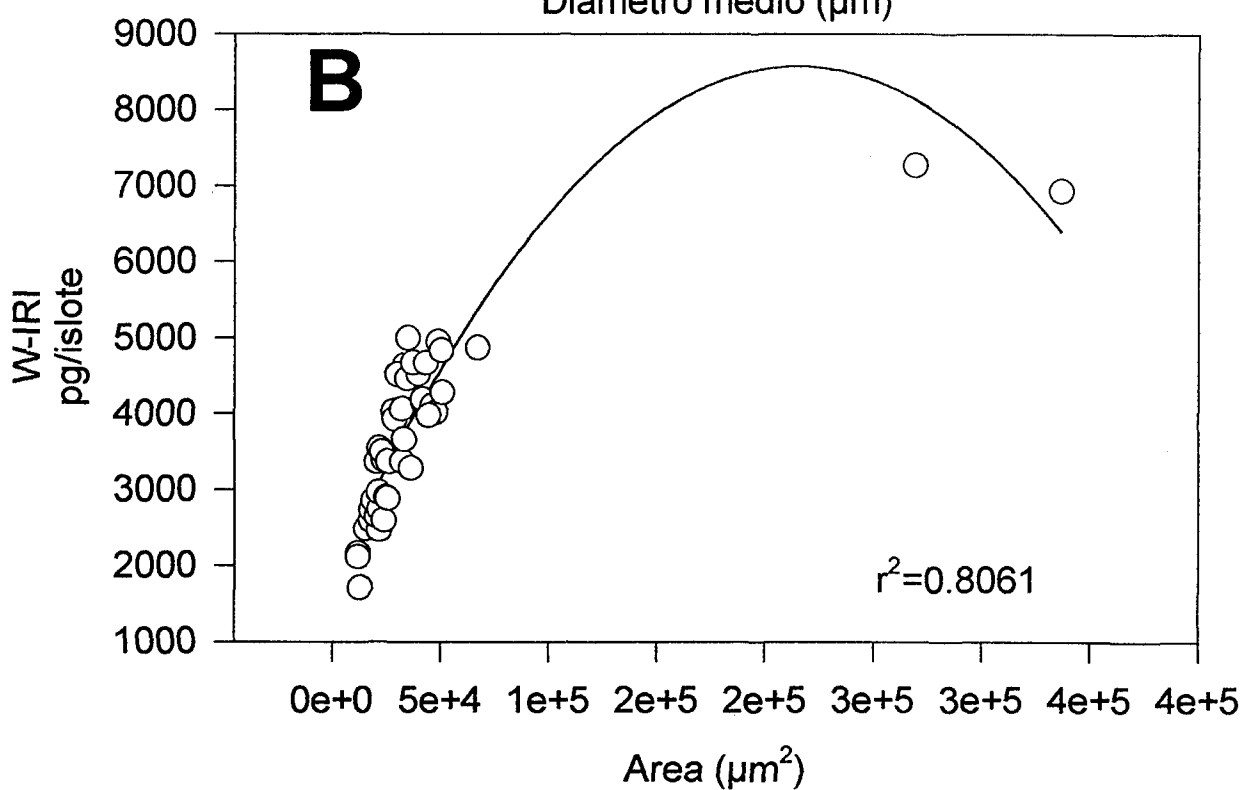
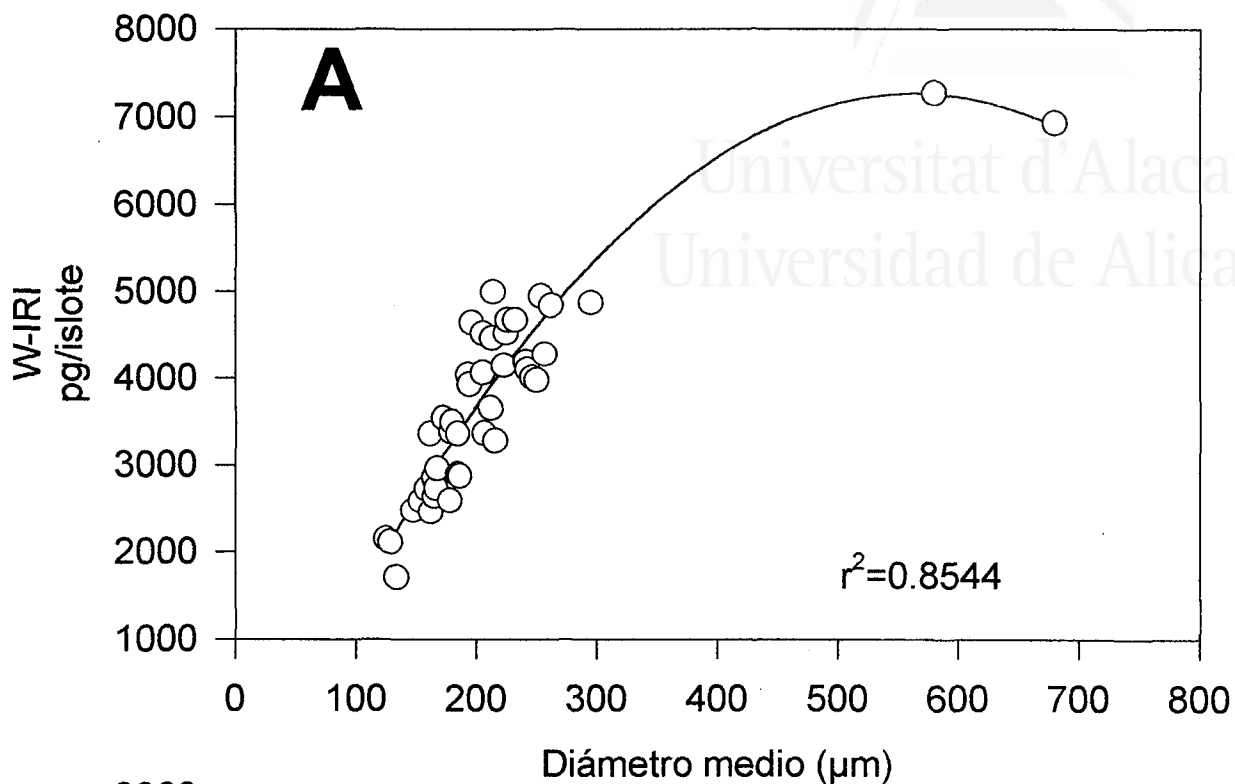
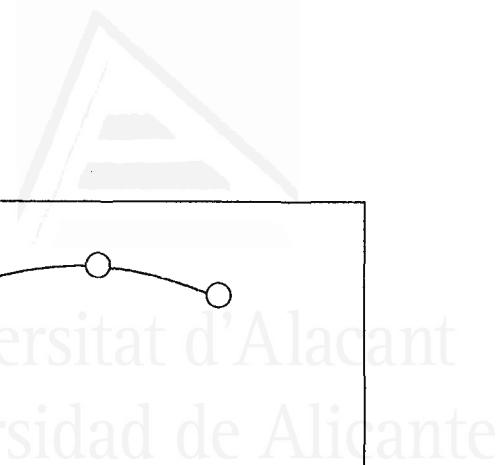


Fig.- 4.9a. Contenido de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI), de islote único, en relación con el tamaño del islote. Gráfica **A** respecto del diámetro medio del islote; gráfica **B** respecto del área plana del islote.

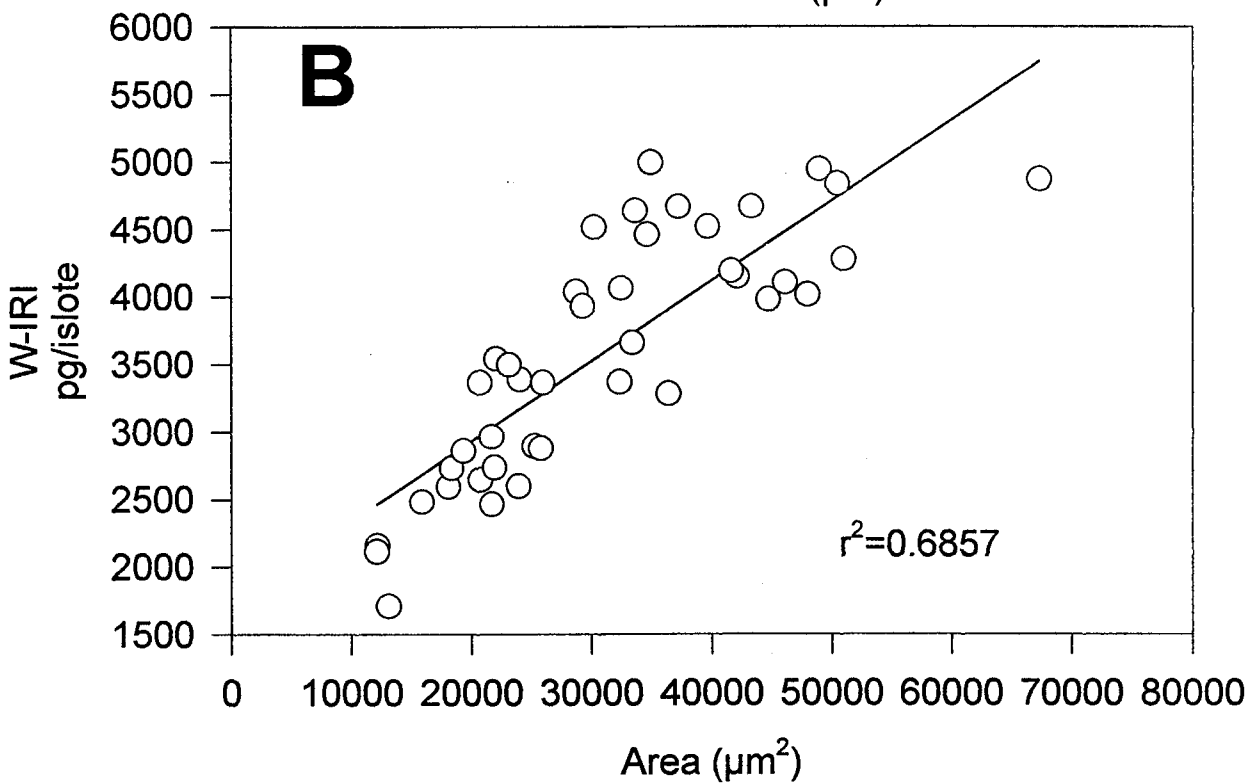
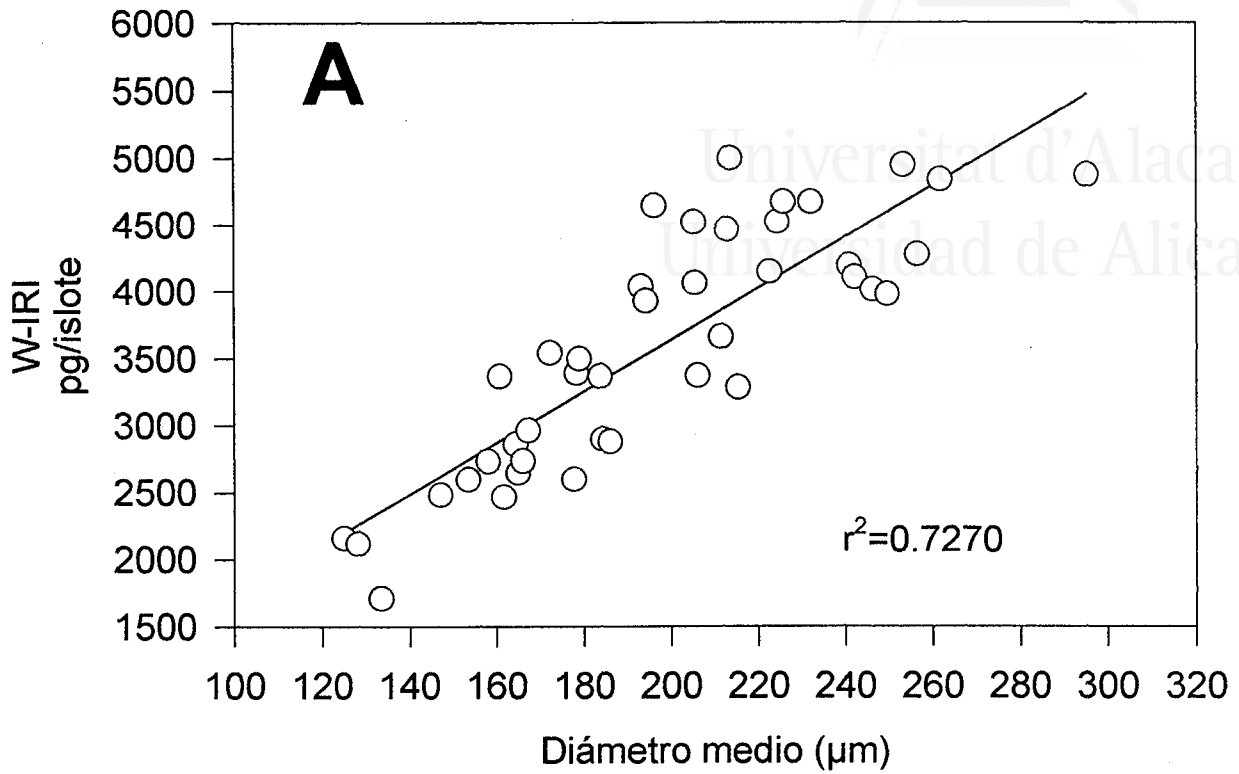
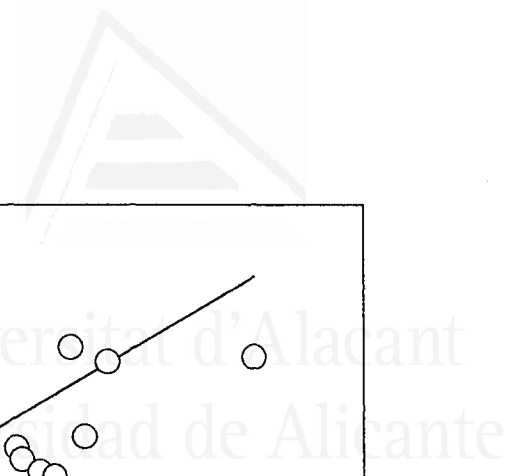


Fig.- 4.9b. Contenido de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI), de islote único, en relación con el tamaño del islote. Gráfica **A** respecto del diámetro medio del islote; gráfica **B** respecto del área plana del islote.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

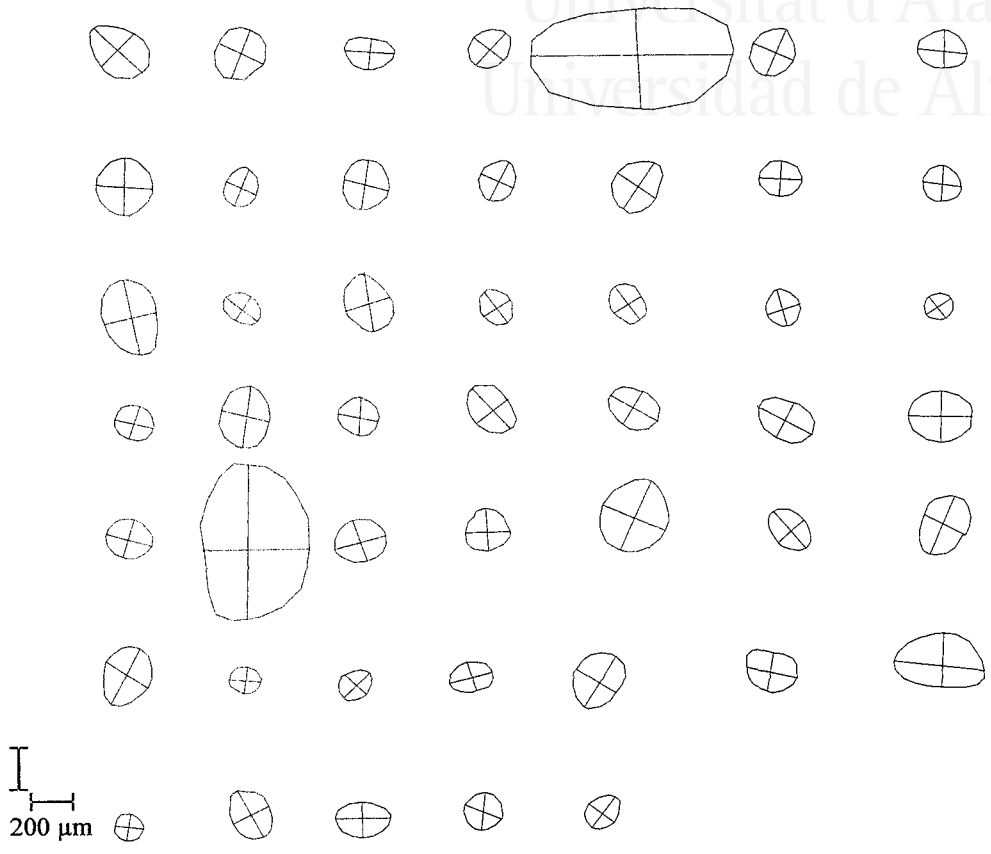


Figura 4.10. Tamaño y forma de los islotes utilizados en el experimento de las figuras 4.8 y 4.9.

4.3.3. Secreción y contenido con glucosa 3 mM y 22 mM.

Para comprobar si hay diferencia entre los islotes de un mismo ratón, a distinta concentración de glucosa, en secreción o contenido de insulina, se ha realizado la incubación de 40 islotes únicos, en dos grupos, 20 islotes con glucosa 3 mM y 20 islotes con glucosa 22 mM, y determinado la secreción de insulina inmunorreactiva (EX-IRI), el contenido de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI) y el contenido total de insulina inmunorreactiva en ácido (A-IRI), además del diámetro medio y área del islote, obteniendo los siguientes resultados:

Diámetro

3 mM G Media = 226 μm
 DS = 65 μm
 Rango (149 - 398)

22 mM G Media = 213 μm
 DS = 54 μm
 Rango (122 - 320)

Area

3 mM G Media = 40700 μm^2
 DS = 24855 μm^2
 Rango (16388 - 108964)

22 mM G Media = 35121 μm^2
 DS = 17131 μm^2
 Rango (10692 - 73571)



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

EX-IRI

3 mM G Media = 203 pg/islote/30 minutos

DS = 105 pg/islote/30 minutos

22 mM G Media = 513 pg/islote/30 minutos

DS = 154 pg/islote/30 minutos

W-IRI

3 mM G Media = 5326 pg/islote

DS = 1236 pg/islote

22 mM G Media = 5210 pg/islote

DS = 1052 pg/islote

A-IRI

3 mM G Media = 64467 pg/islote

DS = 22196 pg/islote

22 mM G Media = 61166 pg/islote

DS = 16856 pg/islote

Se observa que el tamaño medio de los islotes es ligeramente inferior en el grupo 22 mM G, lo que explica el valor ligeramente inferior de W-IRI y A-IRI a 22 mM G, pero sin diferencia significativa.

La **figura 4.11** describe la relación directa que hay entre tamaño del islote y secreción de insulina (EX-IRI), aumentando la pendiente de la regresión a concentración más alta de glucosa. Se comprueba que islotes grandes, con glucosa 3 mM, liberan más IRI que islotes pequeños con glucosa 22 mM.

Regresión lineal simple: diámetro medio vs EX-IRI

$$3 \text{ mM G} \quad r^2=0.7581, a=-115, b=1.408$$

$$22 \text{ mM G} \quad r^2=0.8264, a=-37, b=2.585$$

Regresión lineal simple: área vs EX-IRI

$$3 \text{ mM G} \quad r^2=0.7614, a=52, b=0.003697$$

$$22 \text{ mM G} \quad r^2=0.7886, a=233, b=0.007983$$

Se observa que, respecto del área del islote, la pendiente de la recta es ligeramente superior al doble y la ordenada en el origen mayor con glucosa 22 mM, pero respecto del diámetro la pendiente no llega a ser el doble aunque, la ordenada en el origen sigue siendo mayor con glucosa 22 mM.

La **figura 4.12** muestra que hay relación directa entre tamaño del islote y contenido de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI).

Regresión lineal simple: diámetro medio vs W-IRI

$$3 \text{ mM G} \quad r^2=0.8502, a=1378, b=17.496$$

$$22 \text{ mM G} \quad r^2=0.8291, a=1444, b=17.683$$

Regresión lineal simple: área vs W-IRI

$$3 \text{ mM G} \quad r^2=0.8337, a=3479, b=0.0454$$

$$22 \text{ mM G} \quad r^2=0.7912, a=3292, b=0.0546$$

No se observa diferencia entre ambos grupos de concentración de glucosa. Respecto del diámetro las dos rectas de regresión son paralelas y prácticamente coincidentes, si bien la del grupo 22 mM supera al de 3 mM, en unos 100 pg, para un diámetro de unos 200 μm . Respecto del área del islote las dos rectas de regresión lineal se cortan a un valor próximo a los 20000 μm^2 .

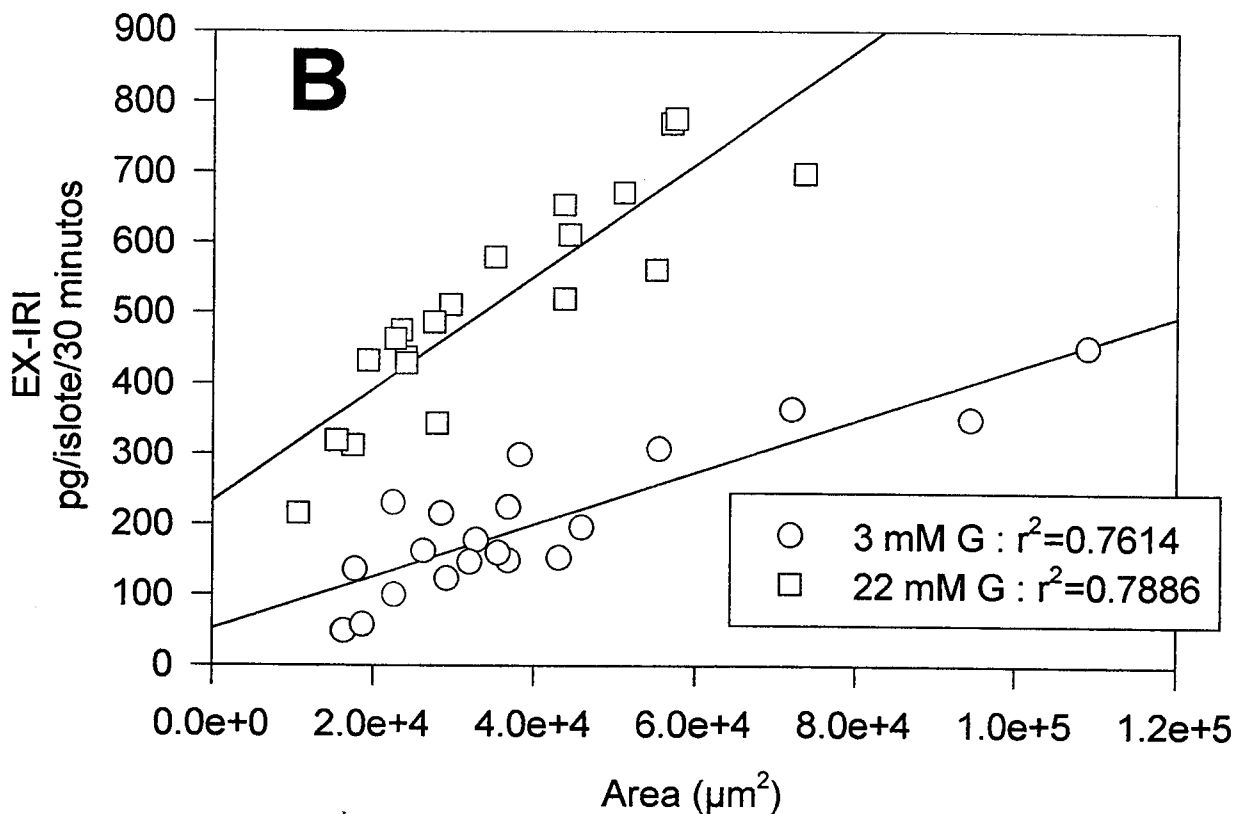
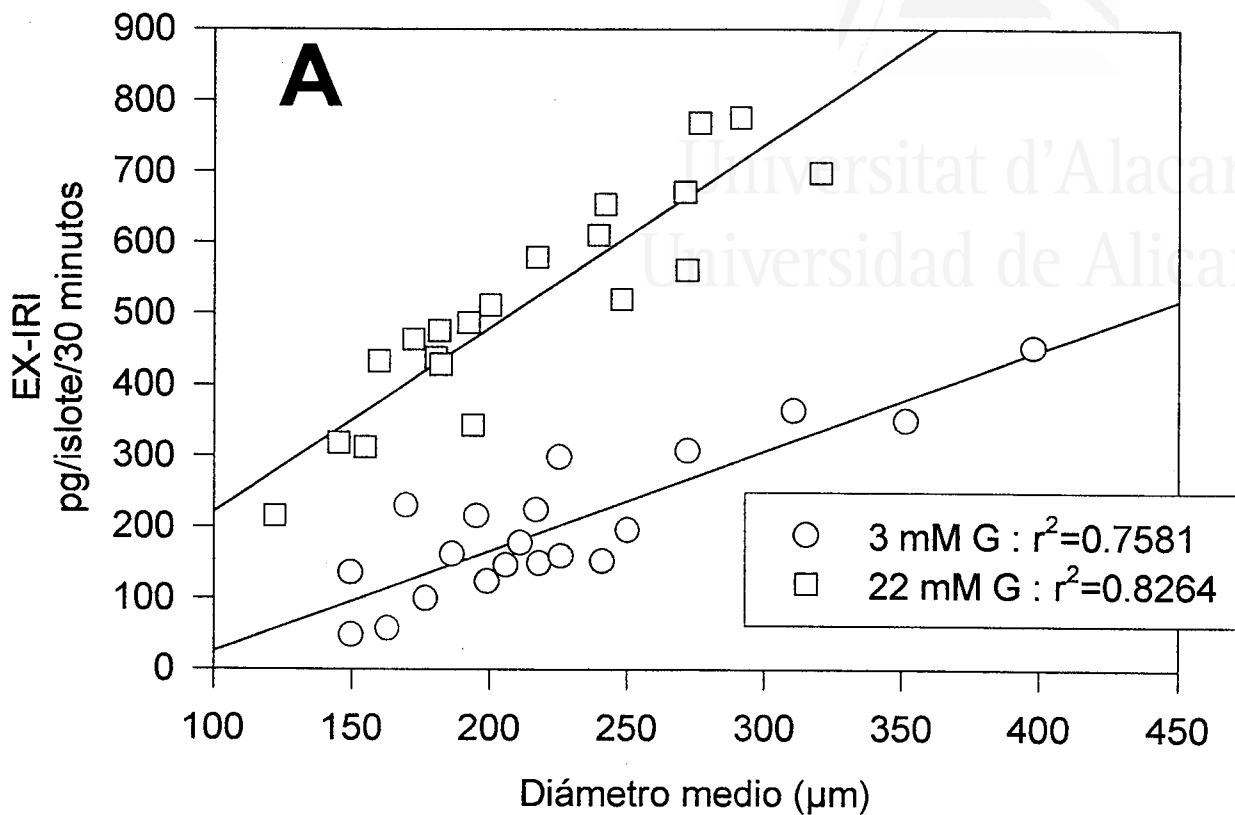
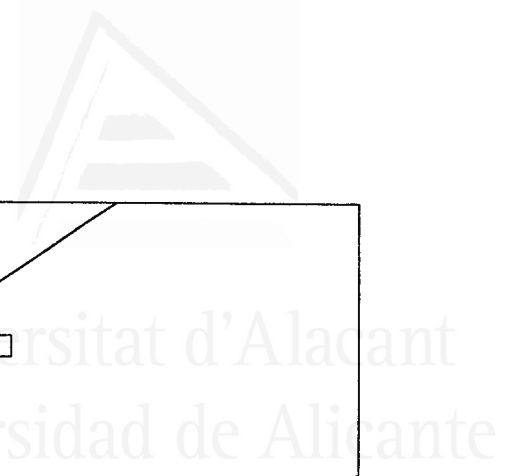


Fig.- 4.11. Secreción de insulina (EX-IRI), de islote único, inducida por glucosa 3 mM y 22 mM, en relación con el tamaño del islote.

Gráfica **A**: diámetro medio del islote; gráfica **B**: área plana del islote.

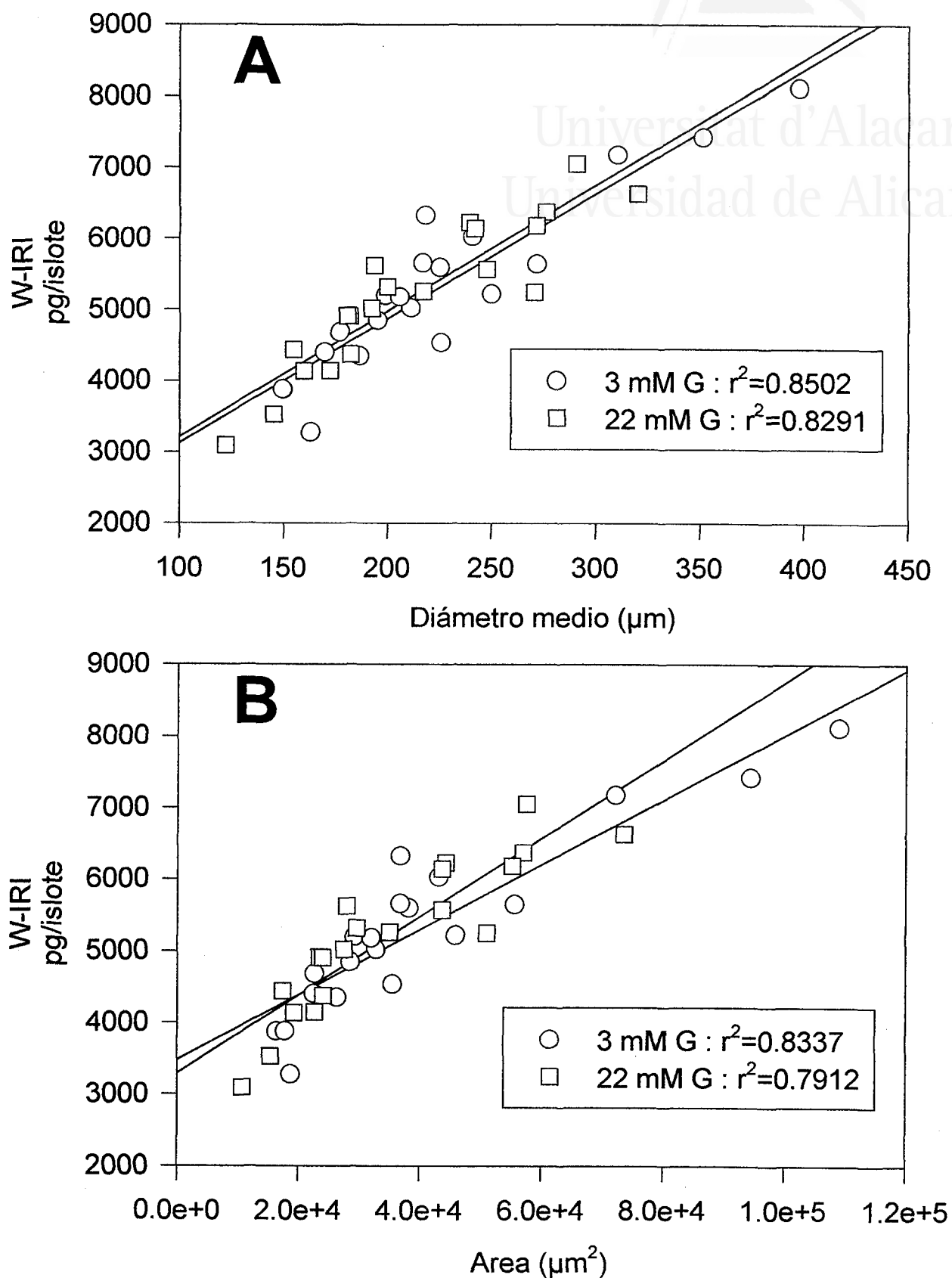


Fig.- 4.12. Contenido de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI), de islote único, en relación con el tamaño del islote, con glucosa 3 mM y 22 mM. Gráfica A: diámetro medio del islote; gráfica B: área plana del islote.

La **figura 4.13** presenta la relación directa entre tamaño del islote y contenido inicial de insulina inmunorreactiva en agua ($\text{Win-IRI} = \text{EX-IRI} + \text{W-IRI}$).

Regresión lineal simple: diámetro medio vs Win-IRI

3 mM G $r^2=0.8649$, $a=1263$, $b=18.904$

22 mM G $r^2=0.8566$, $a=1407$, $b=20.267$

Regresión lineal simple: área vs Win-IRI

3 mM G $r^2=0.8496$, $a=3531$, $b=0.0491$

22 mM G $r^2=0.8176$, $a=3524$, $b=0.0626$

Se observa que al sumar la secreción de insulina al contenido de insulina inmunorreactiva en agua, las rectas de regresión, respecto del diámetro del islote, siguen siendo prácticamente paralelas, y respecto del área del islote siguen siendo secantes, pero coincidiendo el punto de corte en el origen de coordenadas, manteniendo la pendiente mayor la del grupo 22 mM G.

Las **figuras 4.14 y 4.15** representan la relación directa entre contenido total de insulina inmunorreactiva en ácido (A-IRI y Ain-IRI).

Regresión lineal simple: diámetro medio vs A-IRI

3 mM G $r^2=0.8950$, $a=-8306$, $b=322.457$

22 mM G $r^2=0.8911$, $a=-1394$, $b=293.762$

Regresión lineal simple: área vs A-IRI

3 mM G $r^2=0.8828$, $a=30318$, $b=0.8390$

22 mM G $r^2=0.8736$, $a=28867$, $b=0.9197$

La recta de regresión del área del islote frente al contenido de insulina inmunorreactiva en ácido muestra una pendiente próxima a la unidad, lo que nos permite equiparar estudios de secreción respecto del área del islote como respecto del contenido de insulina, siempre que no se altere el contenido de insulina en las condiciones experimentales.

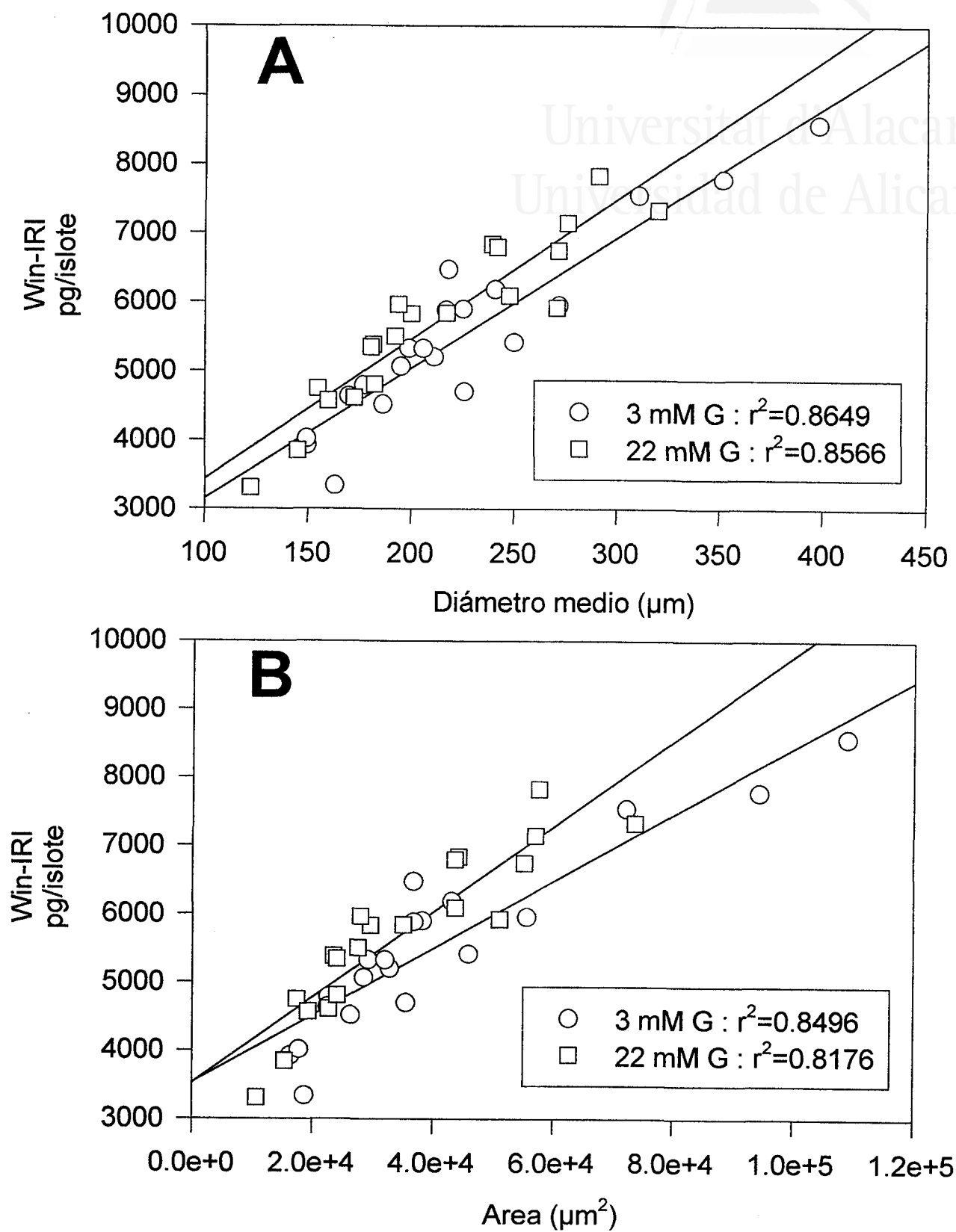


Fig.- 4.13. Contenido de insulina inmunorreactiva en agua (Win-IRI=EX-IRI+W-IRI), de islote único, en relación con el tamaño del islote, con glucosa 3 mM y 22 mM. Gráfica A: diámetro medio del islote; gráfica B: área plana del islote.

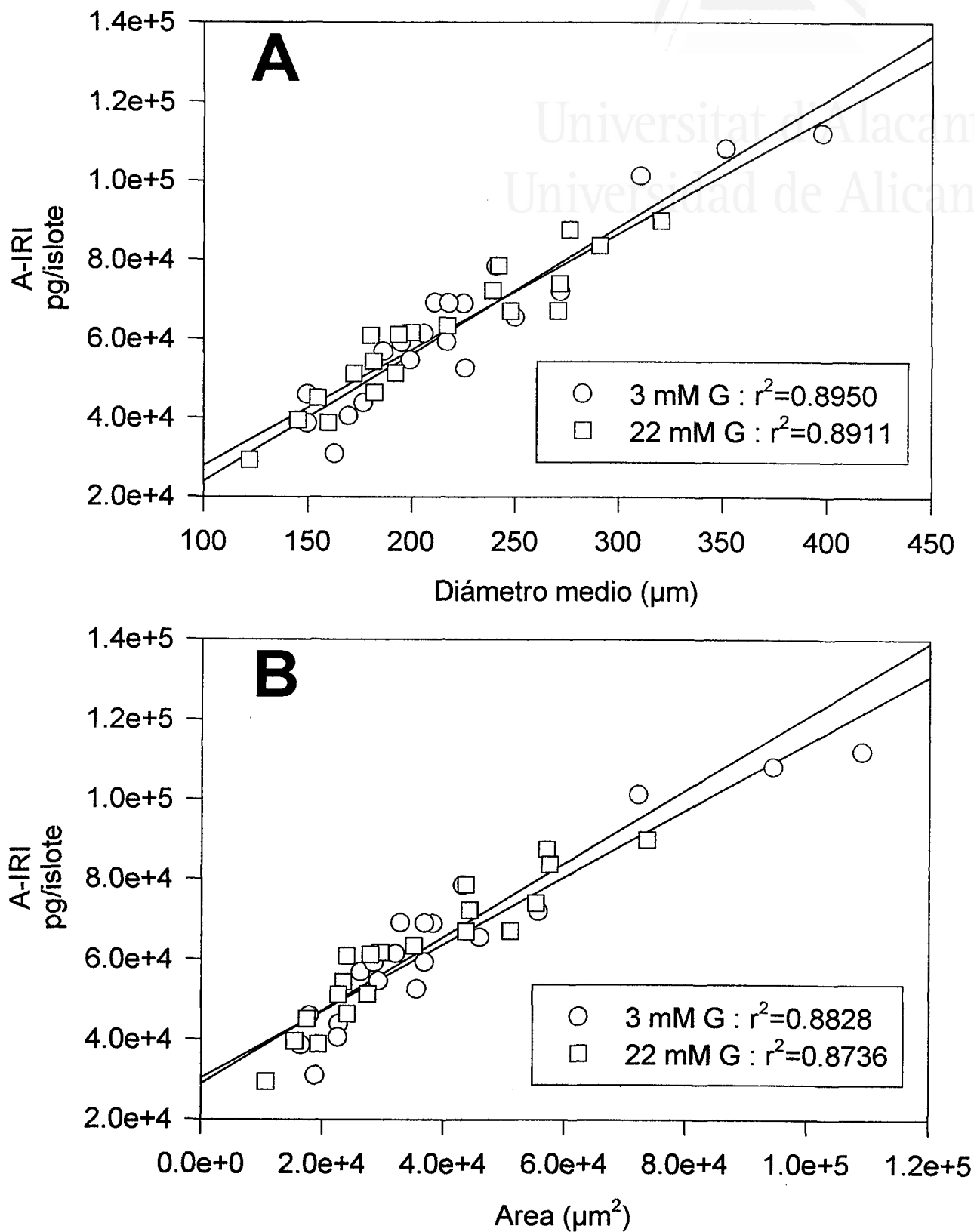


Fig.- 4.14. Contenido total de insulina inmunorreactiva en ácido (A-IRI), de islote único, en relación con el tamaño del islote, con glucosa 3 mM y 22 mM. Gráfica A: diámetro medio del islote; gráfica B: área plana del islote.

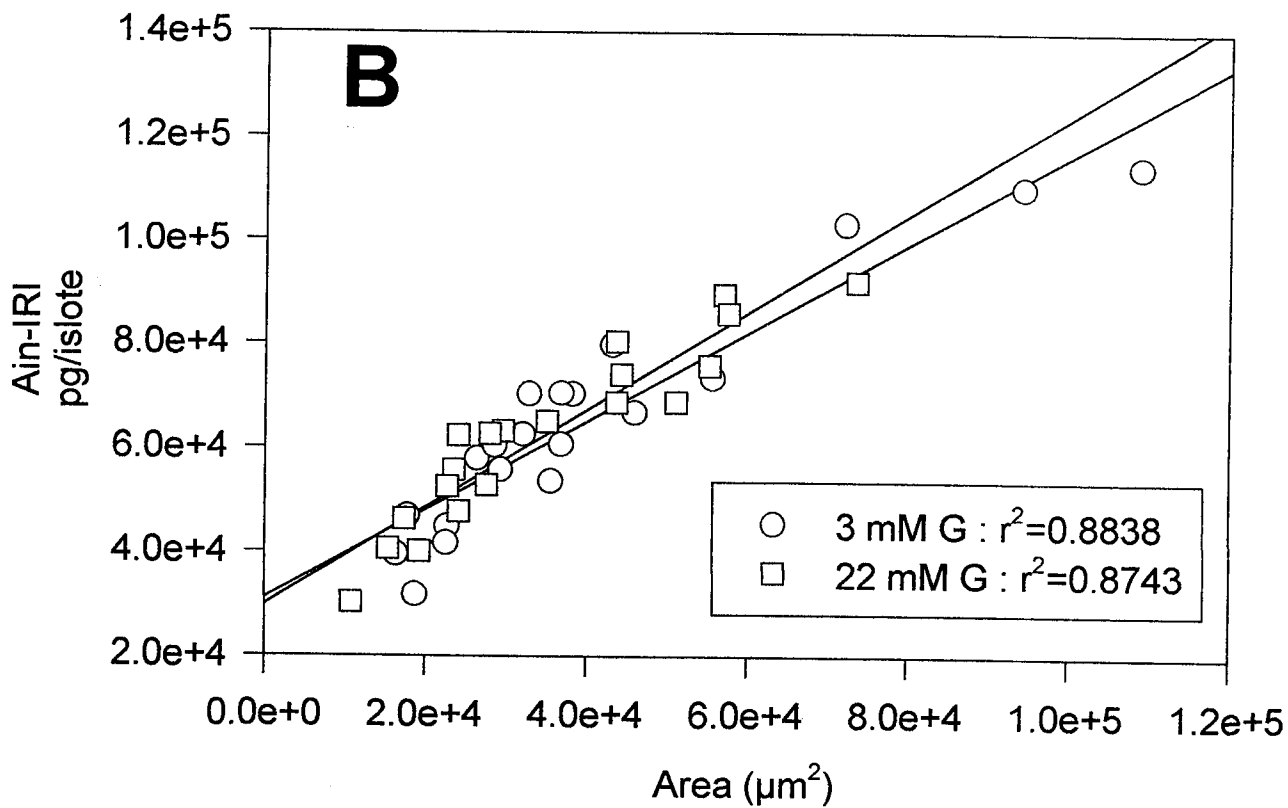
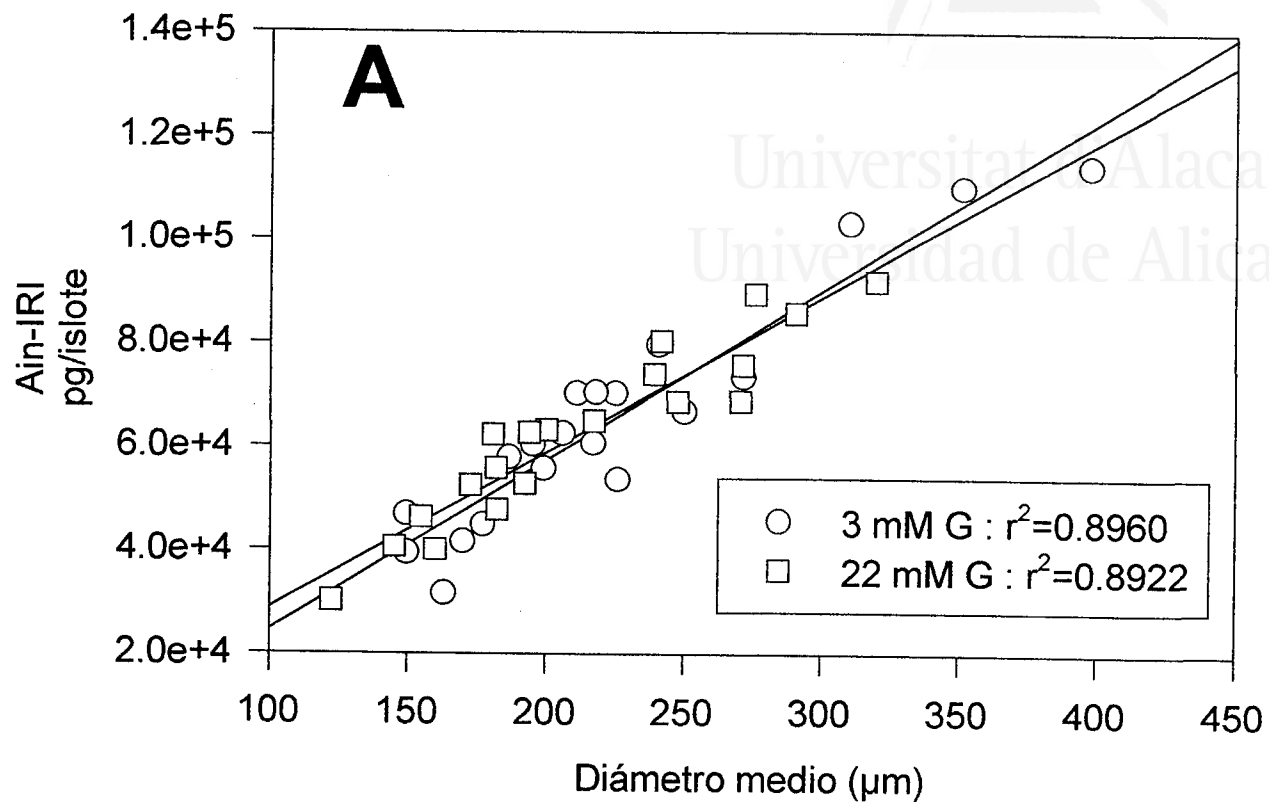


Fig.- 4.15. Contenido total inicial de insulina inmunorreactiva en ácido (A-IRI), de islote único, en relación con el tamaño del islote, con glucosa 3 mM y 22 mM. Gráfica A: diámetro medio del islote; gráfica B: área plana del islote.

La **figura 4.16** muestra la recta de regresión lineal simple entre contenido total de insulina del islote (Ain-IRI) y la secreción, a las dos concentraciones de glucosa.

Regresión lineal simple: Ain-IRI vs EX-IRI

3 mM G $r^2=0.7193$, $a=-58$, $b=0.00397$

22 mM G $r^2=0.8102$, $a=7$, $b=0.00806$

Representando la secreción de insulina (EX-IRI) respecto del contenido de insulina inmunorreactiva en medio ácido (A-IRI) se observa que las pendientes de ambas rectas de regresión coinciden con las de las rectas de regresión de área del islote frente secreción de insulina, lo que se explica debido a que la pendiente de la recta de regresión del área del islote frente al contenido de insulina es aproximadamente la unidad. La pendiente de la recta del grupo 22 mM es el doble de la pendiente del grupo 3 mM.

La **figura 4.17** presenta la recta de regresión lineal simple entre contenido total de insulina del islote (Ain-IRI) y cantidad de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI).

Regresión lineal simple: Ain-IRI vs W-IRI

3 mM G $r^2=0.9134$, $a=1879$, $b=0.0524$

22 mM G $r^2=0.9187$, $a=1532$, $b=0.0586$

Se observa un alto coeficiente de regresión en ambos grupos. Las rectas se cortan lo mismo que cuando se representa el área del islote frente a W-IRI, la pendiente sigue siendo ligeramente superior en el grupo 22 mM, pero sin diferencia significativa. Los islotes pequeños con un contenido de 40 ng/islote contienen un 9.8% de W-IRI, pero en los islotes grandes con 100 ng de insulina total hay un 7.2% de W-IRI, que sensiblemente inferior.

La **figura 4.18** muestra la recta de regresión lineal simple entre contenido total de insulina del islote (Ain-IRI) y cantidad de insulina inmunorreactiva en agua inicial (Win-IRI).

Regresión lineal simple: Ain-IRI vs Win-IRI

3 mM G $r^2=0.9209$, $a=1821$, $b=0.0564$

22 mM G $r^2=0.9350$, $a=1540$, $b=0.0667$



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

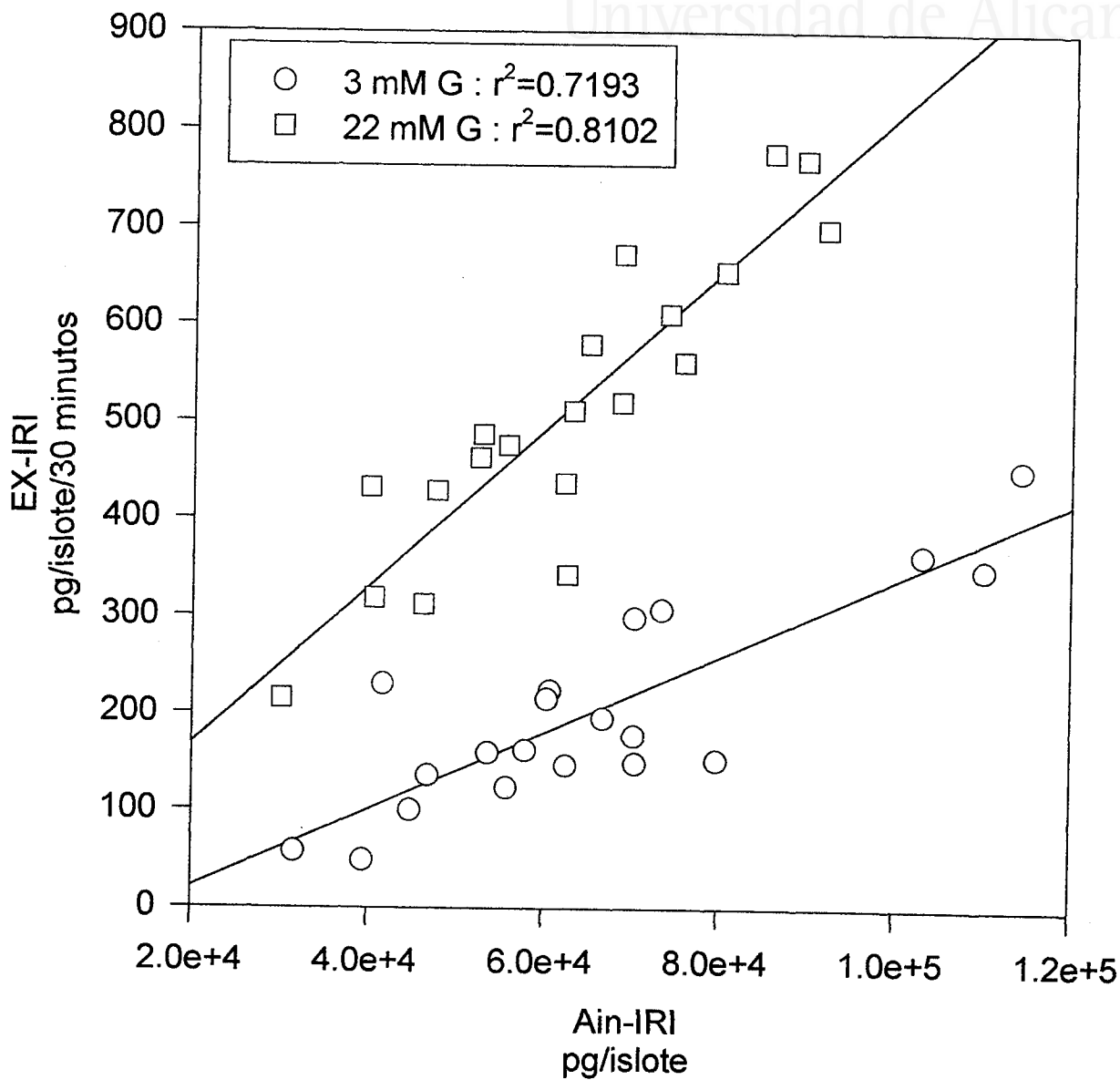


Fig.- 4.16. Regresión lineal simple entre contenido total de insulina (A-IRI) y secreción de insulina (EX-IRI) de islote único, con glucosa 3 mM y 22 mM.



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

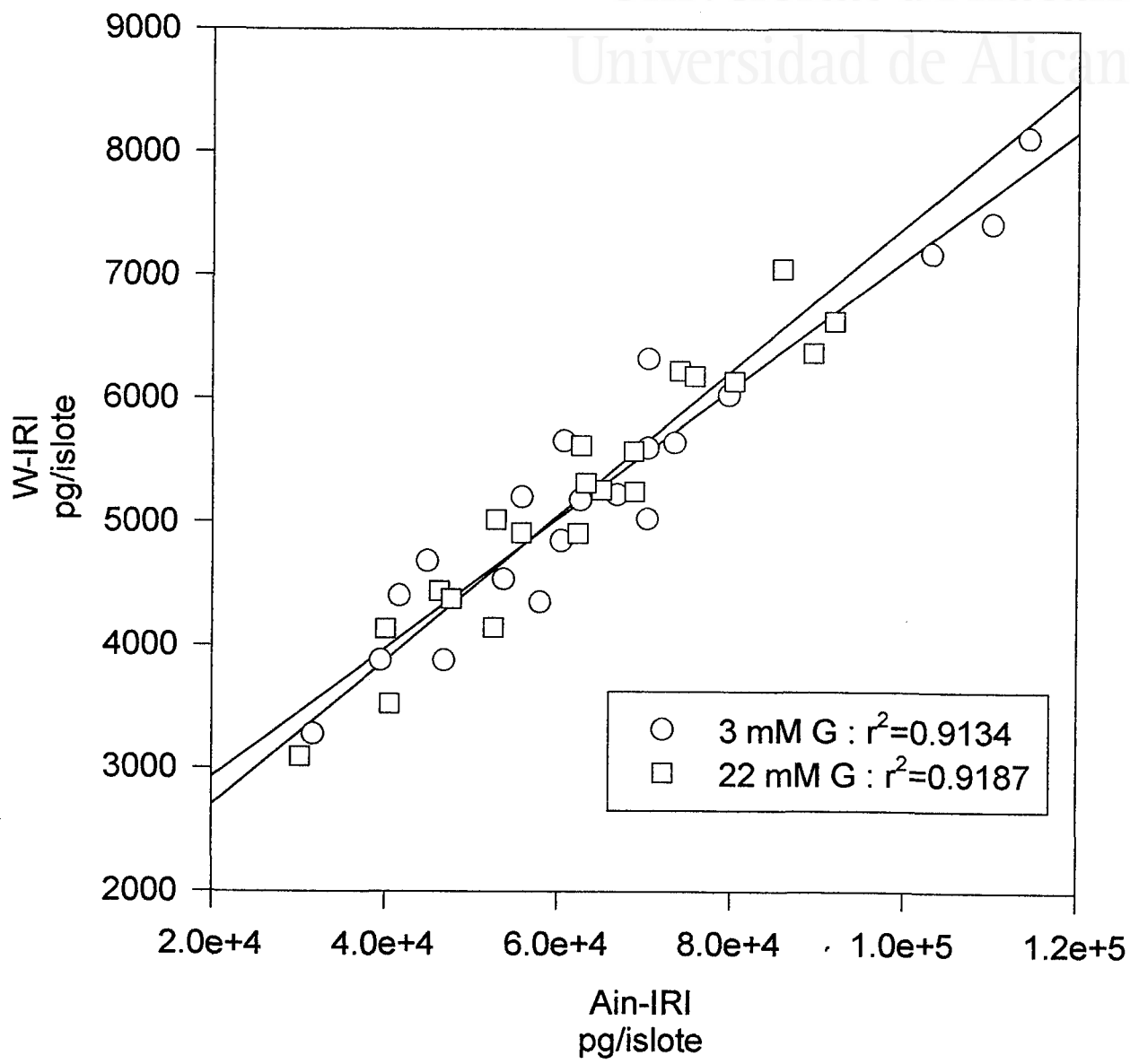


Fig.- 4.17. Regresión lineal simple entre contenido total de insulina (A-IRI) y contenido de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI) de islote único, con glucosa 3 mM y 22 mM.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

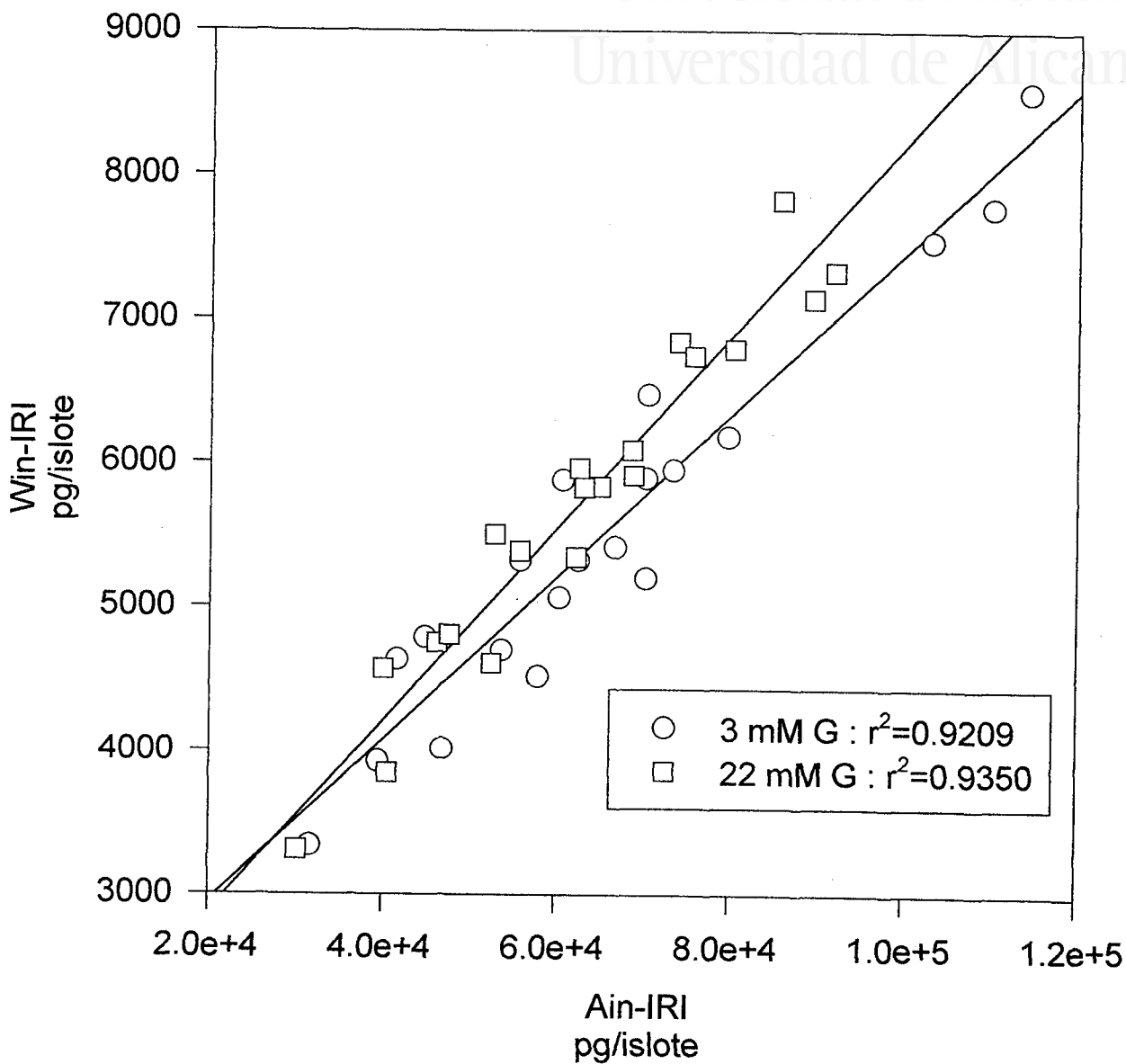
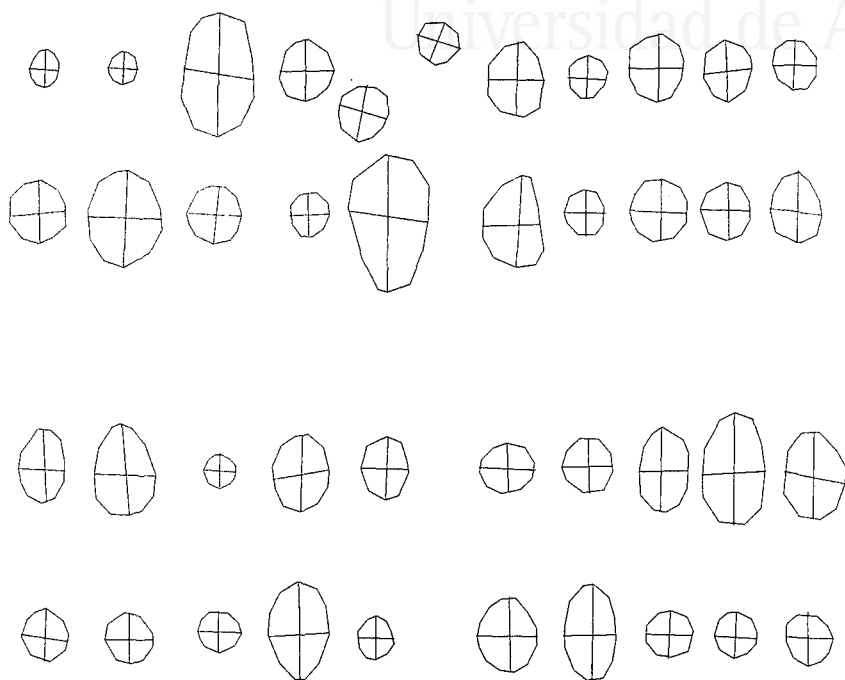


Fig.- 4.18. Regresión lineal simple entre contenido total de insulina (A-IRI) y contenido inicial de insulina inmunorreactiva en agua (Win-IRI), de islote único, con glucosa 3 mM y 22 mM.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



200 μm

Figura 4.19. Tamaño y forma de los islotes utilizados en el experimento de las figuras 4.11 a 4.18.

El coeficiente de regresión aumenta ligeramente al sumar la secreción de insulina al contenido W-IRI. Ambas rectas se cortan, siendo mayor la pendiente del grupo 22 mM; y respecto del contenido total medio de insulina de todos los islotes, la diferencia de Win-IRI es significativa ($p < 0.05$).

La **figura 4.19** representa el tamaño y forma de los islotes utilizados en el experimento de las **figuras 4.11 a 4.18**.

4.4. Determinación mediante RIA inespecífico de las distintas insulinas inmunorreactivas contenidas en el islote

Según se describe en materiales y métodos, para determinar el contenido de insulina del islote, se rompe mediante ultrasonidos el islote en 2 ml de agua y se cuantifica el contenido de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI) y, mediante acidificación, el contenido de insulina inmunorreactiva en ácido (A-IRI). La proinsulina en el islote se encuentra soluble y libre como monómero, y es cuantificada por RIA inespecífico como insulina, pero la insulina se encuentra en forma de hexámero, coordinada con Zn^{2+} (Hill *et al.*, 1991) (Bryant *et al.*, 1993) (Bently *et al.*, 1992), que por impedimento estérico no debe unirse al anticuerpo antiinsulina del RIA hasta que se rompa la unión Zn^{2+} -insulina mediante ácido.

La **figura 4.20a** corresponde al estudio de 333 islotes de diferentes ratones, indicando la regresión de orden 2, con los límites de 95% de confianza de la media y 95% de predicción, de la relación que existe entre A-IRI y W-IRI (gráfico A) con $r^2=0.7409$, y de la relación entre A-IRI y la fracción de insulina inmunorreactiva en agua (100 W-IRI/A-IRI) (gráfico B) con $r^2=0.0919$ y un valor medio de 10.05% , muy próximo a la razón proinsulina/insulina total encontrada en rata, que alcanza un valor del 11.5% (Leahy, 1993).

La **figura 4.20b** se refiere a los mismos datos de la **figura 4.20a**, pero indicando las líneas de regresión correspondientes a cada ratón.

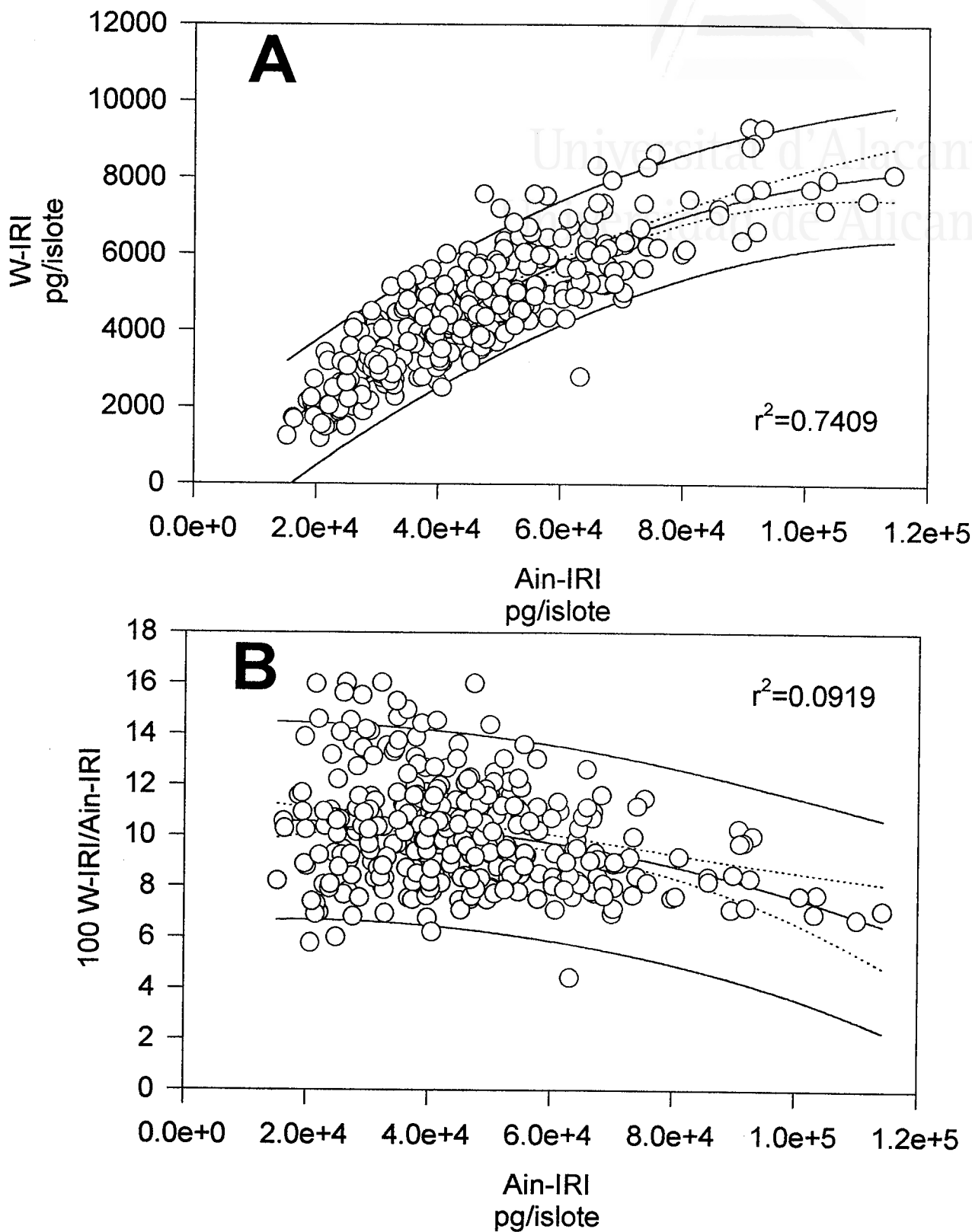


Fig.- 4.20a. Relación entre contenido total de insulina (A-IRI), de islote único, y contenido de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI) (gráfica A), y entre la fracción de insulina inmunorreactiva en agua (100 W-IRI/Ain-IRI) (gráfica B). Se indican los límites del 95% de confianza de la media y del 95% de predicción.

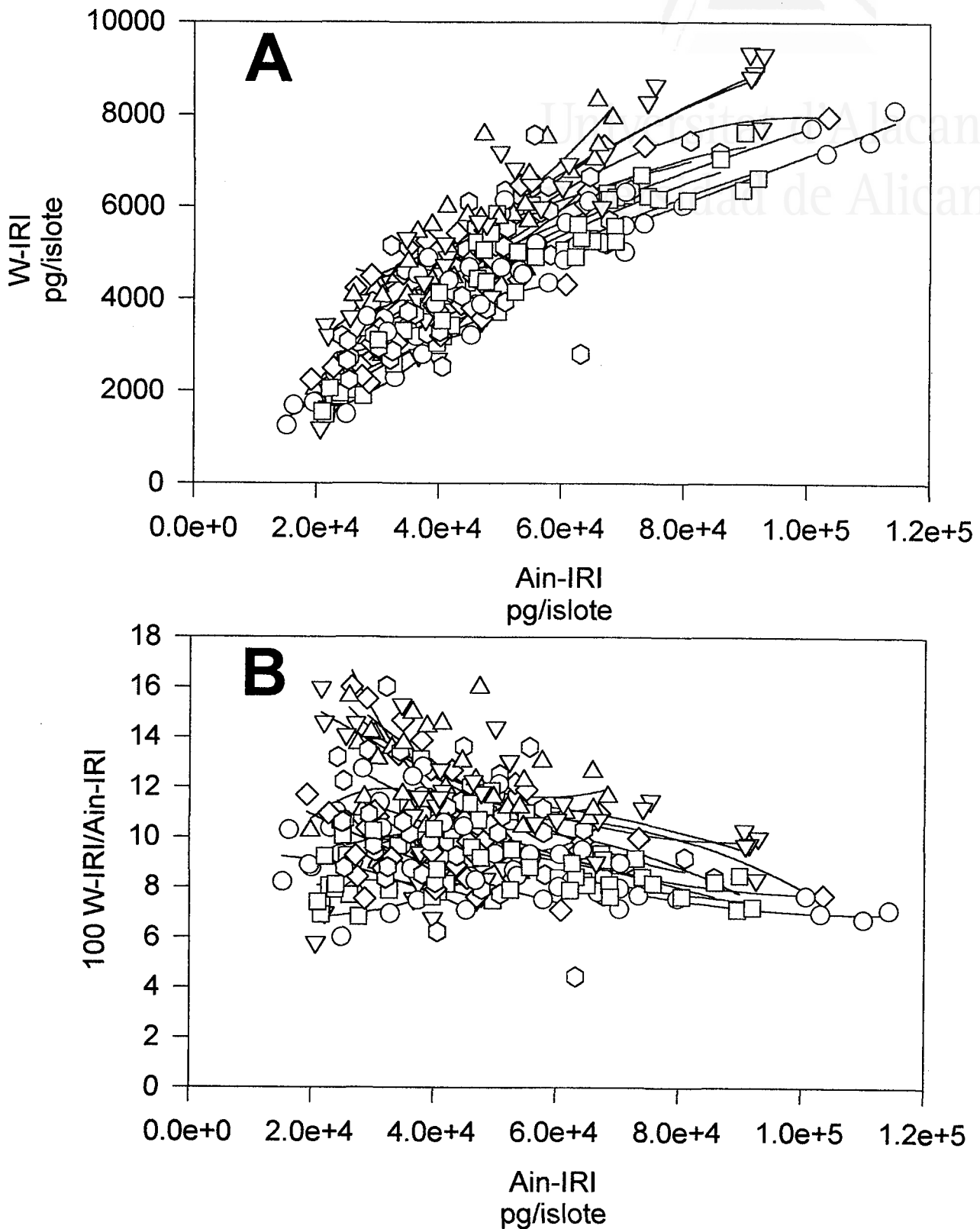


Fig.- 4.20b. Relación del contenido total de insulina (A-IRI), de islote único, con el contenido de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI) (gráfica A), y con la fracción de insulina inmunorreactiva en agua (100 W-IRI/A-IRI) (gráfica B). Se indican las líneas de regresión correspondientes a los islotes de cada ratón.

4.5. La albúmina (BSA) no es necesaria en el medio de incubación para estimular la secreción de insulina con glucosa

Para comprobar si la albúmina es necesaria, en el medio de incubación, para inducir con glucosa la secreción de IRI, se han estudiado 30 islotes únicos con glucosa 22 mM, en presencia y en ausencia de BSA. La preincubación se ha realizado en medio KRB 5 mM G, sin BSA, durante 90 minutos, después de eliminar la BSA del medio de aislamiento, con varios lavados en dicho medio KRB. Los islotes se han repartido en tres grupos de 10 islotes denominados:

Con BSA: medio KRB-BSA 22 mM G.

Sin BSA: medio KRB 22 mM G, sin BSA.

BSA Post: medio KRB 22 mM G, sin BSA. En este método se añade BSA, después de la incubación y de haber sacado el islote, a la misma concentración que en el control con BSA (7.5 g/l).

En la **figura 4.21** se observa que en el grupo Sin BSA hay una secreción muy escasa de IRI, en cambio el grupo BSA Post, incubado igual que el grupo Sin BSA, no muestra diferencia significativa con el grupo control Con BSA.

4.6. El contenido de IRI total se puede determinar en presencia de BSA, sin ácido.

Se determinó el contenido total de IRI de los islotes del experimento de la **figura 4.21**, añadiendo ácido a la mitad de los islotes de cada grupo, como se describe en materiales y métodos, y BSA 30 g/l a la otra mitad de los islotes, utilizando los mismos volúmenes en ambos métodos.

La **figura 4.22** muestra que no hay diferencia significativa entre el contenido total de IRI determinado en presencia de albúmina (barras BSA) y el contenido total determinado con ácido (barra HCl) del grupo incubado Sin BSA.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

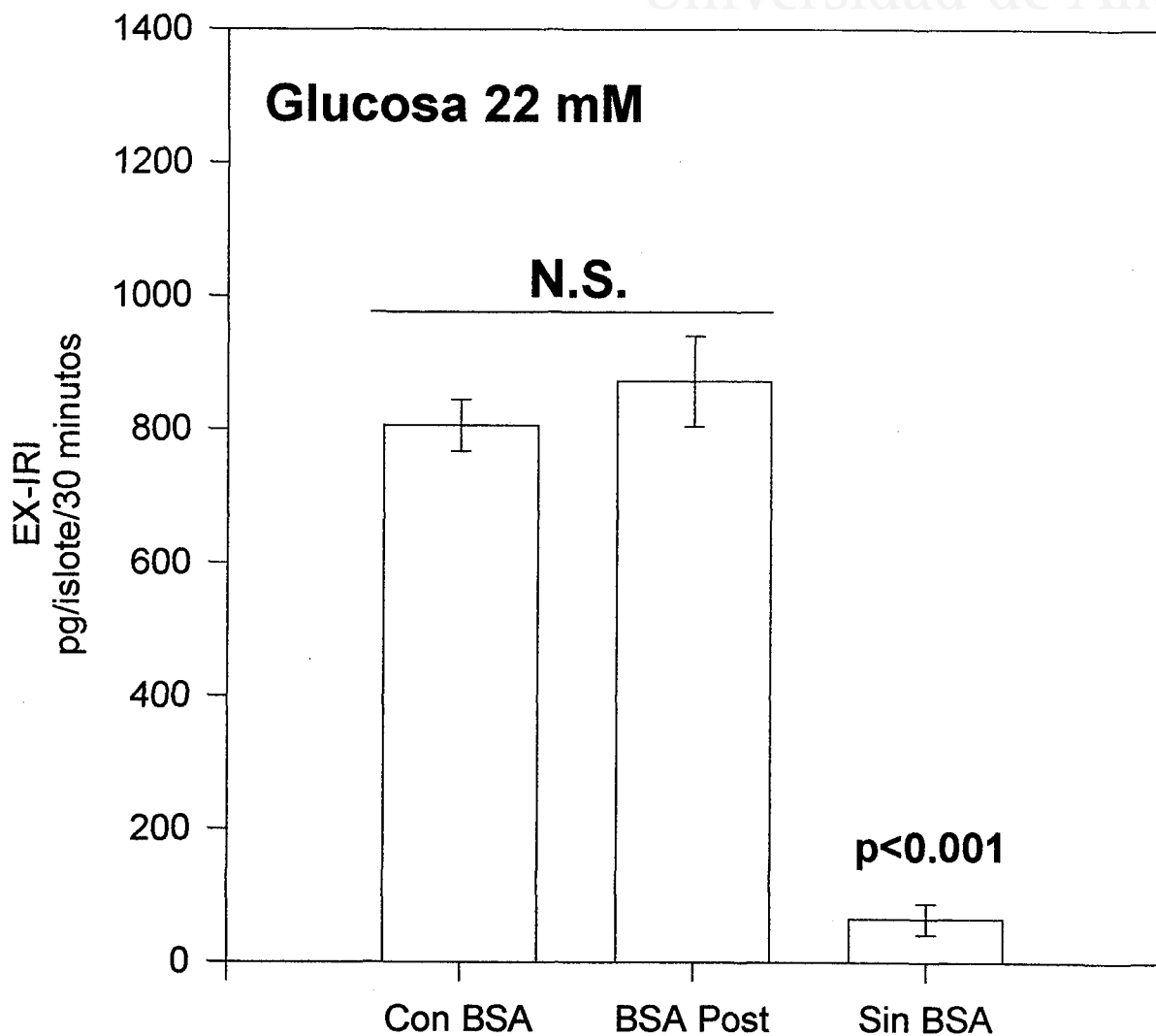


Fig. 4.21.- Secreción media de insulina inmunoreactiva (EX-IRI), de islote único, con Glucosa 22 mM. Preincubación 5 mM G, sin BSA, 90 minutos. Con BSA: KRB-BSA. BSA Post: KRB. BSA añadida después de incubación, sin islote. Sin BSA: KRB.



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

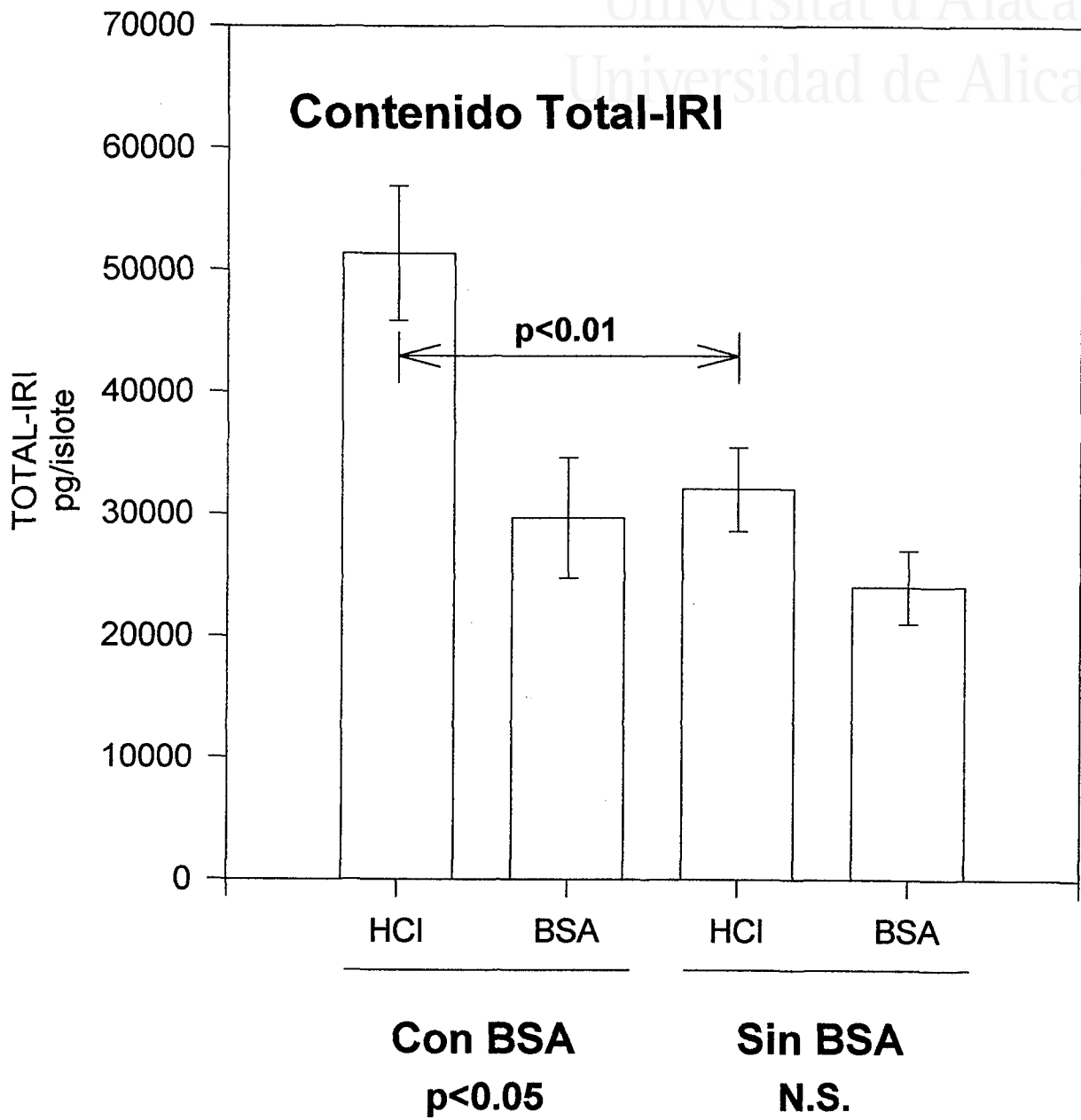


Fig. 4.22.- Contenido total de insulina inmunorreactiva de islotes únicos, incubados con Glucosa 22 mM, en presencia de BSA (**Con BSA**) y sin BSA (**Sin BSA**) en el medio de incubación, añadiendo ácido (HCl) o albúmina (BSA) al agua en que se ha roto el islote



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

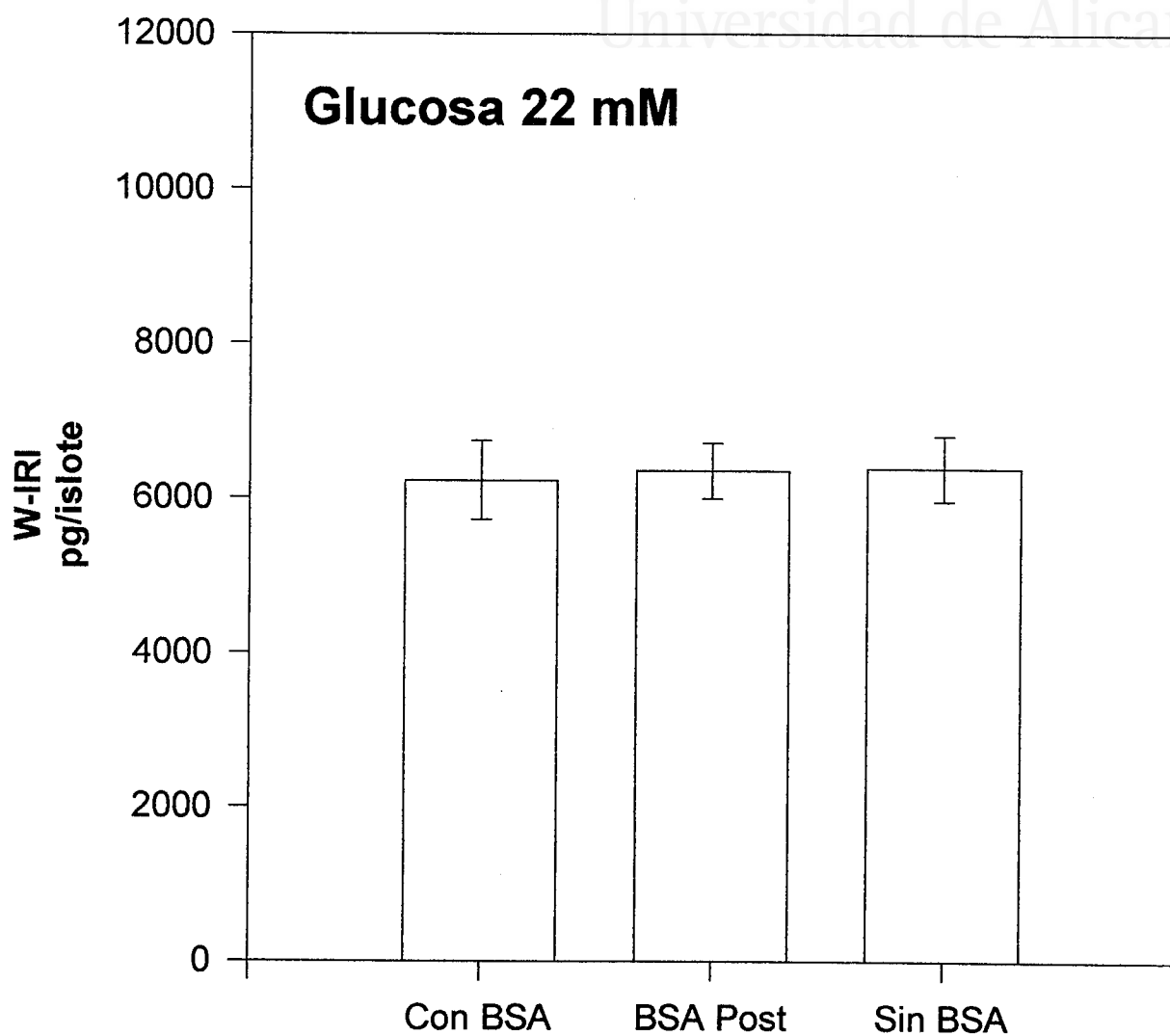


Fig. 4.23.- Contenido de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI), de islote único, con Glucosa 22 mM. Preincubación 5 mM G, sin BSA, 90 minutos.
Con BSA: KRB-BSA.
BSA Post: KRB. BSA añadida después de incubación, sin islote.
Sin BSA: KRB.

4.7. La albúmina (BSA) en el medio de incubación aumenta el contenido de insulina inmunorreactiva en ácido (A-IRI), pero no el contenido de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI)

La **figura 4.23** indica el contenido de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI), de los islotes utilizados en el experimento de la **figura 4.21**, observándose que no hay diferencia en los tres grupos, en cambio, como se observa en la **figura 4.22** hay diferencia significativa en la insulina inmunorreactiva en ácido (barras HCl) entre los islotes incubados Con BSA y Sin BSA. La IRI determinada en presencia de BSA también presenta diferencia, en el mismo sentido, pero no es significativa.

4.8. La secreción de insulina, inducida por K^+ 50 mM o por glucosa y potenciada por IBMX, se relacionan con la insulina inmunorreactiva en agua

La metilxantina (IBMX) es un inhibidor de la fosfodiesterasa, enzima que convierte el cAMP en AMP de forma irreversible, por lo tanto el efecto de la metilxantina es elevar los niveles de cAMP en la célula, el cual es un potenciador de la secreción de insulina.

Cada experimento consta de dos grupos, de 15 islotes cada uno, incubados cada uno por separado a la misma concentración de glucosa, con IBMX a concentración saturada, en uno de los grupos.

Como se observa en las **figuras 4.24** (5.5 mM G), **4.25** (11 mM G), **4.26** (14 mM G) y **4.27** (22 mM G), el aumento en la secreción de insulina inmunorreactiva (EX-IRI), provocado por IBMX, se corresponde con la disminución en la insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI), sin encontrar diferencia significativa en la suma de ambos (EX-IRI+W-IRI=Win-IRI).

En el experimento de la **figura 4.26** la preincubación se realizó durante 2.5 horas y con glucosa 22 mM, y se observa que la fracción de contenido de insulina inmunorreactiva en agua (100 W-IRI/A-IRI) es considerablemente inferior (~4%) que en otros experimentos (~10%), lo que está de acuerdo con lo observado en el experimento de la **figura 4.22**, es decir un mayor tiempo de exposición con BSA y glucosa 22 mM aumenta el contenido de insulina inmunorreactiva en ácido (A-IRI) sin afectar la W-IRI.



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

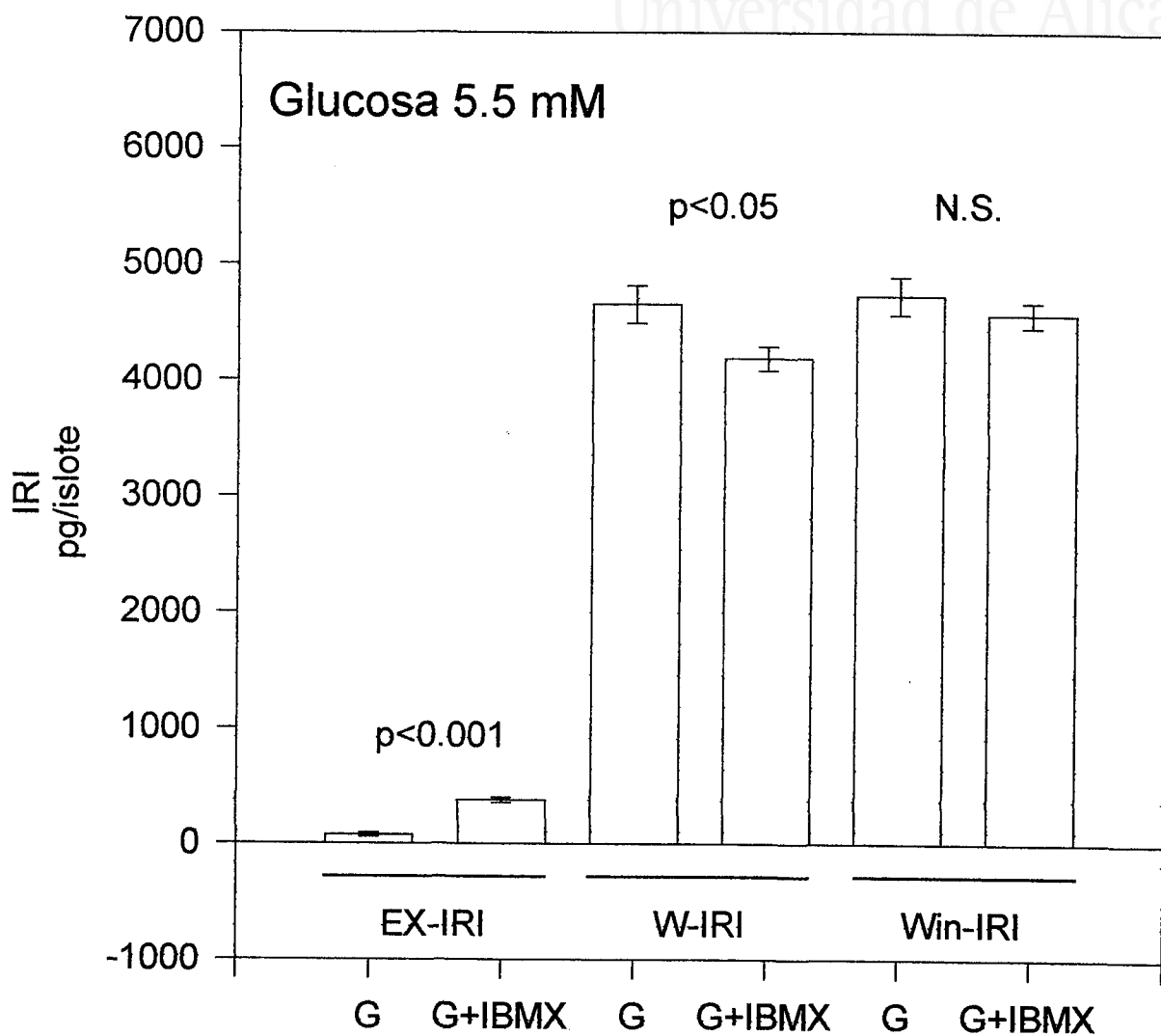


Fig.- 4.24. El aumento de la secreción de insulina (EX-IRI), potenciado por IBMX, con 5.5 mM G, se corresponde con la disminución del contenido de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI).

Win-IRI = W-IRI + EX-IRI.

A-IRI = 46933 ± 2480 pg/islote.



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

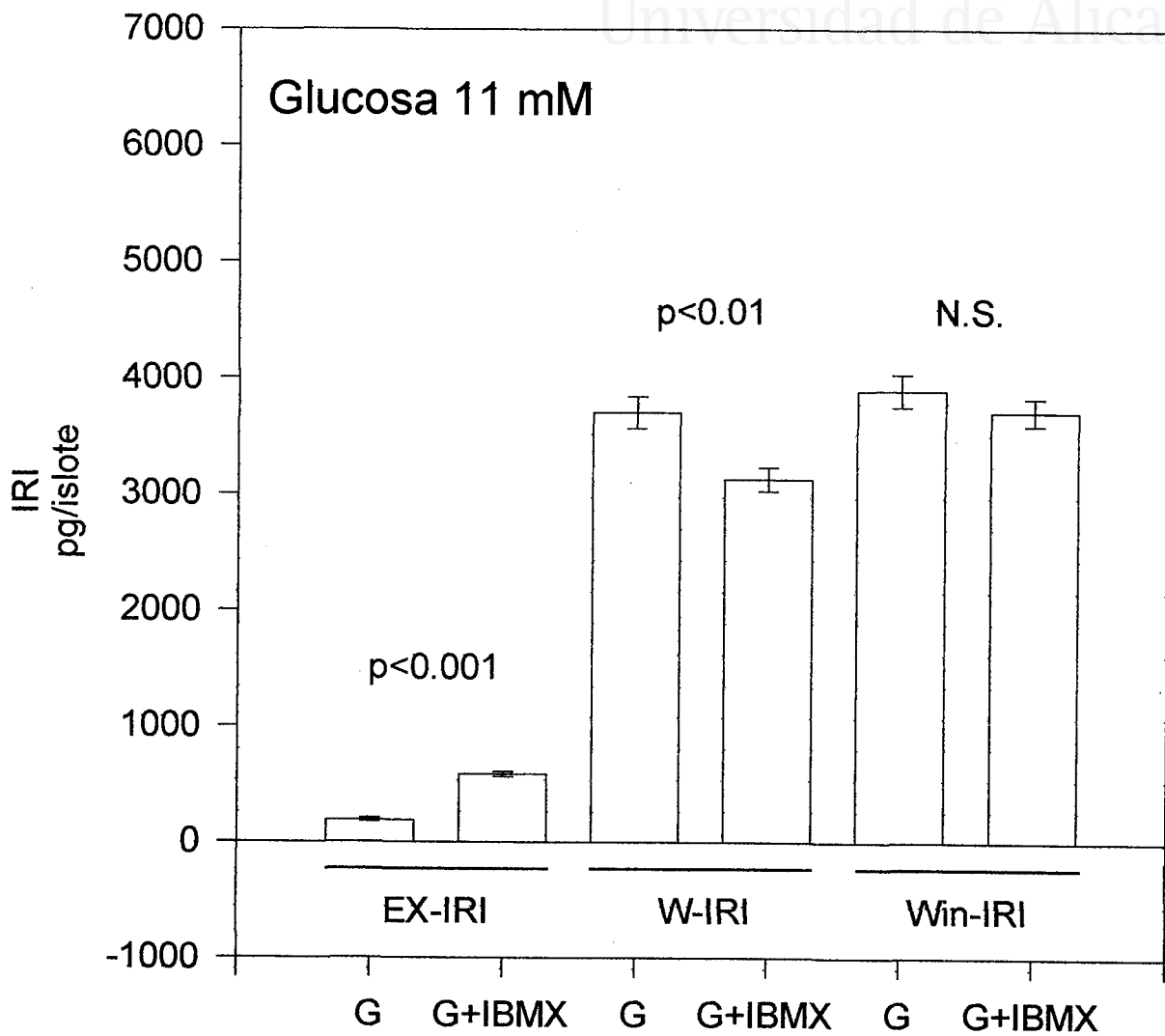


Fig.- 4.25. El aumento de la secreción de insulina (EX-IRI), potenciado por IBMX, con 11 mM G, se corresponde con la disminución del contenido de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI).
 Win-IRI = W-IRI + EX-IRI.
 A-IRI = 31957 ± 1205 pg/islote.



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

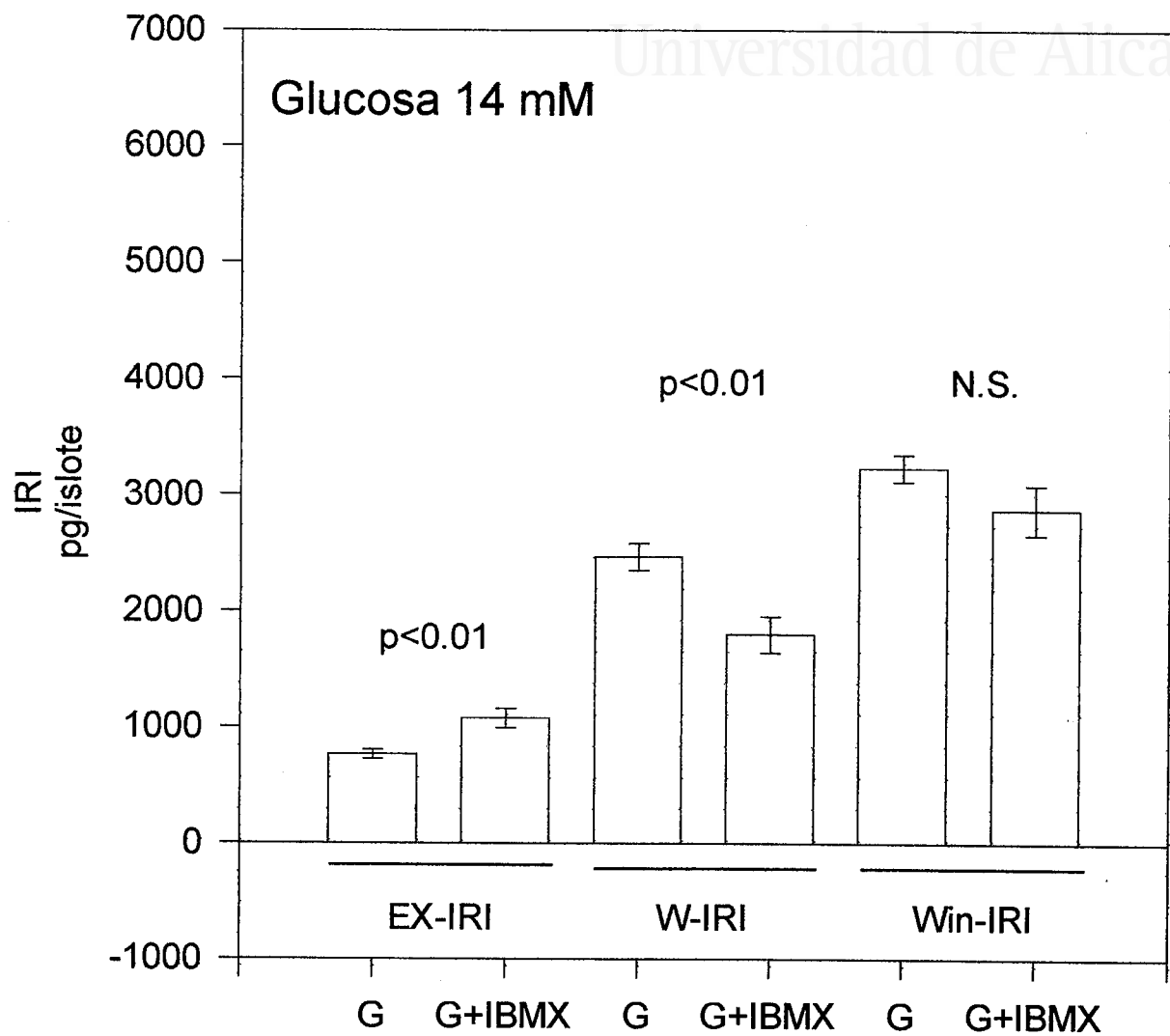


Fig.- 4.26. El aumento de la secreción de insulina (EX-IRI), potenciado por IBMX, con 14 mM G, se corresponde con la disminución del contenido de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI).

Win-IRI = W-IRI + EX-IRI.

A-IRI = 50853 ± 2491 pg/islote.



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

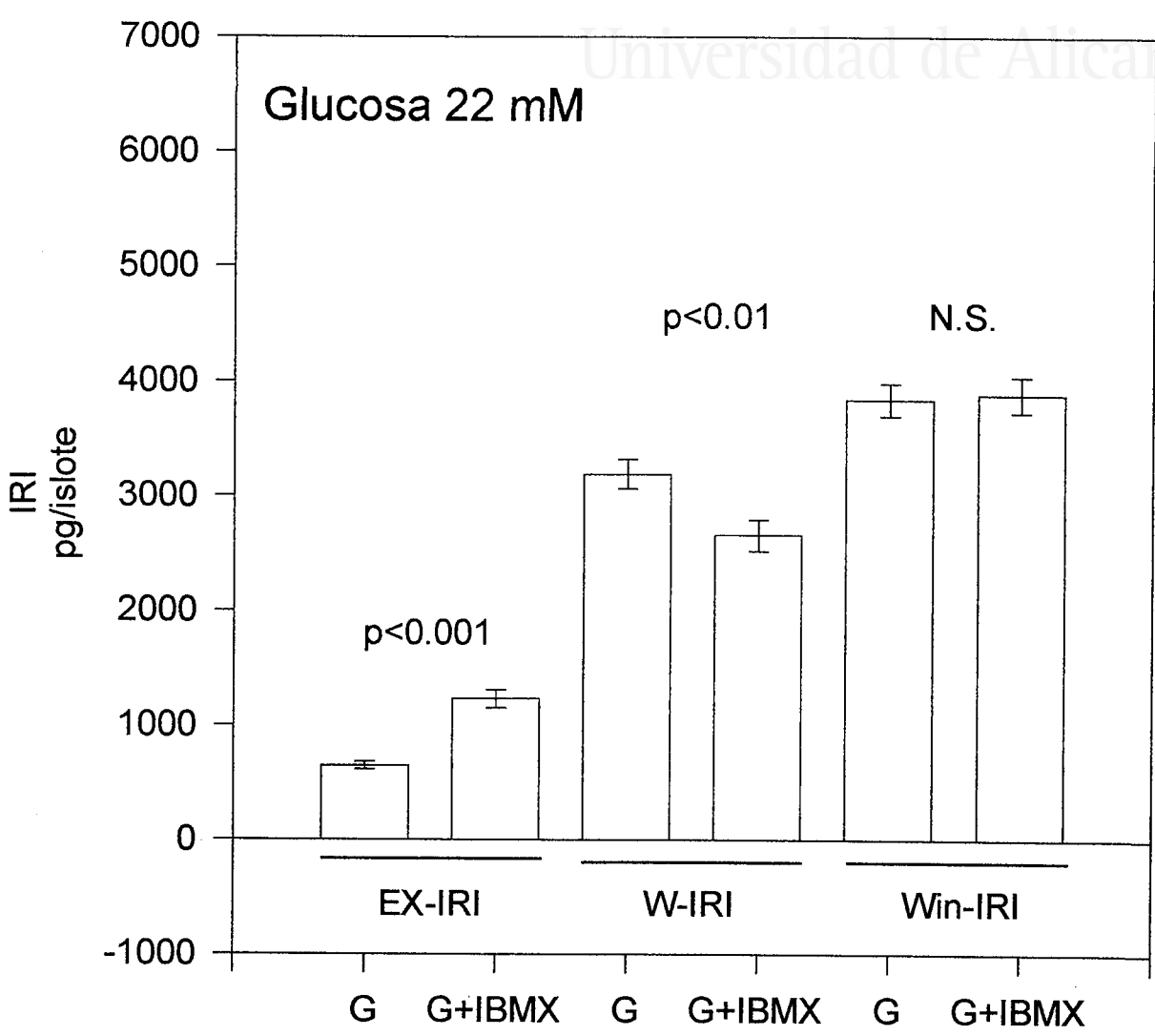


Fig.- 4.27. El aumento de la secreción de insulina (EX-IRI), potenciado por IBMX, con 22 mM G, se corresponde con la disminución del contenido de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI).
 Win-IRI = W-IRI + EX-IRI.
 A-IRI= 38014 ± 2559 pg/islote.

La **figura 4.28** presenta los resultados de la incubación de 40 islotes únicos, en presencia de glucosa 3 mM, en dos grupos (n=20): uno con K^+ 5 mM y otro con K^+ 50 mM. La secreción (EX-IRI) aumenta con K^+ 50 mM y se relaciona con la W-IRI, que disminuye en la misma cantidad, en los 30 minutos de incubación.

En la **figura 4.29** se muestran los resultados de otro experimento como el anterior (n=15 en cada grupo), pero incubados durante 60 minutos. El aumento de secreción ya no se corresponde con la disminución de la insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI), lo que puede indicar que dicha fracción se repone lentamente.

4.9. La adrenalina inhibe la secreción de insulina y actúa sobre la insulina inmunorreactiva en agua

La **figura 4.30** indica que la presencia diazóxido 100 μ M inhibe la secreción inducida con glucosa 22 mM, pero no se observa diferencia significativa en W-IRI, aunque la secreción sin diazóxido se corresponde con la disminución de W-IRI.

En la **figura 4.31** se observa que la adrenalina 1 mM inhibe la secreción (EX-IRI) inducida con glucosa 22 mM, y la W-IRI disminuye ligeramente, sin diferencia significativa, tal vez debido al reducido contenido de A-IRI (28 ng/islote), pero en la **figura 4.32** se comprueba que la secreción se inhibe con adrenalina y el contenido de W-IRI se reduce, respecto del control con glucosa 22 mM.



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

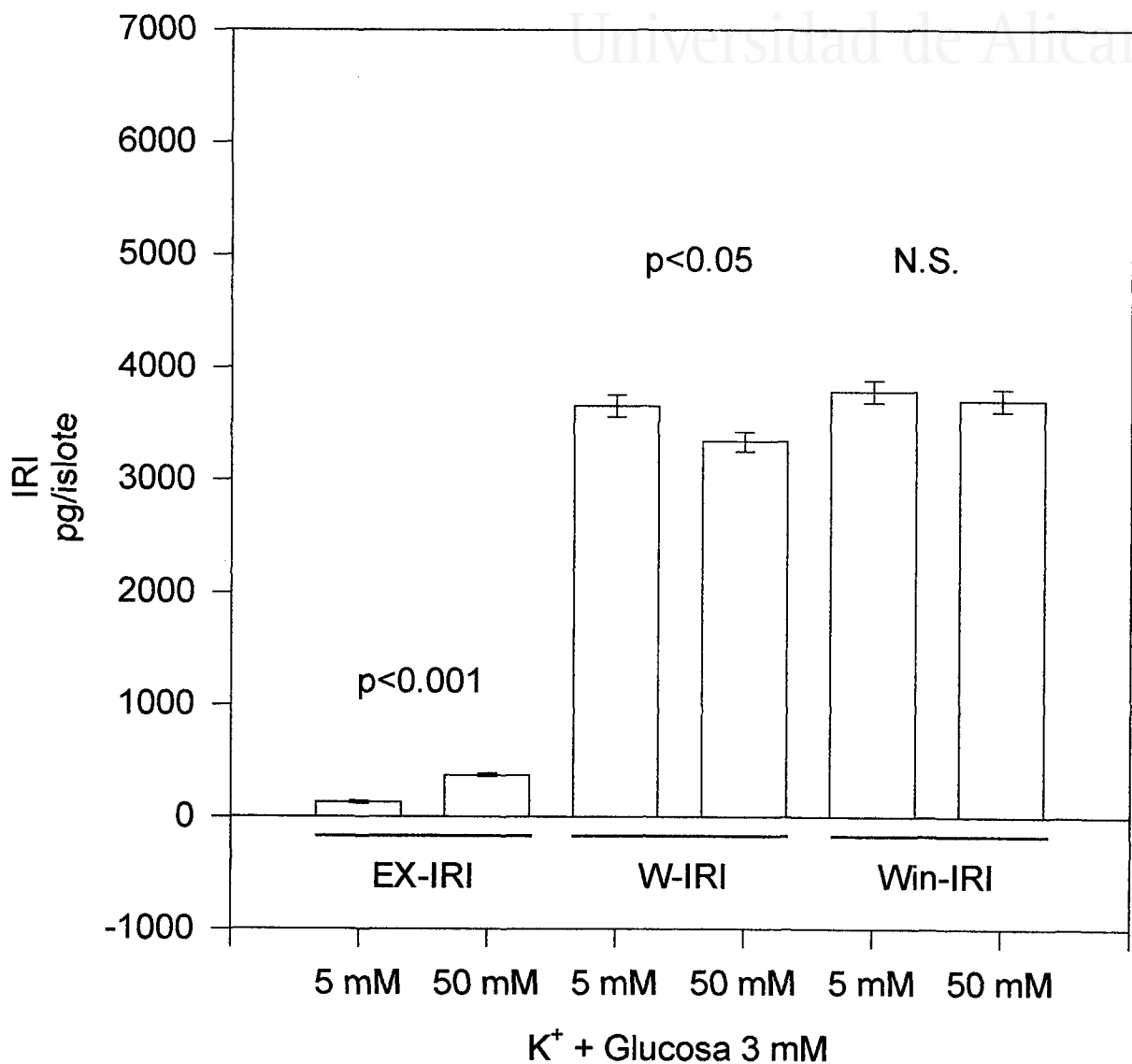


Fig.- 4.28. El K⁺ 50 mM aumenta la secreción de insulina (EX-IRI), respecto de K⁺ 3 mM, y la insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI) disminuye en la misma cantidad.

Win-IRI = W-IRI + EX-IRI.

A-IRI = 35646 ± 1934 pg/islote.



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

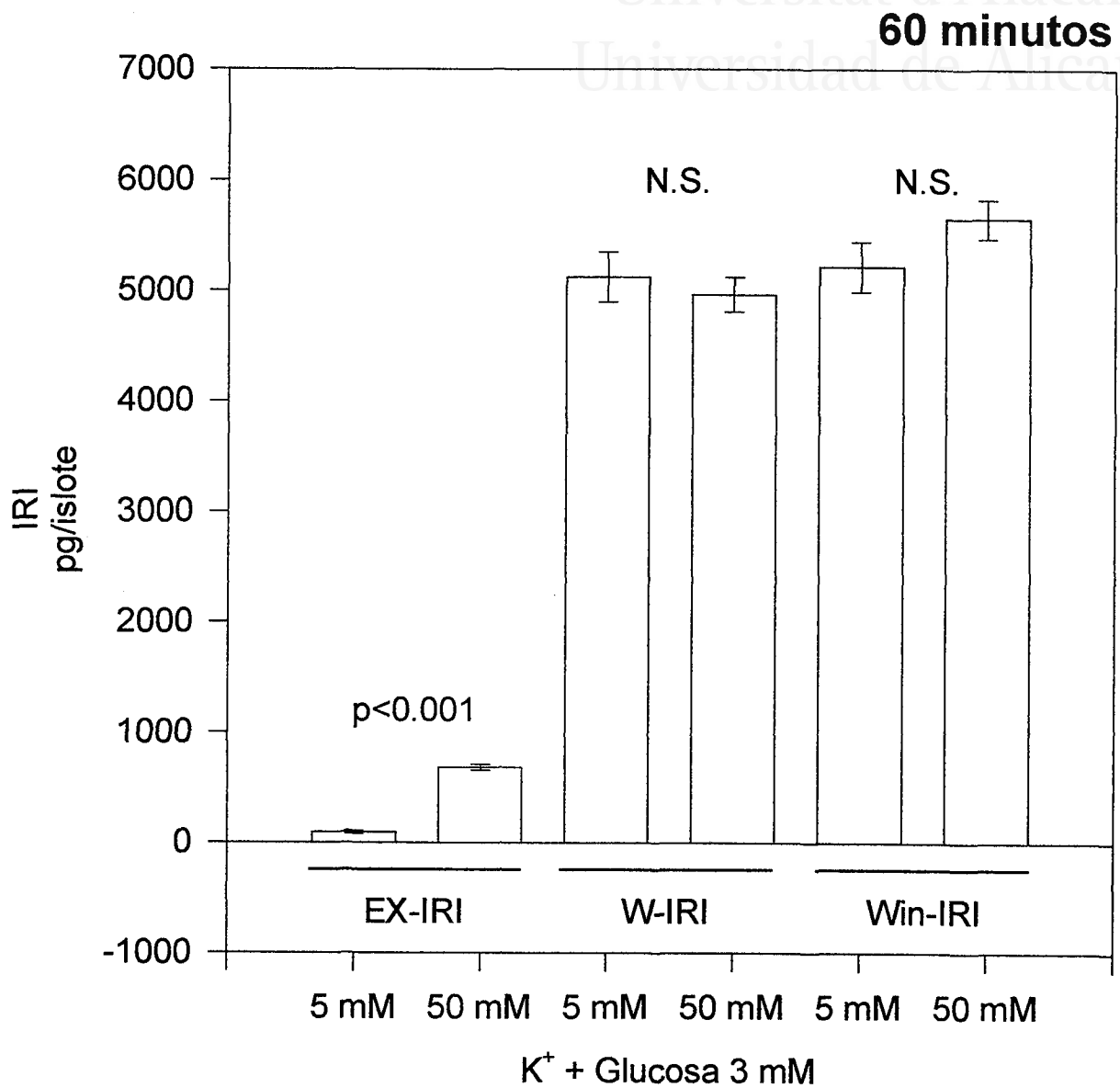


Fig.- 4.29. El K⁺ 50 mM aumenta la secreción de insulina (EX-IRI), respecto de K⁺ 3 mM, pero la insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI) no disminuye en la misma cantidad, en 60 min. de incubación.

Win-IRI = W-IRI + EX-IRI

A-IRI = 50634 ± 3083 pg/islote



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

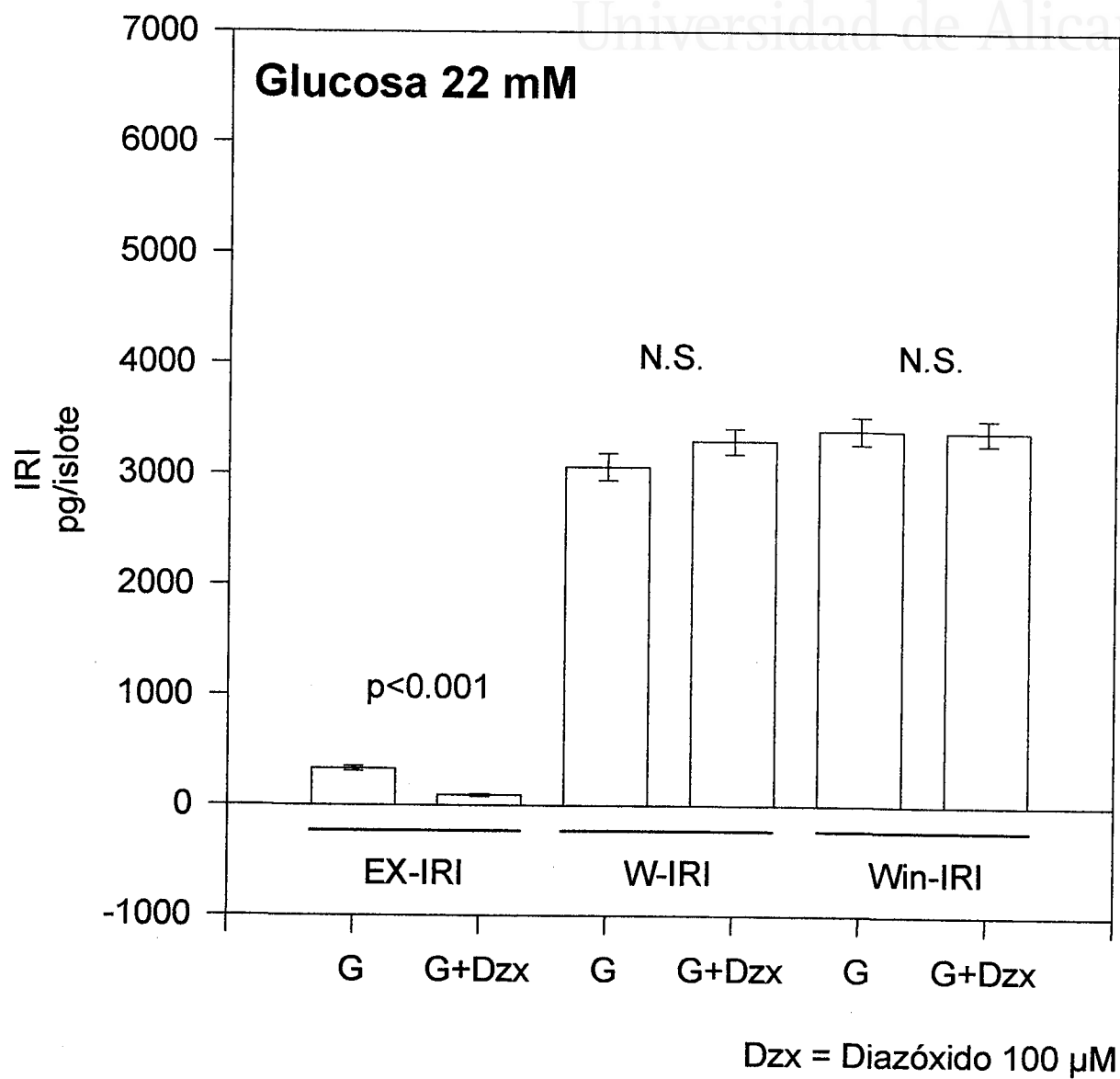


Fig.- 4.30. El diazóxido inhibe la secreción de insulina (EX-IRI), inducida por glucosa 22 mM, y la insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI) no varía significativamente. W-IRI = W-IRI + EX-IRI. A-IRI= 34913 \pm 1725 pg/islote.



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

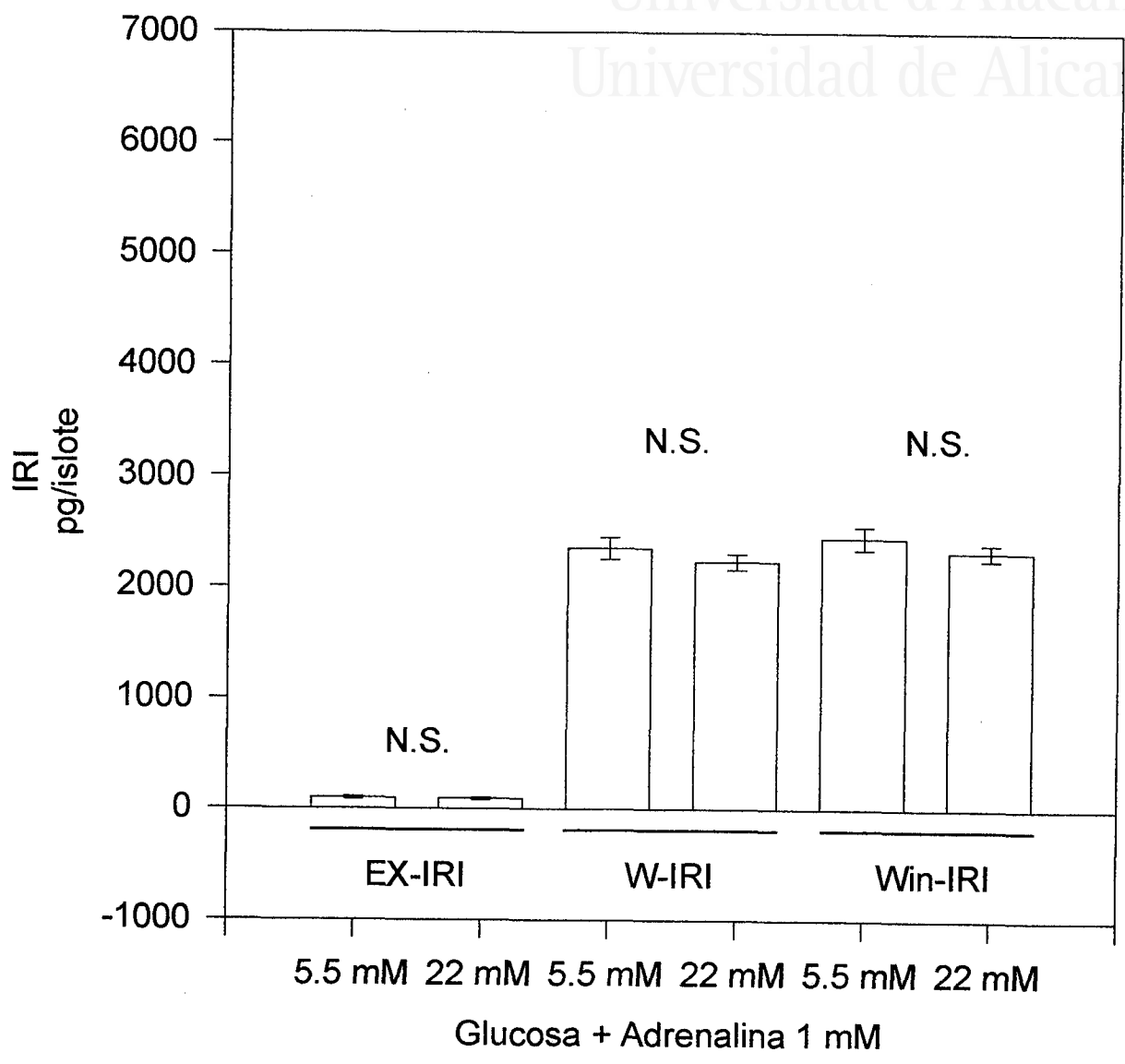


Fig.- 4.31. La adrenalina inhibe la secreción de insulina (EX-IRI), inducida por glucosa 22 mM, respecto de 5 mM, y la insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI) no varía significativamente.
 Win-IRI = W-IRI + EX-IRI.
 A-IRI= 27788 ± 1553 pg/islote.



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

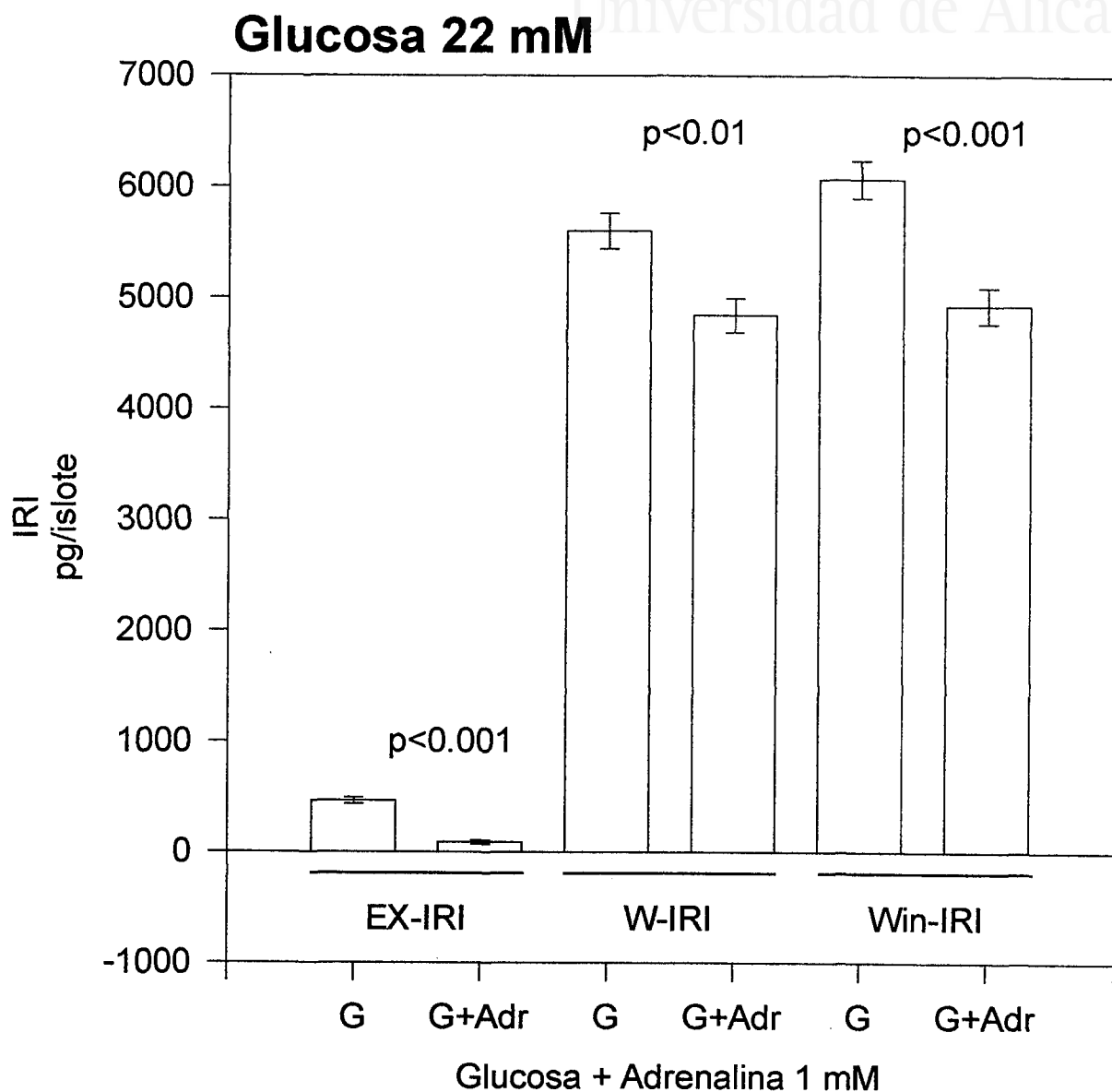


Fig.- 4.32. La adrenalina inhibe la secreción de insulina (EX-IRI), inducida por glucosa 22 mM, y disminuye la insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI).
 Win-IRI = W-IRI + EX-IRI.
 A-IRI = 53429 ± 2648 pg/islote.

4.10. La glucosa induce la síntesis de insulina inmunorreactiva en agua

Para observar el efecto de la glucosa sobre la insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI), se ha realizado la incubación de islotes, cada uno por separado, en dos grupos de concentración de glucosa 3 mM y 22 mM, determinando la secreción de insulina (EX-IRI), a distintos tiempos de incubación (30, 60 y 120 minutos) en cada experimento, y el contenido de insulina (W-IRI y A-IRI) de cada islote.

La **figura 4.33** muestra los resultados con 30 minutos de incubación (n=20 en cada grupo), indicando que hay diferencia significativa en secreción de insulina inmunorreactiva (EX-IRI); no hay diferencia significativa en la insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI), aunque es ligeramente superior en el grupo de 22 mM, pero si que hay diferencia significativa en la suma (EX-IRI+W-IRI=Win-IRI).

La **figura 4.34** corresponde a otro experimento con 60 minutos de incubación (n=15 en cada grupo). Se observa que hay diferencia significativa en secreción de insulina inmunorreactiva (EX-IRI); no hay diferencia significativa en la insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI), aunque es ligeramente inferior en el grupo de 22 mM, y tampoco hay diferencia significativa en la suma (EX-IRI+W-IRI=Win-IRI).

En el experimento de la **figura 4.35**, realizado con 120 minutos de incubación (n=20 en cada grupo), se observa que el contenido total A-IRI disminuye significativamente en los islotes incubados con glucosa 22 mM ($A-IRI_{3\text{ mM}} = 54798 \pm 4024$ pg/islote, $A-IRI_{22\text{ mM}} = 43892 \pm 3243$ pg/islote, $p < 0.05$), por lo que las medias de EX-IRI y W-IRI deben calcularse respecto de A-IRI de su grupo. Se comprueba que en 120 minutos de incubación el aumento de secreción (EX-IRI) se corresponde con la disminución de W-IRI.

Estos resultados indican que la insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI) mantiene sus niveles, por efecto de la glucosa, durante 30 minutos y a partir de 60 minutos de incubación comienza a disminuir hasta los niveles de secreción en 120 minutos, probablemente debido al agotamiento de las reservas celulares de aminoácidos esenciales.



Universitat d'Alacant
 Universidad de Alicante

30 minutos

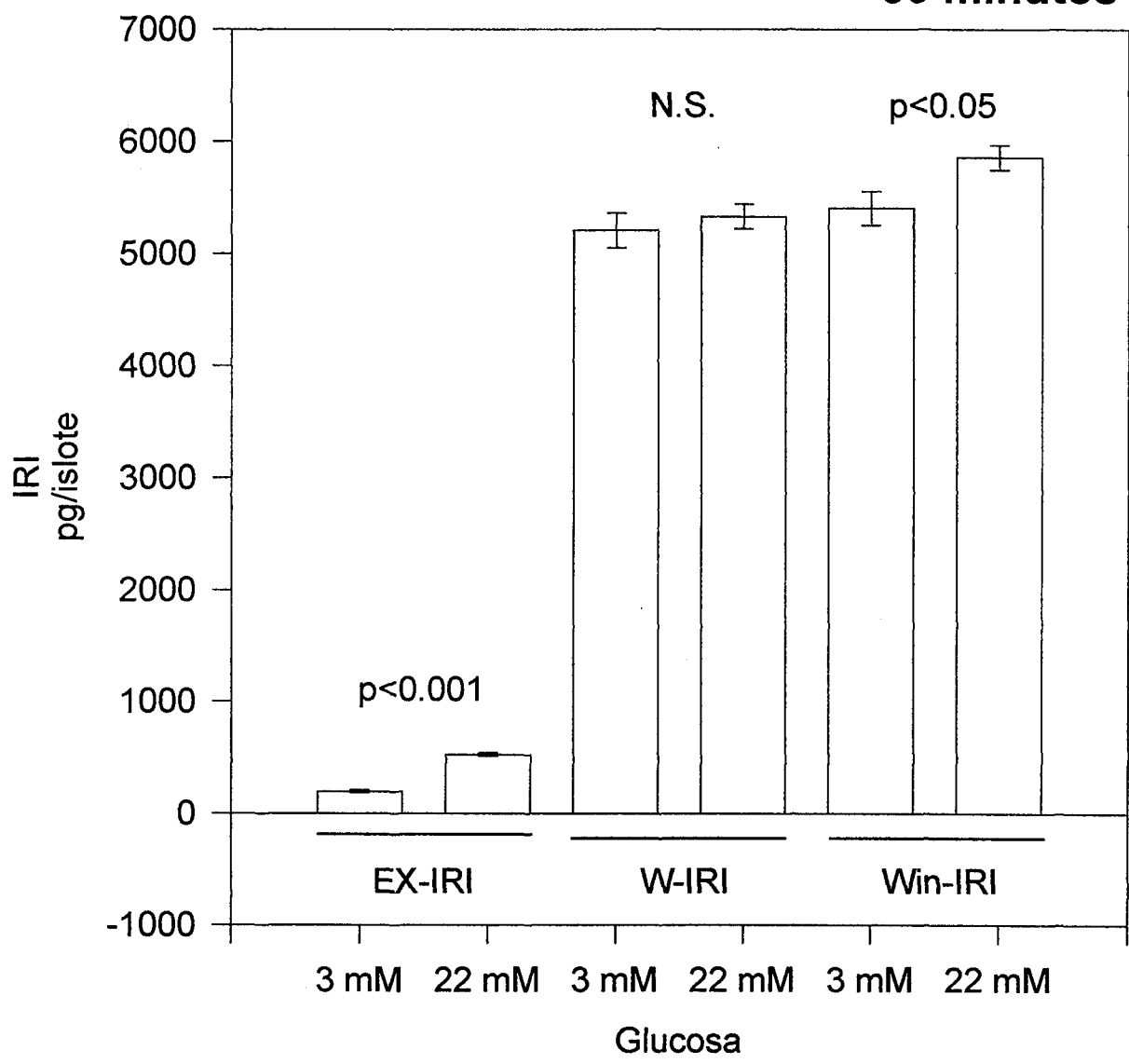


Fig.- 4.33. La glucosa 22 mM aumenta la secreción de insulina (EX-IRI), y no disminuye el contenido de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI) del islote único, en 30 minutos de incubación, respecto de glucosa 3 mM.
 Win-IRI=W-IRI+EX-IRI.
 A-IRI= 64228 ± 3136 pg/islote.



Universitat d'Alicant
 Universidad de Alicante

60 minutos

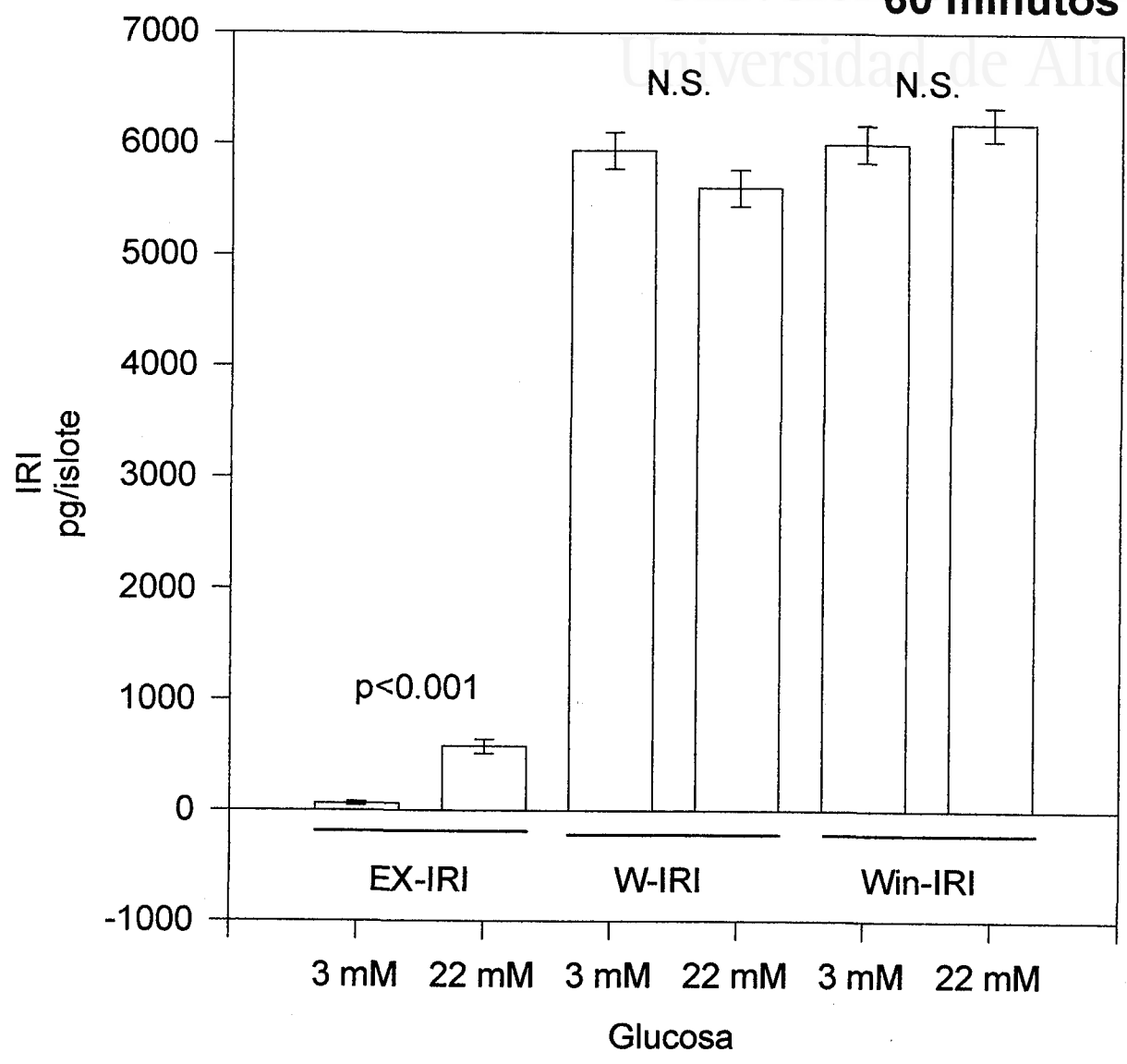


Fig.- 4.34. La glucosa 22 mM aumenta la secreción de insulina (EX-IRI), y el contenido de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI) disminuye, sin diferencia significativa, en 60 minutos de incubación, respecto de glucosa 3 mM.
 Win-IRI=W-IRI+EX-IRI.
 A-IRI= 50625 ± 2566 pg/islote.



Universitat d'Alicant
 Universidad de Alicante

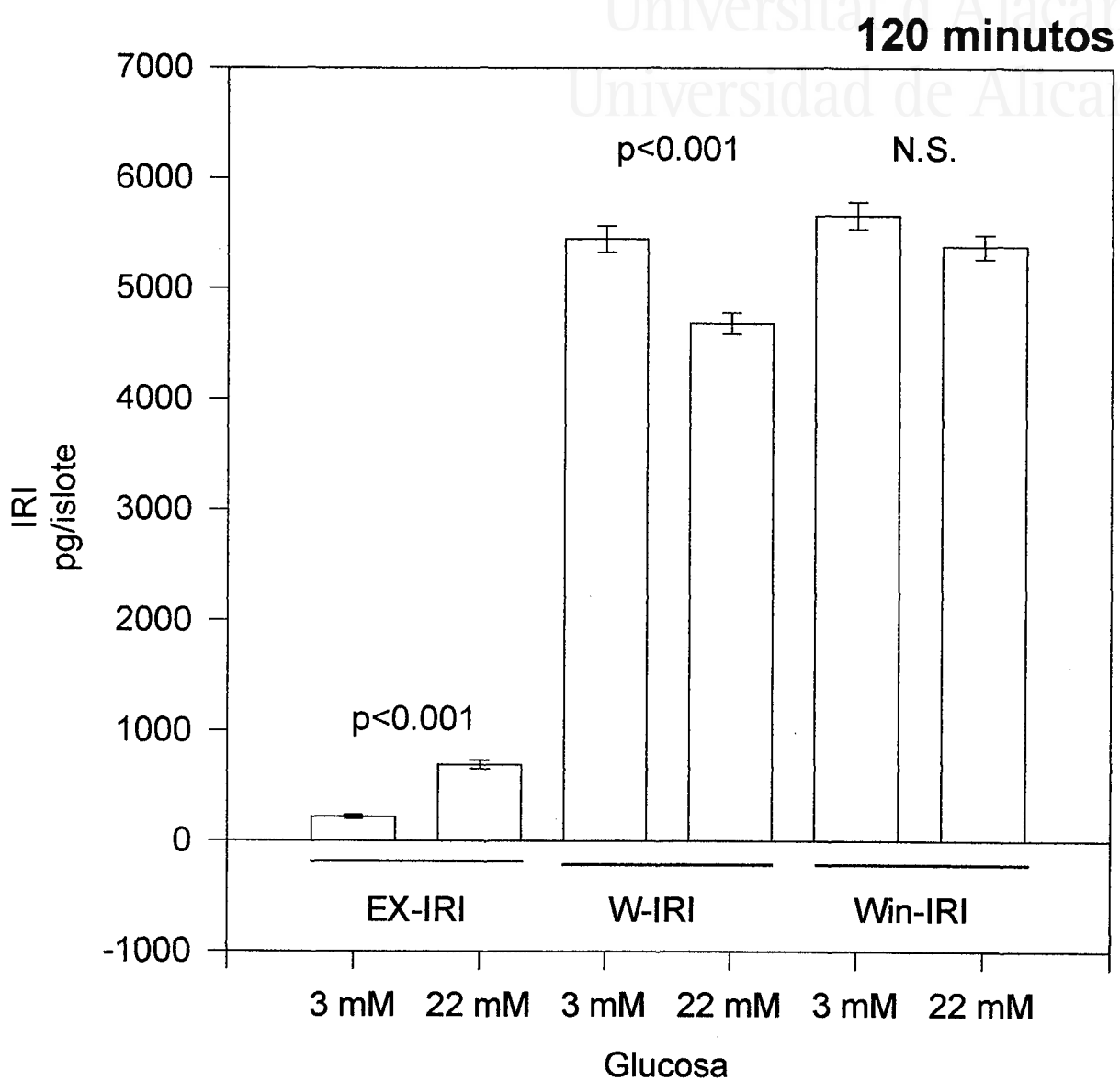


Fig.- 4.35. La glucosa 22 mM aumenta la secreción de insulina (EX-IRI), y el contenido de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI) disminuye en 120 minutos de incubación, respecto de glucosa 3 mM.
 Win-IRI=W-IRI+EX-IRI.
 $A-IRI_{3\text{ mM}} = 54798 \pm 4024$ pg/islote.
 $A-IRI_{22\text{ mM}} = 43892 \pm 3243$ pg/islote.
 Diferencia significativa en A-IRI, $p < 0.05$.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

DISCUSION



5. DISCUSION

5.1. El funcionamiento integrado del islote resuelve la heterogeneidad de las células B aisladas

5.1.1. No existen islotes silentes

La heterogeneidad encontrada en células B dispersas correlaciona con la heterogeneidad en la secreción de insulina, y conduce a un modelo funcional para el islote basado en umbrales de activación variables (Bennett *et al.*, 1996), pero los islotes se comportan como un sincitio funcional en la respuesta a los niveles de glucosa, cancelando la heterogeneidad a nivel celular (Valdeolmillos *et al.*, 1993). Las células B aisladas no responden todas a la glucosa segregando insulina, como se observa con el ensayo de placa hemolítica (Salomon y Meda, 1986) (Soria *et al.*, 1991), y la proporción de células B que responden aumenta al aumentar la concentración de glucosa del medio de incubación. Las células utilizadas en dicho ensayo proceden de distintos islotes y se piensa que las células que no responden a la glucosa pueden proceder de islotes silentes. Nuestros resultados, como muestra la figura 4.1, que representa la secreción de 491 islotes procedentes de distintos ratones, y en distintos experimentos, a distintas concentraciones de glucosa, indican que no hay islotes pancreáticos de ratón silentes, probablemente porque las uniones intercelulares (gap junctions) contribuyen a que las células oscilen sincrónicamente, superando la heterogeneidad secretora, que muestran las células B aisladas, cuando las células están agrupadas en el islote. En cuanto a las uniones intercelulares, Andreu (Andreu *et al.*, 1997) ha comprobado que las células B oscilan sincrónicamente cuando están agrupadas en los islotes. El acoplamiento de las células parece esencial para mantener la conducta oscilatoria, ya que las células aisladas no oscilan (Valdeolmillos *et al.*, 1989) (Santos *et al.*, 1991).

5.1.2. Los islotes responden a la glucosa en forma concentración-dependiente

Los islotes son variables en la secreción de insulina inducida por glucosa, y como se observa en la figura 4.2, en la que se indican los valores de secreción media, con su error estándar, correspondientes a distintos ratones, y en distintos experimentos, a distintas concentraciones de glucosa, hay variabilidad intraindividuo y variabilidad interindividuo. La variabilidad intraindividuo se observa en las distintas pendientes de las rectas que unen la secreción media de insulina a las distintas concentraciones de glucosa, es decir, distintos ratones presentan distinta sensibilidad a la glucosa. La variabilidad interindividuo se observa en la diferencia significativa que hay entre la secreción media de insulina de cada ratón a una misma concentración de glucosa. Ambos tipos de variabilidad, intra e interindividuo, se corrigen, en general, en cierta medida presentando los valores de secreción respecto del contenido total de insulina del islote, como se observa en la figura 4.3.

5.1.3. El tamaño del islote es un factor de variabilidad

Se piensa que el islote controla la secreción de insulina como un sincitio o unidad funcional, independientemente del tamaño del islote o del número de células B que lo componen, y en la práctica experimental los resultados de secreción de insulina se suelen expresar por islote, sin tener en cuenta el tamaño del mismo, pero es de esperar, que si el número de células B del islote es proporcional al tamaño del mismo, la secreción de insulina también debe ser proporcional al tamaño del islote. En la figura 4.11 se muestran los resultados de la incubación de los islotes de un ratón a dos concentraciones de glucosa, 3 mM y 22 mM, en función del tamaño del islote. Se observa que la secreción es directamente proporcional al tamaño del islote, por lo que el islote no controla la secreción como una unidad independiente del tamaño. Se comprueba que islotes mayores que 300 μm con glucosa 3 mM producen más secreción que islotes menores que 200 μm con glucosa 22 mM. En la figura 4.6 se muestra la secreción, en otro experimento, con glucosa 14 mM, en función del tamaño del islote. Calculando, mediante la recta de regresión, la secreción de insulina a distintos diámetros medios del islote (150 μm , 200 μm y 300 μm) observamos los siguientes resultados:

Figura 4.6
con Glucosa 14 mM
150 μm \rightarrow 1067 pg/islote/30 minutos
200 μm \rightarrow 1896 pg/islote/30 minutos
300 μm \rightarrow 3555 pg/islote/30 minutos

Figura 4.11
con Glucosa 3 mM
150 μm \rightarrow 96 pg/islote/30 minutos
200 μm \rightarrow 167 pg/islote/30 minutos
300 μm \rightarrow 307 pg/islote/30 minutos

Figura 4.11
con Glucosa 22 mM
150 μm \rightarrow 351 pg/islote/30 minutos
200 μm \rightarrow 481 pg/islote/30 minutos
300 μm \rightarrow 740 pg/islote/30 minutos

Y se comprueba que los islotes de un ratón, con glucosa 14 mM, producen más secreción (superior a 200%) que los de otro ratón con glucosa 22 mM, respecto de un mismo tamaño de islote, lo que indica variabilidad interindividuo, respecto de un mismo tamaño de islote. Para una misma concentración de glucosa se demuestra que el tamaño del islote es un factor importante que contribuye a la variabilidad intraindividuo en la secreción de insulina.

Demostramos que la secreción de insulina (EX-IRI) es dependiente del tamaño del islote, y sería conveniente referir la secreción respecto de un determinado tamaño estandarizado cuando se estudien diferencias de secreción de insulina. La secreción también se puede expresar respecto del contenido total de insulina, pero al ser modificable éste por algunas sustancias, o en determinadas condiciones, y ser el error de su determinación mayor que el de la medida del tamaño del islote, sería más correcto expresar la secreción de IRI en función del tamaño de islote.

5.2. Insulinas inmunorreactivas contenidas en el islote

5.2.1. La incubación de los islotes en presencia de albúmina aumenta el contenido total de insulina inmunorreactiva en ácido (A-IRI)

Los islotes presentan variabilidad en tamaño; el número de células y el tamaño del islote de Langerhans de rata varía desde unas pocas células y $<40\ \mu\text{m}$ de diámetro hasta 5000 células y $400\ \mu\text{m}$ de diámetro (Bonner-Weir, 1991), y es de esperar que el número de células B sea directamente proporcional al tamaño del islote, por lo que, si el contenido de insulina de cada célula es constante, el contenido total de insulina del islote debe ser directamente proporcional al tamaño del islote. Este hecho lo hemos comprobado con los experimentos cuyos resultados mostramos en las figuras 4.8 y 4.14, en las cuales se representa el tamaño del islote (diámetro (A) y área (B)) frente al contenido total de insulina, de cada islote, determinado en medio ácido (A-IRI). En el experimento de la figura 4.8 los islotes no fueron incubados a 37°C , sino que se mantuvieron sobre hielo, durante el tiempo de medición del tamaño del islote, para inhibir la síntesis, maduración y secreción de la insulina. Los islotes del experimento de la figura 4.14 fueron incubados como se describe en materiales y métodos, es decir, durante 30 minutos, a 37°C , en presencia de albúmina (BSA) y con glucosa 3 mM y 22 mM. Calculando, mediante la recta de regresión, el contenido de insulina a distintos diámetros medios ($150\ \mu\text{m}$, $200\ \mu\text{m}$ y $300\ \mu\text{m}$) del islote obtenemos los siguientes resultados:

Figura 4.8	$150\ \mu\text{m} \rightarrow 24521\ \text{pg/islote}$
(islotes no incubados)	$200\ \mu\text{m} \rightarrow 38920\ \text{pg/islote}$
	$300\ \mu\text{m} \rightarrow 67716\ \text{pg/islote}$
Figura 4.14	$150\ \mu\text{m} \rightarrow 40063\ \text{pg/islote}$ (aumenta 63%)
con Glucosa 3 mM	$200\ \mu\text{m} \rightarrow 56185\ \text{pg/islote}$ (aumenta 44%)
	$300\ \mu\text{m} \rightarrow 88431\ \text{pg/islote}$ (aumenta 31%)

Figura 4.14	150 μm \rightarrow 42670 pg/islote (aumenta 74%)
con Glucosa 22 mM	200 μm \rightarrow 57358 pg/islote (aumenta 47%)
	300 μm \rightarrow 86735 pg/islote (aumenta 28%)

No se observa diferencia significativa entre el contenido de los islotes incubados a distinta concentración de glucosa, pero sí entre los incubados y los no incubados, aumentando el contenido en los islotes incubados, y este aumento es diferente según el tamaño del islote, siendo el aumento de insulina total superior en los islotes pequeños que en los grandes. Se puede pensar que esta diferencia es debida a variabilidad entre ratones, pero en los resultados mostrados en la figura 4.22, siendo los islotes de un solo ratón y habiendo incubado los islotes con glucosa 22 mM en dos grupos, uno con BSA y otro sin BSA, se observa que el contenido total de insulina, determinado en medio ácido, es significativamente diferente en ambos grupos ($p < 0.01$):

Sin BSA	32039 \pm 3446 pg/islote
Con BSA	51342 \pm 5494 pg/islote (aumenta 60%)

El contenido de insulina, en medio ácido, encontrado en los islotes del grupo sin BSA se corresponde, según el experimento de la figura 4.8, con un diámetro de 175 μm , y el contenido de los islotes incubados con BSA se corresponde, según el experimento de la figura 4.14, también con un diámetro de 175 μm del grupo de islotes incubados con glucosa 22 mM. El aumento del 60% observado en el experimento de la figura 4.22, en el que los islotes son de un mismo ratón, es equivalente al encontrado en los islotes de la figura 4.14, respecto de los islotes del experimento de la figura 4.8, con glucosa 22 mM. Esto nos permite concluir que la incubación de los islotes, durante 30 minutos, aumenta significativamente el contenido de insulina, determinado en medio ácido, debido a la presencia de BSA en el medio de incubación, y no debido al aumento de la concentración de glucosa.

Mediante estudios morfométricos de gránulos secretores de células B de ratón, Dean (Dean, 1973; citado por Howell y Tyhurst, 1982) observó un promedio de unos 13000 gránulos/célula B, y Howell calculó que hay unas 200000 moléculas de insulina por gránulo en células B de rata

(Howell, 1974; citado por Howell y Tyhurst, 1982). Teniendo en cuenta que el diámetro de una célula B es de unos 12 μm podemos calcular que un islote, aproximadamente esférico, de unos 150 μm de diámetro contiene unas 1000 células; con estos datos obtenemos que el contenido medio de insulina de un islote de unas 1000 células debe ser:

$$1000 \text{ cél. B/islote} \times 13000 \text{ grán./cél. B} \times 200000 \text{ moléc./grán.} \times 1 \text{ mol}/6.023 \cdot 10^{23} \text{ moléc.} \times 6000 \text{ g/mol} \times 10^{12} \text{ pg/g} = 25900 \text{ pg/islote}$$

Que es muy próximo al valor obtenido, según los resultados mostrados en la figura 4.8, para un islote de 150 μm = 24521 pg/islote, aunque éste debería ser inferior, pues todas las células del islote no son B. Como describe Bonner-Weir (Bonner-Weir, 1991) el islote de Langerhans, de rata, está formado por un núcleo de células B envueltas en un manto, de un grosor de una a tres células, de células no-B. Además los microcapilares que forman la infraestructura de un islote también ocupan volumen. La arteriola entra en el islote de Langerhans por una de las discontinuidades del manto de células no-B, y llega directamente al núcleo de células B, desde donde se ramifica en capilares fenestrados, que siguen un camino tortuoso, primero a través del núcleo de células B y después a través del manto de células no-B. Los microcapilares eferentes confluyen en vénulas colectoras. El tipo de microvascularización varía según el tamaño del islote. En los islotes grandes, los vasos eferentes confluyen en el espacio subcapsular, en los pequeños se extienden por el tejido exocrino unos 50 - 100 μm antes de confluir en las vénulas colectoras.

Si tenemos en cuenta que, suponiendo los islotes esféricos, al duplicar el diámetro de una esfera su volumen se multiplica por 8, a los islotes de 300 μm les debería corresponder un contenido de insulina de 207200 pg/islote, pero nuestros resultados muestran sólo 67716 pg/islote en los islotes sin incubar, y hasta 88431 pg/islote en los islotes incubados. Esta cantidad, tan pequeña respecto de lo esperado, podría explicarse porque en los islotes grandes los microcapilares ocupen mucho volumen, o porque la proporción de células B no aumente proporcionalmente al volumen del islote, o porque el contenido de insulina en las células B de los islotes grandes sea menor que en las de los islotes pequeños, una o varias de estas posibilidades podría contribuir a que el contenido de insulina del islote no aumente proporcionalmente al cubo del radio del islote, y deberían estudiarse.

La determinación del contenido total en medio ácido implica la interferencia positiva del ácido sobre el RIA. Si determinamos insulina en el medio KRB-BSA obtenemos valores de c.p.m. similares a los del estándar 0 ng/ml, pero si añadimos ácido al medio, a la misma concentración que en el método de etanol-ácido, las c.p.m. disminuyen incluso por debajo de las del estándar de 16 ng/ml, lo que obliga a diluir la muestra para reducir la acidez y por tanto la interferencia.

Puesto que la insulina total del islote se puede determinar en presencia de BSA, como se observa en la figura 4.22, sugerimos que debería estandarizarse este método para eliminar la interferencia del ácido, aunque esto supondría cambiar los valores de referencia.

5.2.2. El islote contiene dos fracciones de insulina inmunorreactiva

Las IRI contenidas en la célula B se encuentran, principalmente, en dos formas moleculares: proinsulina e insulina; otras formas, como preproinsulina e intermediarios de la conversión de proinsulina en insulina, son minoritarias (Orci *et al.*, 1984) (Orci *et al.*, 1985) (Orci *et al.*, 1987) (Orci *et al.*, 1988) (Howell, 1984) (Rhodes *et al.*, 1987).

La proinsulina se encuentra, como monómero, almacenada en los gránulos inmaduros; y en rata se ha determinado, por HPLC, como un 11.5% del contenido total de IRI (Leahy, 1993).

La insulina se encuentra almacenada en los gránulos maduros, cristalizada como hexámero y coordinada con Zn^{2+} (Hill *et al.*, 1991) (Bryant *et al.*, 1993) (Bently *et al.*, 1992) (Huang y Arvan, 1995), lo que producirá impedimento estérico para unirse al anticuerpo anti insulina del RIA.

La insulina liberada por los islotes procede de los gránulos maduros, por lo que la insulina estará coordinada con Zn^{2+} en forma de hexámero, y no se podrá determinar con RIA, por impedimento estérico, a no ser que intervenga algún mecanismo que rompa la unión Zn^{2+} -Insulina. Considerando que el Zn^{2+} se transporta, en la sangre, unido principalmente a la albúmina (Masuoka y Saltman, 1994) (Tibaduiza y Bobilya, 1996) (Kiilerich y Christiansen, 1986), podría ser esta molécula la que capte Zn^{2+} , fisiológicamente, dejando libre la insulina, lo que nos conduce a suponer que *in vitro* la albúmina también puede realizar el mismo mecanismo. En la figura 4.21, que muestra la secreción de insulina de islotes incubados con albúmina y sin albúmina, se comprueba que no se

determina toda la secreción de IRI, inducida por glucosa 22 mM, cuando los islotes se incuban sin BSA, respecto del control con BSA, en cambio sí que se determina, y en la misma cantidad que el control, la secreción de IRI cuando al medio, en el que se han incubado los islotes sin BSA, se añade BSA. Esto indica que la albúmina aumenta la reactividad de la insulina liberada por el islote, probablemente porque capte el Zn^{2+} del hexámero de insulina, dejando libre la insulina como monómero para que pueda unirse al anticuerpo antiinsulina del RIA.

La presencia de las dos formas moleculares, insulina hexámero y proinsulina, en las células B del islote implica cuatro posibilidades para la forma molecular de la W-IRI:

- 1.- Mezcla de proinsulina y de insulina (esta última como producto de solubilidad de la insulina total).
- 2.- Insulina sola, como producto de solubilidad de la insulina total.
- 3.- Proinsulina sola.
- 4.- Ninguna de las dos, es decir, otra forma de IRI que no sea insulina hexámero o proinsulina.

W-IRI, como producto de solubilidad, queda excluido porque la solubilidad de una sustancia es una constante, y los resultados de nuestros experimentos indican que W-IRI es proporcional al contenido total de A-IRI y también al tamaño del islote.

El aumento de la inmunorreactividad del contenido total de insulina en presencia de ácido o de BSA, respecto de la inmunorreactividad en agua, como se observa en las figuras 4.22 (contenido de insulina total) y 4.23 (contenido de W-IRI), apoya la hipótesis del impedimento estérico, el cual se eliminaría rompiendo la unión Zn^{2+} -insulina, lo mismo que sucede con la secreción de los islotes incubados sin BSA, como se muestra en la figura 4.21, cuya inmunorreactividad aumenta al añadir BSA. Deducimos que al no ser necesaria la BSA en el medio de incubación, para estimular la secreción de insulina, su exclusión evitará interferencias que provoca la albúmina, tales como la unión a la albúmina de las sustancias que se quieren estudiar, como pueden ser hormonas esteroideas,

ácidos grasos, fármacos, metales, etc., o las burbujas que se forman en los estudios de perfusión de islotes.

Si W-IRI fuese monómero de insulina, consecuencia de una conversión intragranular del hexámero, previa a la secreción inducida por glucosa, debería observarse morfológicamente, y aún no ha sido descrito en la literatura; además la insulina liberada por los islotes sería inmunorreactiva sin BSA en el medio de incubación.

Nos queda sólo la tercera posibilidad, es decir, W-IRI es pro insulina, que se sabe que es monómero, soluble e inmunorreactiva, y el valor obtenido de $100 \times W\text{-IRI}/A\text{-IRI}$, un 10% como muestra la figura 4.20, es semejante a la proporción de pro insulina encontrada en rata, un 11.5%.

La figura 5.1 es un esquema de la distribución de las insulinas inmunorreactivas contenidas en el islote.

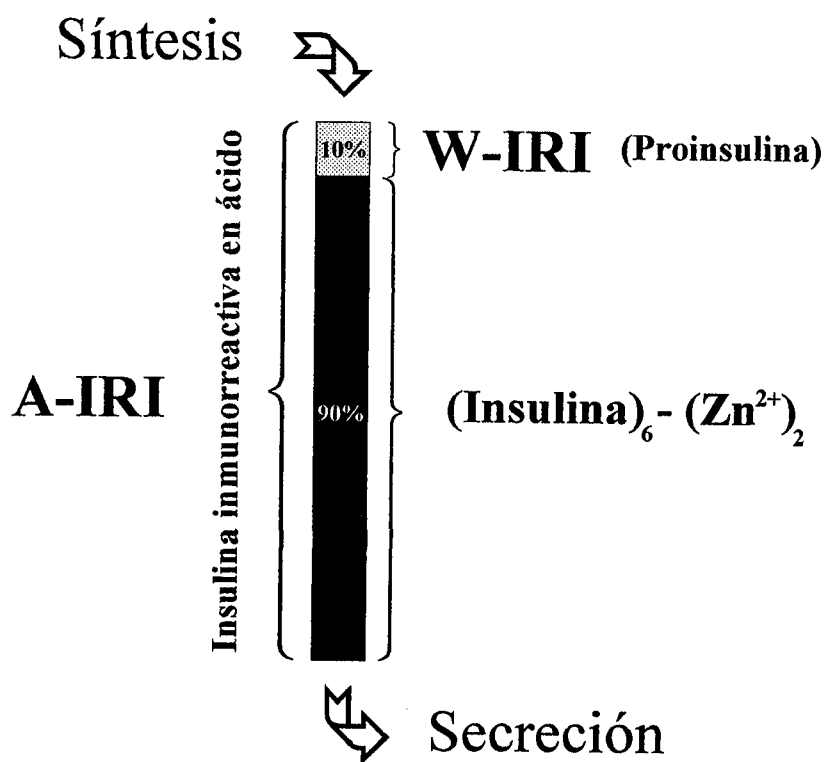


Figura 5.1. Distribución de las insulinas inmunorreactivas contenidas en el islote.

5.3. Los secretagogos inducen la liberación de insulina inmunorreactiva y modifican la insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI)

Está descrito en la literatura que la glucosa activa la síntesis de proinsulina (Skelly *et al.*, 1996), su conversión en insulina (Rhodes *et al.*, 1987) y la secreción de insulina. Identificada la W-IRI con proinsulina, consideremos la relación entre secreción (EX-IRI) y contenido de W-IRI:

Efecto de la isobutilmetilxantina (IBMX).- El aumento de cAMP, por glucagón y otras hormonas, que potencia la respuesta secretora de la glucosa, se acompaña de una rápida fosforilación de sustratos específicos de la proteína quinasa A (Christie y Ashcroft, 1985), apoyando el papel modulador de ésta en la regulación de secreción de insulina. Se han estudiado los sustratos de proteína quinasa A en islotes de Langerhans, premarcados con ^{32}P i, y estimulados con forskolina (activador de adenilato ciclasa) (Christie y Ashcroft, 1985), y también en islotes permeabilizados expuestos a cAMP, en presencia de $[\gamma^{32}]\text{ATP}$ (Jones *et al.*, 1988), demostrando rápidos cambios en la fosforilación de péptidos citosólicos y de membrana.

La glucosa eleva por sí misma el cAMP de la célula B, pero es improbable que este efecto contribuya significativamente al mecanismo iniciador de la glucosa. Si se aplica cAMP, con baja concentración de glucosa, no se estimula la secreción de insulina (Christie y Ashcroft, 1984); y si se inhibe la proteína quinasa A con un análogo del cAMP, la glucosa sigue estimulando la secreción de insulina (Persaud *et al.*, 1990). La metilxantina (IBMX) es un inhibidor de la fosfodiesterasa, que transforma el cAMP en AMP de forma irreversible, por lo cual su presencia en el medio de incubación aumenta los niveles de cAMP en la célula B.

El cAMP activa la proteína quinasa A, que parece intervenir en el proceso de migración de los gránulos maduros, en relación al citoesqueleto, hacia la membrana plasmática, favoreciendo la probabilidad de exocitosis (Christie y Ashcroft, 1985) (Christie y Ashcroft, 1984) (Persaud *et al.*, 1990) (Ämmälä *et al.*, 1994) (Howell, 1984). Por lo tanto la secreción de insulina, inducida por

glucosa y potenciada por IBMX, disminuirá el contenido de gránulos maduros, y con ellos el de insulina, que se repondrá a partir del *pool* de proinsulina rápidamente, el cual deberá disminuir en la misma cantidad hasta que se sintetice nueva proinsulina.

Las figuras 4.24, 4.25, 4.26 y 4.27 muestran los resultados de la incubación de islotes con IBMX, comparados con el control sin IBMX, a distintas concentraciones de glucosa. La disminución de W-IRI, en la misma cantidad que la secreción (EX-IRI) potenciada por IBMX, indicaría que la conversión de proinsulina en insulina es más rápida que la síntesis de proinsulina en los 30 minutos de incubación.

Efecto del K^+ 50 mM en el medio de incubación.- El canal de K^+ -ATP es responsable del potencial de membrana de la célula B, y su inhibición despolariza la membrana, lo cual abre los canales de Ca^{2+} dependientes de potencial, que conducen a un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, causando la secreción de insulina (Martín y Soria, 1995) (Nadal *et al.*, 1994). El K^+ 50 mM en el medio de incubación bloquea los canales de K^+ -ATP, lo que provoca en los islotes la secreción transitoria de insulina. Está descrito el efecto activador, en los islotes, del Ca^{2+} , mediado por calmodulina, sobre la adenilato ciclasa, que aumenta el cAMP potenciando la secreción de insulina, pero no la inicia, y sobre la fosfodiesterasa, que reduce el nivel de cAMP reduciendo la secreción de insulina (Christie y Ashcroft, 1985). En la figura 4.26 se comprueba que la estimulación de la secreción con K^+ 50 mM en 30 minutos se corresponde con la disminución de W-IRI; pero en 60 minutos, como muestra la figura 4.29, se observa una recuperación del nivel de W-IRI, respecto del control.

Efecto de inhibidores de la secreción de insulina.-

El diazóxido, una sulfonamida, incrementa la actividad del canal de K^+ -ATP produciendo un efecto inhibitor en la secreción de insulina (Kozlowski *et al.*, 1989; citado por Ashcroft y Ashcroft, 1991). La figura 4.30 muestra el efecto inhibitor del diazóxido sobre la secreción de insulina, y el aumento de secreción inducido por glucosa se corresponde con la disminución de W-

IRI, aunque esta disminución no es estadísticamente significativa, probablemente debido a la poca secreción de IRI inducida por la glucosa 22 mM.

La adrenalina 1 mM inhibe la secreción (EX-IRI), como se observa en las figuras 4.31 y 4.32, y disminuye significativamente el contenido de W-IRI, como muestra la figura 4.32, lo que indicaría que la adrenalina 1 mM activa la conversión de proinsulina en insulina (disminución de W-IRI), estando de acuerdo con el aumento de gránulos observado por Dean (Dean, 1976; citado por Howell y Tyhurst, 1982) incubando islotes de ratón con glucosa y adrenalina.

Efecto de la glucosa 22 mM.- La glucosa 22 mM activa la síntesis, conversión y secreción respecto de glucosa 3 mM (Pipeleers *et al.*, 1973; citado por Malaisse, 1991) (Hoenig *et al.*, 1986) (Hutchins y Merrell, 1985) (Rhodes *et al.*, 1987) (Linde *et al.*, 1989) (Schuit *et al.*, 1991) (Huang y Arvan, 1995) (Malide *et al.*, 1995) (Skelly *et al.*, 1996). La figura 4.33 muestra los resultados de la incubación de islotes con glucosa 3 mM y 22 mM, durante 30 minutos; se comprueba que la glucosa 22 mM aumenta la secreción, pero este aumento no se corresponde con una disminución de la W-IRI, como se ha observado con IBMX o con K^+ 50 mM, sino que es ligeramente superior, indicando que la glucosa activa tanto la secreción como la síntesis de insulina. La figura 4.34 muestra los resultados de otro experimento, en las mismas condiciones que el anterior, pero durante 60 minutos de incubación; se observa que la W-IRI es ligeramente inferior en los islotes incubados con glucosa 22 mM, pero sin que la diferencia llegue a ser estadísticamente significativa. En la figura 4.35 se indican los resultados de otro experimento en que los islotes se incubaron durante 120 minutos; la W-IRI disminuye significativamente en el grupo de islotes incubados con glucosa 22 mM; además se observa en este experimento que el contenido total de A-IRI disminuye significativamente en el grupo con glucosa 22 mM. Con estos resultados podemos concluir que en 30 minutos de incubación con glucosa 22 mM se mantienen los niveles de W-IRI en el islote, y que comienzan a disminuir en una hora, hasta reducirse en cantidad ligeramente superior a la liberada en dos horas de incubación, probablemente porque las células B carecen de reservas de aminoácidos, al menos de los esenciales, para mantener continuamente la síntesis de proinsulina.

El método utilizado en esta memoria puede ser utilizado para estudiar síntesis, conversión y secreción de insulina por islote único.

Proponemos el esquema final, mostrado en la figura 5.2, como recopilación de nuestros resultados. La célula B contiene reservas de aminoácidos a partir de los que se sintetiza la proinsulina, la cual se convierte en proinsulina que se almacena en los gránulos inmaduros, y se transforma en insulina, que cristaliza en forma de hexámero, coordinada con Zn^{2+} , acumulándose en los gránulos maduros, a partir de los cuales se libera la insulina al medio extracelular, por acción de los secretagogos, en el proceso de exocitosis. La insulina en el medio extracelular continúa como hexámero $(Insulina)_6-(Zn^{2+})_2$, cuyos iones Zn^{2+} son captados por la albúmina dejando libre la insulina como monómero para que actúe sobre los receptores de sus células diana. La glucosa activa los tres pasos de síntesis, maduración y exocitosis. La IBMX, que aumenta el cAMP, activa el paso de exocitosis. El K^+ 50 mM activa el paso de exocitosis. La adrenalina inhibe la exocitosis y activa la maduración.

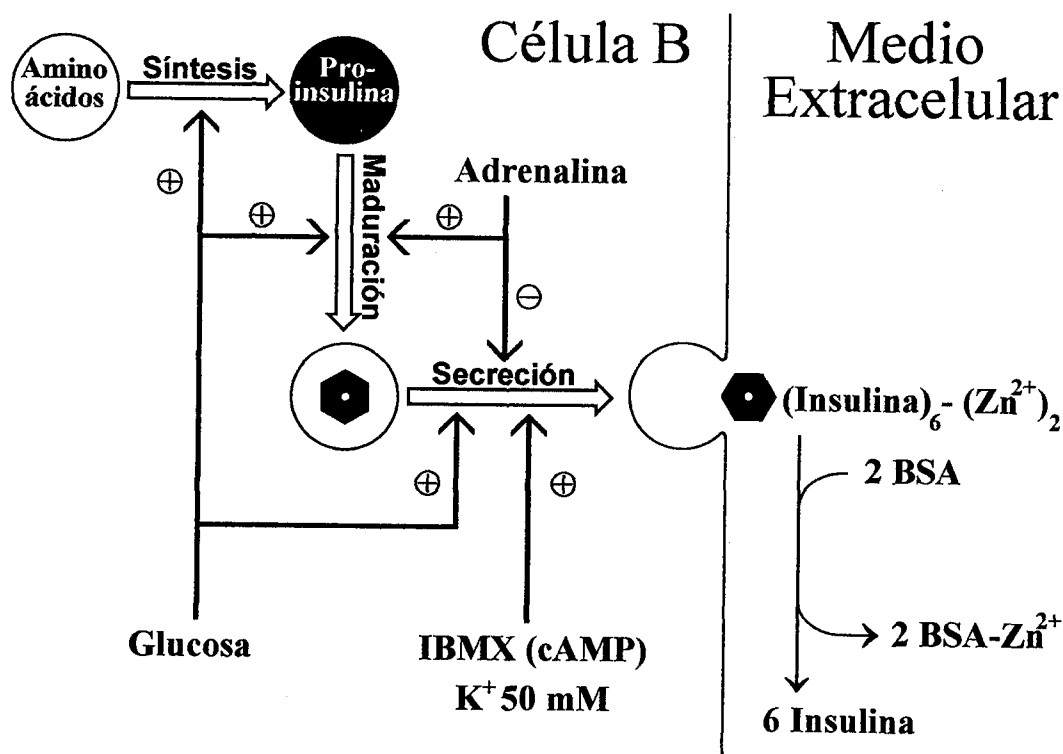


Figura 5.2. Esquema final.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

CONCLUSIONES



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

6. CONCLUSIONES

- 1.- No existen islotes pancreáticos de ratón silentes.**
- 2.- La secreción de insulina (EX-IRI) por el islote único presenta variabilidad interindividuo.**
- 3.- La secreción de insulina del islote único es dependiente del tamaño del islote.**
- 4.- El contenido de insulina del islote único es dependiente del tamaño del islote.**
- 5.- La albúmina (BSA) no es necesaria para estimular la secreción de insulina con glucosa 22 mM en los islotes únicos.**
- 6.- La inmunorreactividad de la IRI contenida en el islote aumenta en presencia de albúmina (BSA), lo mismo que en medio ácido.**
- 7.- El contenido de A-IRI total del islote aumenta incubando los islotes a 37 °C, durante 30 minutos, en presencia de albúmina (BSA).**
- 8.-La insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI) se corresponde con proinsulina.**



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

9.- El aumento de la secreción de insulina (EX-IRI), estimulado por K^+ 50 mM o potenciado por IBMX, se refleja en la disminución de W-IRI en 30 minutos de incubación.

10.- La Adrenalina 1 mM inhibe la secreción de IRI y disminuye el contenido de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI).

11.- La glucosa 22 mM activa la secreción de IRI y mantiene los niveles de insulina inmunorreactiva en agua (W-IRI) durante 30 minutos.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

BIBLIOGRAFIA



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

7. BIBLIOGRAFIA

- Andreu E, Soria B, Sánchez-Andrés J V. Oscillation of gap junction electrical coupling in the mouse pancreatic islets of Langerhans. *J. Physiol. (Lond)* 1997; **498(3)**:753-761.
- Alarcón C, Lincoln B, Rhodes C H. The biosynthesis of the subtilisin-related proprotein convertase PC3, but not that of the PC2 convertase, is regulated by glucose in parallel to proinsulin biosynthesis in rat pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* 1993; **268(6)**:4276-4280.
- Albor A, Camara J, Valverde I, Mato J M, Malaisse W J. Inhibition of insulin release by a putative insulin-mediator in pancreatic islet cells. *Med Sci Res* 1989; **17**:161-162.
- Almers W. Exocytosis. *Ann. Rev. Physiol.* 1990; **52**:607-624.
- Ämmälä C, Eliasson L, Bokvist K, Berggren P O, Honkanen R E, Sjöholm A, Rorsman P. Activation of protein kinases and inhibition of protein phosphatases play a central role in the regulation of exocytosis in mouse pancreatic beta-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1994; 4343-4347.
- Ämmälä C, Eliasson L, Bokvist K, Larsson O, Ashcroft F M, Rorsman P. Exocytosis elicited by action potentials and voltage-clamp calcium currents in individual pancreatic beta-cells. *J. Physiol.* 1993; **472**:665-688.

Arvan P, Kuliawat R, Prabakaran D, Zavacki A M, Elahi D, Wang S, Pilkey D. Protein discharge from immature secretory granules displays both regulated and constitutive characteristics. *J Biol Chem* 1991; **266**(22):14171-14174.

Ashcroft F, Ashcroft S J H. Mechanism of secretion. En: Ashcroft F, Ashcroft S J H, Editores. Insulin: molecular biology to pathology. Oxford University Press. Oxford, New York, Tokyo; 1991:97-139.

Balczon R, Overstreet K, Zinkowski R, Haynes A, Appel M. The identification, purification, and characterization of a pancreatic beta-cell form of the microtubule adenosine triphosphate kinesin. *Endocrinology* 1992; **131**(1): 331-336.

Bennett B D, Jetton T L, Ying G, Magnuson M A, Piston D W. Quantitative subcellular imaging of glucose metabolism within intact pancreatic islets. *J Biol Chem* 1996; **271**(7): 3647-3651.

Bentley G A, Brange J, Derewenda Z, Dodson E J, Dodson G G, Markussen J, Wilkinson A J, Wollmer A, Xiao B. Role of B13 Glu in insulin assembly. The hexamer structure of recombinant mutant (B13 Glu - Gln) insulin. *J Mol Biol* 1992; **228**:1163-1176.6

Bokvist K, Eliasson L, Ämmälä C, Renström E, Rorsman P. Co-localization of L-type Ca²⁺ channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *The EMBO J* 1995; **14**(1): 50-57.

Bolea S, Pertusa J A G, Martín F, Sánchez-Andrés J V, Soria B. Regulation of pancreatic B-cell electrical activity and insulin release by physiological amino acid concentrations. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 1997; **433**:699-704.

Bonner-Weir S. Anatomy of the islet of Langerhans. En: Samols E, Editor. The endocrine pancreas. Raven Press, New York; 1991:15-20.

Bonner-Weir S. Morphological evidence for pancreatic polarity of B-cell within the islets of Langerhans. *Diabetes* 1988; **37**:616-621.

Bonner-Weir S. Potencial "sensing" and "secretory" domains of pancreatic B-cell. *Diabetes* 1989; **38**:98A.

Bryant C, Spencer D B, Miller A, Bakaysa D L, McCune K S, Maple S R, Pekar A H, Brems DN. Acid stabilization of insulin. *Biochemistry* 1993; **32**:8075-8082.

Carpinelli A R, Malaisse W J. Regulation of ^{86}Rb outflow from pancreatic islets. IV. Effect of cyclic AMP, dibutyl-cyclic AMP and theophylline. *Acta Diabetol Lat* 1980; **17**:199-205.

Ciszak E, Smith D. Crystallographic evidence for dual coordination around zinc in the T_3R_3 human insulin hexamer. *Biochemistry* 1994; **33**:1512-1517.

Colbran R J, Schworer C M, Hashimoto Y, Fong Y L, Rich D P, Smith M K, Soderling T R.. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. J.* 1989; **258**:313-325.

Christie M R, Ashcroft S J H. Cyclic AMP-dependent protein phosphorylation and insulin secretion in intact islets of Langerhans. *Biochem J* 1984; **218**:87-99.

Christie M R, Ashcroft S J H. Substrates for cyclic AMP-dependent protein kinase in islets of Langerhans: studies with forskolin and catalytic subunit. *Biochem J* 1985; **227**:727-736.

Davidson H W, Rhodes C J, Hutton J C. Intraorganellar calcium and pH control proinsulin cleavage in the pancreatic B cell via two distinct site-specific endopeptidases. *Nature* 1988; **333**:93-96.

Dean P M. The kinetics of beta-granule formation: morphometric study. *Diabetologia* 1976; **12**:111-114.

Dean P M. Ultrastructural morphometry of pancreatic B cell. *Diabetologia* 1973; **9**:115-119.

Ferrer R, Soria B, Dawson C M, Atwater I, Rojas E. Effects of Zn^{2+} on glucose-induced electrical activity and insulin release from mouse pancreatic islets. *Am. J. Physiol.* 1984; **246**: C520-C527.

Ghafghazi T, McDaniel M L, Lacy P E. Zinc-induced inhibition of insulin secretion from isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes* 1981; **30**:341-345.

Gomperts B D. G_e : A GTP-binding protein mediating exocytosis. *Ann. Rev. Physiol.* 1990; **52**:591-606.

Harrison D E, Ashcroft S J H, Christie M R, Lord J M. Protein phosphorylation in the pancreatic beta-cell. *Experientia* 1984; **40**:1057-1084.

Harrison D E, Ashcroft S J H. Effects of Ca^{2+} , calmodulin and cyclic AMP on the phosphorylation of endogenous proteins by homogenates of rat islets of Langerhans. *Biochem. Biophys. Acta* 1982; **714**:313-319.

- Harrison D E, Poje M, Rocic B, Ashcroft S J H. Effects of dehydrouretil on protein phosphorylation and insulin secretion in rat islets of Langerhans. *Biochem. J.* 1986; **237**:191-196.
- Henquin J C, Garcia M C, Bozem M, Hermans M P, Nenquin M. Muscarinic control of pancreatic beta-cell function involves sodium-dependent depolarization and calcium influx. *Endocrinol.* 1988; **122**:2134-2142.
- Hill C P, Dauter Z, Dodson E J, Dodson G G, Dunn M F. X-ray structure of an unusual Ca^{2+} site and the roles of Zn^{2+} and Ca^{2+} in the assembly, stability, and storage of the insulin hexamer. *Biochemistry* 1991; **30**:917-924.
- Hiriart M, Matteson R. Na^+ channels and two types of Ca^{2+} channels in rat pancreatic B-cells identified with the reverse hemolytic plaque assay. *J Gen Physiol* 1988; **91**:617-639.
- Hoenig M, MacGregor L, Matschinsky F. In vitro exhaustion of pancreatic beta-cells. *Am J Physiol* 1986; **250**(5 Pt 1): E502-511.
- Howell S L, Jones P M, Persaud S J. protein kinase C and the regulation of insulin secretion. *Biochem. Soc. Trans.* 1990; **18**:114-116.
- Howell S L, Tyhurst M. The insulin storage granule. En: Poisner A M, Trifaró J M, Editores. The secretory process (The secretory granule). Elsevier biomedical press, Amsterdam-New York-Oxford; 1982:155-157.
- Howell S L. Role of ATP in the intracellular translocation of proinsulin and insulin in the rat pancreatic cell. *Nature (London) New Biol.* 1972; **235**:85-86.

- Howell S L. The mechanism of insulin secretion. *Diabetologia* 1984; **26**:319-327.
- Howell S L. The molecular organization of beta-granule of the islets of Langerhans. En: Ceccarelli B, Clementi F, Meldolesi J, Editores. *Advances in Cytopharmacology*, Vol. 2, Raven Press, New York 1974; pp. 319-327.
- Huang X F, Arvan P. Intracellular transport of proinsulin in pancreatic beta-cells. Structural maturation probed by disulfide accessibility. *J. Biol. Chem.* 1995; **270(35)**:20417-20423.
- Hughes S J, Ashcroft S J H. Effects of a phorbol ester and clomiphene on protein phosphorylation and insulin secretion in rat pancreatic islets. *Biochem. J.* 1988; **249**:825-830.
- Hughes S J, Chalk J G, Ashcroft S J H. Effect of secretagogues on cytosolic free Ca^{2+} and insulin release at different extracellular Ca^{2+} concentrations in the hamster clonal beta-cell line HIT-T15. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1989; **65**:35-41.
- Hughes S J, Chalk J G, Ashcroft S J H. The role of cytosolic free Ca^{2+} and protein kinase C in acetylcholine-induced insulin release in the clonal beta-cell line, HIT-T15. *Biochem. J.* 1990; **267**:227-232.
- Hughes S J, Christie M R, Ashcroft S J H. Potentiators of insulin secretion modulate Ca^{2+} sensitivity in rat pancreatic islets. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1987; **50**:231-236.
- Hutchins B, Merrell R. Regulation of the glucose enhanced insulin pool. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; **133(2)**: 696-701.

Hutton J C. The internal pH and membrane potential of insulin-secretory granule. *Biochem. J.* 1982; **204**:171-178.

Hutton J C. Insulin secretory granule biogenesis and the proinsulin-processing endopeptidases. *Diabetologia* 1994; **37**[suppl 2]: s48-s56.

Jones P M, Salmon D M W, Howell S L. Protein phosphorylation in electrically permeabilised islets of Langerhans. Effects of Ca^{2+} , cyclic AMP, a phorbol ester and noradrenaline. *Biochem J* 1988; **254**:397-403.

Kiilerich S, Christiansen C. Distribution of serum zinc between albumin and alpha 2-macroglobulin in patients with different zinc metabolic disorders. *Clin. Chim. Acta* 1986; **154**(1):1-6.

Kozłowski R Z, Hales C N, Ashford M L J. Dual effects of diazoxide on ATP-K currents recorded from an insulin-secreting cell line. *Br. J. Pharmacol.* 1989; **97**:1039-1059.

Leahy J L. Increased Proinsulin/Insulin ratio in pancreas extracts of hyperglycemic rats. *Diabetes* 1993; **42**:22-27.

Linde S, Nielsen J, Hansen B, Welinder B. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic analyses of insulin biosynthesis in isolated rat and mouse islets. *J Chromatogr* 1989; **462**: 243-254.

Malaisse W J, Pipeleers D G, Levy J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XVI. A glucose-like and calcium-independent effect of cyclic AMP. *Biochim Biophys Acta* 1974; **362**:121-128.

- Malaisse W J. Effect of somatomedin C upon insulin release. *Med Sci Res* 1988; **16**:939.
- Malaisse W J. Metabolic factors influencing synthesis and secretion of pancreatic islet hormones. En: Samols E, Editor. *The endocrine pancreas*. Raven Press, New York; 1991:73.
- Malaisse W J, Malaisse-Lagae F. The role of cyclic AMP in insulin release. *Experientia* 1984; **40**:1068-1074.
- Malide D, Seidah N G, Chrétien M, Bendayan M. Electron microscopic immunocytochemical evidence for the involvement of the convertases PC1 and PC2 in the processing of proinsulin in pancreatic β -cells. *J. Histochem. Cytochem.* 1995; **43(1)**: 11-19.
- Martín F, Moya F, Gutierrez L M, Reig J A, Soria B. Role of syntaxin in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia* 1995; **38(7)**:860-863.
- Martín F, Reig J A, Soria B. Secretagogue-induced $[Ca^{2+}]_i$ changes in single rat pancreatic islets and correlation with simultaneously measured insulin release. *J Mol Endocrinol* 1995; **15(2)**:177-185.
- Martín F, Ribas J, Soria B. Cytosolic Ca^{2+} gradients in pancreatic islet cells stimulated by glucosa and carbachol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; **235**:465-468.
- Martín F, Salinas E, Vazquez J, Soria B, Reig J A. Inhibition of insulin release by synthetic peptides shows that the H3 region at the C-terminal domain of syntaxin-1 is crucial for Ca^{2+} but not for guanosin 5'-[gamma-thio]triphosphate-induced secretion. *Biochem J* 1996; **320(Pt 1)**:201-205.

Martín F, Sanchez-Andres J V, Soria B. Slow $[Ca^{2+}]_i$ oscillations induced by ketoisocaproate in single mouse pancreatic islets. *Diabetes* 1995; **44(3)**:300-305.

Martín F, Soria B. Amino acid-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in single mouse pancreatic islets of Langerhans. *J Physiol Lond* 1995; **486(Pt 2)**:361-371.

Martín F, Soria B. Glucose-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in single human pancreatic islets. *Cell Calcium* 1996; **20(5)**:409-414.

Masuoka J, Saltman P. Zinc(II) and Copper(II) binding to serum albumin. *J. Biol. Chem.* 1994; **269(41)**:25557-25561.

Melancon P, Glick B S, Malhotra V, Weidman P J, Serafini T, Gleason M L, Orci L, Rothman J E. Involvement of GTP-binding "G" proteins in transport through the Golgi stack. *Cell* 1987; **51(6)**:1053-1062.

Nadal A, Valdeolmillos M, Soria B. Metabolic regulation of intracellular calcium concentration in mouse pancreatic islets of Langerhans. *Am J Physiol* 1994; **267(5 Pt 1)**:E769-774.

Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 1988; **334**:661.

Oberwetter J M, Boyd III A E. High K^+ rapidly stimulates Ca^{2+} -dependent phosphorylation of three proteins concomitant with insulin secretion from HIT cells. *Diabetes* 1987; **36**:864-871.

Orci L, Halban P, Amherdt M, Ravazzola M, Vassalli J D, Perrelet A. A clathrin-coated, Golgi-related compartment of the insulin secreting cell accumulates proinsulin in presence of monensin. *Cell* 1984; **39**:39-47.

Orci L, Halban P, Ravazzola M, Storch M J, Anderson R G, Vassalli J D, Perrelet A. Proteolytic maturation of insulin is a post-Golgi event which occurs in acidifying clathrin-coated secretory vesicles. *Cell* 1987; **49(6)**:865-868.

Orci L, Ravazzola M, Amherdt M, Madsen O, Vassalli J D, Perrelet A. Direct identificación of prohormone conversion site insulin-secreting cells. *Cell* 1985; **42(2)**:671-681.

Orci L, Thorens B, Ravazzola M, Lodish HF. Localization of the pancreatic beta cell glucose transporter to specific plasma membrane domains. *Science* 1989; **245**:295-297.

Orci L, Vassalli J D, Perrelet A. The insulin factory. *Sci. Am.* 1988; **259**:50-61.

Persaud S J, Jones P M, Howell S L. Glucose-stimulated insulin secretion is not dependent on activation of protein kinase A. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1990; **173**:833-839.

Pipeleers D G, In't Veld P A, Pipeleers-Marichal M A, Gepts W, Winkel M van de. Presence of pancreatic hormones in islet cells with MHC-class II antigen expression. *Diabetes* 1987; **36**:872-876.

Pipeleers D G, Kiekens R, Ling Z, Wilikens A, Schuit F. Physiologic relevance of heterogeneity in the pancreatic beta-cell population. *Diabetologia* 1994; **37[suppl 2]**: s57-s64.

Pipeleers D G, Marichal M, Malaisse W J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XIV. Glucose regulation of insular biosynthetic activity. *Endocrinology* 1973; **93**:1001-1011.

Rhodes C, Lucas C, Mutkosky R, Orci L, Halban P. Stimulation to insulin conversion in isolated rat pancreatic islet secretory granules. Association with the ATP-dependent proton pump. *J. Biol. Chem.* 1987; **262**(22): 10712-10717.

Rhodes C, Lincoln B, Shoelson S E. Preferential cleavage of des-31,32-proinsulin over intact proinsulin by the insulin secretory granule type II endopeptidase. *J. Biol. Chem.* 1992; **267**(32): 22719-22727.

Salomon D, Meda P. Heterogeneity and contact-dependent regulation of hormone secretion by individual B cells. *Exp cell Res* 1986; **162**:507-520.

Sánchez-Andrés J V, Ripoll C, Soria B. Evidence that muscarinic potentiation of insulin release is initiated by an early calcium entry. *FEBS Lett.* 1988; **231**:144-147.

Santos R M, Rosario L M, Nadal A, Garcia-Sancho J, Soria B, Valdeolmillos M. Widespread synchronous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflugers Arch* 1991; **418**(4):417-422.

Schuit F C, In't Veld P A, Pipeleers D G. Glucose stimulates proinsulin biosynthesis by a dose-dependent recruitment of pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**:3865-3869.

- Schuit F C, Kiekens R, Pipeelers D G. Measuring the balance between insulin synthesis and insulin release. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1991; **178**:1182-1187.
- Schuppin G T, Rhodes C J. Specific co-ordinated regulation of PC3 and PC2 gene expression with that of preproinsulin in insulin-producing BTC3 cells. *Biochem. J.* 1996; **313**: 259-268.
- Skelly R H, Schuppin G T, Ishihara H; Oka Y, Rhodes C J. Glucose-regulated translational control of proinsulin biosynthesis with that of the proinsulin endopeptidases PC2 and PC3 in the insulin-producing MIN6 cell line. *Diabetes* 1996; **45**: 37-43.
- Soria B. Biofísica del acoplamiento estímulo-secreción en la célula beta pancreática. *An. Real Acad. Nac. Med.* 1989; **106**:17-34.
- Soria B, Chanson M, Giordano E, Bosco D, Meda P. Ion channels of glucose-responsive and unresponsive B-cells. *Diabetes* 1991; **40**:1069-1078
- Tibaduiza E C, Bobilya D J. Zinc transport across an endothelium includes vesicular cotransport with albumin. *J Cell Physiol* 1996; **167**(3):539-547.
- Valdeolmillos M, Nadal A, Contreras D, Soria B. The relationship between glucose-induced K⁺ATP channel closure and the rise in [Ca²⁺]_i in single mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol Lond* 1992; **455**:173-186.
- Valdeolmillos M, Nadal A, Soria B, Garcia-Sancho J. Fluorescence digital image analysis of glucose-induced [Ca²⁺]_i oscillations in mouse pancreatic islets of Langerhans. *Diabetes* 1993; **43**(8):1210-1214.

Valdeolmillos M, Santos R M, Contreras D, Soria B, Rosario L M. Glucose-induced oscillations of intracellular Ca^{2+} concentration resembling bursting electrical activity in single mouse islets of Langerhans. *FEBS Lett* 1989; **259**(1):19-23.

Van De Winkel M, Pipeleers D. Autofluorescence-activated cell sorting of pancreatic islet cells: purification of insulin-containing B-cells according to glucose-induced changes in cellular redox state. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; **114**:835-842.

Wang J L, Corbett J A, Marshall C A, McDaniel M L. Glucose-induced insulin secretion from purified β -cells. *J. Biol. Chem.* 1993; **268**(11): 7785-7791.