

300627



UNIVERSIDAD LA SALLE

12
2ej

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

EFFECTO DE LA PUTRESCINA EN LA SECRECION DE INSULINA POR LAS CELULAS BETA PANCREATICAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MARIA DEL CARMEN FERNANDEZ RIONDA
DIRECTOR DE TESIS: M. en C. JOSE DOMINGO MENDEZ F.

MEXICO, D. F.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

I.- INTRODUCCION	1
II.- ANTECEDENTES	3
A.- Cronología de Algunos Hechos Importantes en el Estudio de la DIABETES y la INSULINA	3
B.-INSULINA: La Hormona Hipoglicemiante del Pancreas	6
a) Química de la insulina.	
b) Biosíntesis y liberación de insulina.	
c) La glucosa regula la síntesis y la secreción de insulina.	
d) El papel del calcio en la secreción de insulina.	
e) El papel del AMP cíclico en la secreción de insulina.	
f) Acción biológica de la insulina.	
C.-EL PANCREAS, LOS ISLOTES DE LANGERHANS Y LAS CELULAS BETA	13
a) El páncreas: glándula mixta. Consideraciones anatómicas.	
b) Anatomía y organización ultraestructural de los islotes de Langerhans.	
c) El metabolismo de la glucosa en los islotes pancreáticos.	
d) Biosociología y ultraestructura de las células beta pancreáticas.	
D.- LAS POLIAMINAS EN LOS EUCARIONTES	16
a) Introducción.	

b) Antecedentes históricos.	
c) Distribución de las poliaminas.	
d) Biosíntesis de las poliaminas en mamíferos.	
e) Inhibidor de ornitina descarboxilasa.	
f) Función de las poliaminas.	
III.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS20
IV.- MATERIAL Y METODOS23
A.- MATERIALES23
B.- OBTENCION Y CULTIVO DE LAS CELULAS BETA PANCREATICAS23
a) Obtención de los islotes de Langerhans.	
b) Disociación de las células beta.	
c) Cultivo de las células aisladas.	
C.-IDENTIFICACION DE LAS CELULAS BETA Y ANALISIS DE LA SECRECION DE INSULINA EN PRESENCIA DE PUTRESCINA25
a) Preparación de las células del islote.	
b) Conjugación de la proteína A a la membrana de los eritrocitos de borrego (oRBC).	
c) Preparación de las cámaras de incubación.	
d) El ensayo hemolítico inverso.	
e) Análisis microscópico de la formación de inmunoplasmas.	
f) Análisis estadístico.	
V.- RESULTADOS31

A.- LAS CELULAS BETA DEL ISLOTE PANCREATICO EN CULTIVO	31
B.- ESTUDIO DE LA SECRECION DE INSULINA DE LAS CELULAS BETA AISLADAS A TRAVES DEL ENSAYO HEMOLITICO INVERSO	31
a) Efecto agudo de la putrescina sobre la secreción de Insulina en las células beta pancreáticas.	
b) Inhibición de la síntesis de putrescina en las células beta en cultivo estimuladas con distintas concentraciones de glucosa.	
c) La secreción de insulina de células beta aisladas en presencia de putrescina en un sistema deficiente de poliaminas.	
C.- ANALISIS DEL EFECTO DE LA PUTRESCINA EN LAS SUBPOBLACIONES FUNCIONALES DE CELULAS BETA INSULARES	36
a) Efecto agudo de la putrescina sobre las subpoblaciones de células beta pancreáticas.	
b) Análisis de las subpoblaciones funcionales de células beta en cultivo cuando se inhibe la biosíntesis de putrescina.	
c) Análisis del efecto agudo de putrescina sobre las subpoblaciones funcionales de células beta pretratadas con DFMO.	
VI.- DISCUSION DE RESULTADOS	42
A.-Efecto agudo de la putrescina sobre la secreción de insulina en las células beta pancreáticas	42
B.-Inhibición de la síntesis de putrescina en las células beta en cultivo estimuladas con distintas concentraciones de glucosa	43
C.- La secreción de insulina de células beta aisladas en presencia de putrescina en un sistema deficiente de poliaminas	43

VII.- CONCLUSIONES45
VIII.- BIBLIOGRAFIA46

I.- INTRODUCCION

Las poliaminas son cationes orgánicas de bajo peso molecular, que se encuentran en forma de bases alifáticas libres así como conjugadas con carbohidratos, esteroides, fosfolípidos y péptidos, y también como unidades subestructurales de numerosas familias de alcaloides.

El grupo de poliaminas que más se ha estudiado lo constituyen la putrescina, la espermidina y la espermina.

Existe información acerca de los efectos biológicos de las poliaminas, éstas actúan como factores de crecimiento en microorganismos y células de mamíferos; estabilizan membranas subcelulares; tienen efectos sobre la síntesis de proteínas y afectan reacciones metabólicas.

Los islotes de Langerhans desempeñan un papel importante en el control del metabolismo. El uso de métodos de fluorescencia citoquímica ha permitido localizar poliaminas en el tejido endocrino del páncreas y se ha demostrado que las poliaminas están restringidas al citoplasma de las células beta productoras de insulina, principalmente asociadas con los gránulos secretores (16).

La aparición de cantidades elevadas de poliaminas en las células beta asociadas con los gránulos secretores condujo a Led Hougaard y colaboradores a sugerir que estas sustancias pueden ejercer un papel en la liberación de insulina estimulada por glucosa funcionando como mensajeros intracelulares (42).

Las poliaminas se requieren para la biosíntesis de proteínas y para la división celular, pero estas moléculas también son sustratos para las transglutaminasas y se ha postulado que tienen una función importante en la liberación de la hormona (42).

Se ha observado que la putrescina y la espermidina son necesarias para mantener la biosíntesis normal de insulina y proteínas que la espermina puede ejercer un papel en otros procesos celulares como la replicación de DNA y la transcripción de RNA, además de participar en la liberación de insulina estimulada por glucosa (422). Estos hallazgos apoyan el punto de vista de que las poliaminas pueden actuar como factores que permiten o estimulan la producción de insulina *in vitro*.

La insulina es la principal hormona secretada por los islotes pancreáticos que controla el almacenamiento y movilización de nutrimentos, tiene un efecto antidiabético, es

decir disminuye la glucosa en sangre, de ahí la relevancia que puede representar dicho estudio, por un lado para entender cómo se regula la biosíntesis y secreción hormonal así como desde el punto de vista del problema salud, teniendo en cuenta el alto índice de diabetes existente en México que ocupa el cuarto lugar entre las causas de mortalidad general. En 1997 este padecimiento provocó 23 mil 500 muertes, con mayor incidencia en Coahuila, Baja California y el D.F., calculándose que el 10 por ciento de la población de 25 años en adelante tiene diabetes.

A pesar de la serie de investigaciones que se han llevado a cabo al respecto, se conoce poco acerca del metabolismo de las diferentes poliaminas durante el cultivo *in vitro* y su relación con la función de las células beta de los islotes, por lo que en la presente investigación se pretende explorar el efecto de las poliaminas sobre la función de las células beta pancreáticas, con particular atención a su papel en la secreción de insulina.

II.- ANTECEDENTES

A.- Cronología de Algunos Hechos Importantes en el Estudio de la Diabetes y la Insulina

1500 aC	Papiro de Ebers describe una enfermedad caracterizada por poliuria.	
10 dC	Descripción clínica.	Celso
20 dC	Se acuña el nombre de "diabetes".	Areteo
1000	Se describen las complicaciones de lo que se conoce actualmente como diabetes sacarina.	Avicenna
1679	Se observa el sabor dulce de la orina en "el mal de la meada".	T. Willis
1788	Descripción de alteraciones pancreáticas en los diabéticos.	Cawley
1850	Se empieza a tratar la diabetes con regímenes diversos.	Bouchardet, Von Noorden, Naunyn, Allen, etc.
1869	Se descubren los islotes pancreáticos.	Langerhans
1870	Se descubre la función glucogénica del hígado (conejo) y la hiperglucemia del diabético.	Bernard
1874	Se describe la hiperpnea de la acetonemia diabética.	Kussmaul
1889	La pancreatectomía en perro produce diabetes experimental.	Von Mering, Minkowsky,
1895	Se menciona la naturaleza hereditaria de la diabetes; se distinguen la diabetes juvenil y tardía.	Naunyn.
1900	Se descubren lesiones de los islotes en los diabéticos.	Opie, Weichselbaum Stangle.
1909	Se da el nombre de "insulina" a una posible hormona de los islotes.	De Meyer
1910-20	Tras la ruta de la insulina.	Zuelzer, Knowlton,

1921	Se descubre la insulina.	Scott, col. Banting, Best.
1923	Mejora la diabetes pancreática después de la hipofisectomía.	Houssay
1925	Se estudian diversas vías metabólicas.	Embden, Cori Ochoa, Lynen Meyerhof, Krebs.
1936	Mejora la diabetes pancreática por suprarrenalectomía.	Lukens, Long.
1937	Se produce diabetes permanente por inyección de extractos de hipófisis.	Young.
1955	Se establece la estructura de la insulina.	Sanger
1967	Descubrimiento de la proinsulina; esclarecimiento de su fórmula.	Steiner, Chance.
1969	Nuevo papel del glucagon. Descubrimiento de la estructura tridimensional de la insulina.	Unger y col. Hodgkin, col

Modificado de Best, C. H., (39)

La diabetes es una enfermedad conocida desde la antigüedad. Los egipcios la mencionan en el Papiro de Ebers (1500 aC). En la época del Imperio romano Celso (10 dC) hace una descripción clínica de ésta, y con el nombre de "urinae nimia profusio" describe las modificaciones causadas en el organismo por dicha enfermedad. El médico griego Areteo de Cappadocia (20 dC) acuña el nombre de diabetes que significa "paso continuo ", " sífon ", para describir la poliuria (5). El describe la enfermedad de la siguiente manera:

"La diabetes es una enfermedad extraña, afortunadamente no se presenta con frecuencia. Consiste en que la carne y los huesos se convierten en orina. La enfermedad se desarrolla lentamente y termina con la muerte. Los pacientes son torturados con una inmensa sed, continuamente beben agua y orinan. La cantidad de orina sobrepasa a la de líquido que ingieren. La enfermedad debe ser provocada por alguna malignidad que se queda en el organismo después de una enfermedad aguda..."

En las primeras descripciones de la diabetes se hace énfasis en la abundancia de la orina. Más tarde se reconoció la dulzura de ésta. No se sabe si las primeras referencias describen la Diabetes mellitus o no insípida. La descripción más antigua sobre la dulzura de la orina data del siglo VI y fue hecha por un escritor de la India, quien llamó a la enfermedad Madhumeha que significa orina de miel. El adjetivo mellitus viene del griego y significa miel.

El estudio químico de la orina diabética fue iniciado por Paracelso en el siglo XVI. Unos cien años después, en 1674, el médico inglés Thomas Willis (5) descubrió la dulzura en la orina de ciertos diabéticos. Dobson comprobó que se trataba de azúcar.

Las primeras observaciones sobre los efectos de la pancreatometomía se hicieron en una época en la que nadie imaginaba la interrelación entre el páncreas y la diabetes. Francisco Silvio en 1682 publicó " Experimentos nuevos sobre el páncreas " trabajo desarrollado durante 10 años. En éste describe cómo los perros sobrevivían aparentemente sanos a la extirpación del páncreas. En 1687 Brunner describió los efectos producidos por la extirpación del bazo donde los animales en su recuperación estaban sedientos y orinaban mucho, esto podría ser a que le extirparan también una parte del páncreas. (13).

El trabajo de médicos como Bouchardat, Naunyn, Von Noorden, Allen y Joslin en 1850 y siguientes dio lugar a un importante avance en el tratamiento de la diabetes con el uso de la dieta.

En 1869, Paul Langerhans en su trabajo de tesis doctoral acerca de la anatomía microscópica del páncreas descubrió los islotes pancreáticos.

En 1870, Bernard descubre la función glucogénica del hígado (conejo) y la hiperglucemia del diabético como un signo cardinal de la enfermedad.

Fue hasta la segunda mitad del siglo pasado cuando hubo un avance en el conocimiento, estudio e investigación en la diabetes. Y como ocurre en la ciencia, que las observaciones importantes son producto de investigaciones diseñadas con un propósito distinto, este caso no iba a ser la excepción. En 1889 los científicos alemanes Minkowsky y Von Mering estaban interesados en estudiar el papel del páncreas en la digestión, para este fin practicaban una pancreatometomía en perros. Uno de sus ayudantes notó que la orina de los perros sin páncreas atraía mucho a las moscas. Este hallazgo llamó la atención de los investigadores que al analizarla encontraron azúcar. Distingueron además que la glucosuria era una consecuencia de la hiperglucemia.

Después de esta serie de descubrimientos muchos investigadores trataron de purificar un extracto del páncreas con el que se pudiese tratar la enfermedad. Schafer en 1916 propuso darle el nombre de insulina a la sustancia producida por los islotes pancreáticos.

Se acredita a los doctores Banting y Best de Toronto con el descubrimiento de la insulina en 1921. Iniciaron sus intentos para aislar el principio activo de la solución interna pancreática en 1920, en un estado suficientemente puro para administrársela a los enfermos. Observaron que este extracto de páncreas de perro disminuía la concentración sanguínea de glucosa e incrementaba la tolerancia a los carbohidratos. Se adoptó el término de insulina para el principio activo de este extracto como había sugerido en 1916 Schafer.

Después de la segunda guerra mundial, Sanger dilucidó la estructura completa de la molécula de insulina. En 1967, Steiner describió la molécula de proinsulina que presenta una actividad biológica pequeña y dos años después Hodgkin y colaboradores descubrieron la estructura tridimensional de la insulina.

B.- INSULINA: LA HORMONA HIPOGLICEMIANTE DEL PANCREAS.

La insulina se descubrió hace 70 años, desde entonces su estructura ha sido determinada por el trabajo pionero de Sanger (33) y Hodgkin, Blundell y colegas (3). Más aún, se han reconocido los efectos principales de la insulina en el metabolismo de los carbohidratos, los lípidos y las proteínas, por lo menos en términos generales durante 20 años, aunque todavía no se tiene una descripción satisfactoria a nivel molecular de cómo actúa esta hormona con su amplio índice de efectos en las células. (7).

a) Química de la insulina.

La insulina es una proteína relativamente pequeña con un peso molecular de 5700 a 6100 daltones. En 1955 Sanger determinó su estructura, siendo la primera proteína secuenciada. Esta molécula está formada por dos cadenas polipeptídicas A y B unidas por dos puentes disulfuro. Existe un tercer puente disulfuro en la cadena A, que da lugar a un anillo dentro de la cadena. La cadena A consta de 21 aminoácidos y la B de 30 en la mayoría de las insulinas. Se conoce la secuencia de aminoácidos de la insulina de por lo menos 25 vertebrados. Las insulinas de peces son muy diferentes de las de mamíferos y la de cobayo difiere por lo menos en 17 aminoácidos.

Se han identificado dos tipos de insulina en la rata, ratón y pez-sapo que derivan de dos genes para insulina (9). Las insulinas de la rata difieren en dos posiciones, B9 y B29, y son no alélicas. En la insulina I de la rata la serina (B9) se transforma en prolina, y en la II la lisina (B29) en metionina (3).

La insulina puede presentarse como monómero, dímero o hexámero. Los dímeros de insulina están en estado cristalino y se encuentran unidos por puentes de hidrógeno. La estructura de la insulina como hexámero consta de tres dímeros colocados alrededor de un eje que contiene dos átomos de zinc (Norman & Litwack., 1987). En presencia de zinc los dímeros se agregan para formar hexámeros (Wiled & Wybren., 1974). Aunque la variedad activa de la hormona no se haya identificado todavía la pregunta acerca de si la forma activa fisiológicamente de la insulina es monomérica o dímica todavía está sin respuesta. (13). La habilidad de la insulina para agregarse como un dímero y hexámero podría ser importante en su mecanismo de acción. Sin embargo, evidencias apuntan que la molécula circula como un monómero en la corriente sanguínea, donde su concentración está en el rango de 10⁻⁹ a 10⁻¹¹ M. Estudios de microscopía electrónica sugieren que la insulina en los gránulos de almacenamiento está en forma cristalina en la rata como cristal romboédrico (3).

La actividad de la insulina como ocurre con muchas otras proteínas está muy relacionada con su estructura tridimensional. Esta ha sido determinada por análisis cristalográfico con rayos X por Hodgkin y asociados. La molécula de insulina se encuentra estabilizada por puentes de hidrógeno y uniones salinas entre grupos de las cadenas A y B. De esta manera cuando se rompen los puentes de hidrógeno ya sea por altas temperaturas o sustancias alcalinas la molécula pierde su actividad aun cuando no se altere la estructura de los aminoácidos. Asimismo, los agentes reductores que actúan sobre los puentes disulfuro ocasionan la pérdida casi por completo de su actividad biológica (13).

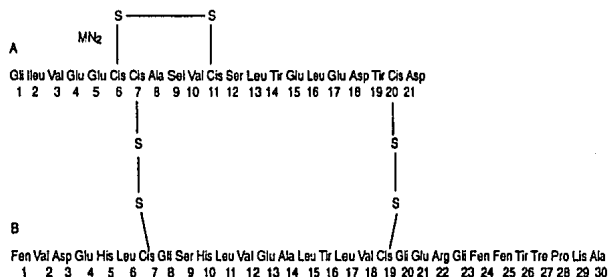


FIGURA 1.- Estructura de la insulina. (34).

b) Biosíntesis y liberación de insulina.

La insulina se sintetiza a partir de dos moléculas precursoras la preproinsulina y la proinsulina en su curso por el retículo endoplásmico rugoso, el aparato de Golgi y los gránulos de secreción recubiertos (27).

En la rata existen dos tipos de preproinsulina I y II, la glucosa estimula preferencialmente la síntesis del tipo I (9).

La hidrólisis enzimática de la preproinsulina deja en el interior del retículo endoplásmico rugoso la proinsulina (una molécula que agrupa las cadenas aminoacídicas de la insulina y un péptido de unión, o péptido C, que engarza el final de una cadena con el principio de la otra). Después ésta es transportada al complejo de Golgi. Existe flujo uniforme de pequeñas vesículas procedentes del retículo endoplásmico rugoso hacia

los sáculos del aparato de Golgi. Al llegar a los sáculos se fusionan con la cisterna cis. Viajan a la siguiente cisterna y se fusionan con ella; este proceso se repite hasta que se alcanza el polo trans. El aparato de Golgi incorpora la proinsulina en los gránulos de secreción recubiertos, donde se lleva a cabo la conversión de ésta en insulina (27).

Para que la insulina se libere a la sangre debe atravesar dos barreras impermeables, la membrana del gránulo y la membrana de la célula beta. Las vesículas secretoras ocupan entre el 10 y 12 % del volumen de las células beta y el contenido total de insulina dentro de las células es aproximadamente 1mM (9). El pH de las vesículas secretoras es de 6, muy cercano al punto isoeléctrico de la insulina. Como la insulina es muy insoluble en estas condiciones, se encuentra dentro de las vesículas como un agregado central de estructura cristalina (13). El pH del citoplasma, en contraste con el de las vesículas, es aproximadamente neutral (9). Conforme el gránulo secretor llega al límite celular por un proceso que aparentemente involucra microtúbulos (13), la membrana del gránulo se fusiona con la membrana celular. En este proceso denominado exocitosis (o emiocitosis como en un principio sugirió Lacy (12), la membrana del gránulo se convierte en parte de la membrana celular y el contenido del mismo se libera a la circulación. La fusión de las membranas permite la secreción de la insulina manteniendo la continuidad de la membrana celular durante todo el tiempo. Una vez secretada al espacio extracelular la insulina pasa al torrente circulatorio por capilares que existen en los islotes de Langerhans (27).

c) La glucosa regula la síntesis y la secreción de insulina.

La función de las células beta está regulada por numerosos compuestos, sin embargo la glucosa es el más importante ya que es el principal estimulante que a su vez es necesario para que muchos de los reguladores secundarios sean efectivos (9).

La glucosa regula la biosíntesis y secreción de insulina. Este carbohidrato en concentraciones fisiológicas estimula la biosíntesis de insulina preferentemente a la de otras proteínas del islote. Compuestos relacionados químicamente con la glucosa o sus triosas estimulan la síntesis y o la secreción de insulina en proporción a su metabolismo en los islotes (9).

La biosíntesis y la secreción de insulina son fenómenos regulados de manera independiente. El umbral para la biosíntesis de insulina es más bajo que para la secreción hormonal, está alrededor de 3 mM de glucosa y su Km es de 6 mM (9).

Incluso los requerimientos iónicos para la biosíntesis de insulina son diferentes que para la secreción. Para la biosíntesis estimulada por glucosa se necesita magnesio extracelular pero no así calcio ni eventos despolarizadores de la membrana. Sin embargo, la secreción de insulina requiere calcio extracelular y que la membrana plasmática se despolarice mientras que el magnesio la inhibe (9).

d) El papel del calcio en la secreción de insulina.

Se sabe que los iones juegan un papel muy importante en la secreción de diversas proteínas de otros tejidos (10).

El proceso de secreción de insulina estimulada por glucosa y otros secretagogos depende de la presencia y participación del calcio (12). La secreción sostenida de insulina requiere un mínimo de 0.1 mM de calcio extracelular y la secreción máxima de 1 a 5 mM (9).

En ausencia de calcio no se observa secreción hormonal, ni cuando el calcio es sustituido por magnesio o berilio. El reemplazo del calcio por cantidades equimolares de estroncio o bario estimula la secreción de insulina normal (12).

El calcio total en el islote se incrementa de 4.7 a 6.9 nM unos minutos después de la estimulación con glucosa (9). Tanto la primera como la segunda fase de la secreción de insulina son dependientes de calcio. Se cree que la primera fase es debida a la movilización intracelular del calcio; mientras que en la segunda están involucradas la utilización de calcio intra y extracelular así como la activación de canales de calcio que dependen de voltaje (13).

Davis y colaboradores mostraron en 1975 que si después de perfundir el páncreas con solución sin calcio se reintroduce calcio se estimula la secreción de insulina. Los islotes de rata perfundidos y expuestos a concentraciones altas de calcio secretan insulina en ausencia de glucosa, la liberación hormonal en este caso es monofásica y decrece gradualmente, aún cuando la concentración extracelular de calcio en el medio no disminuya (13).

La actividad del calcio en el interior de las células beta es cerca de diez mil veces menor que en el medio extracelular, el gradiente electroquímico es enorme. El influjo del catión ocurre por difusión a través de canales de calcio sensibles al voltaje desde las concentraciones milimolares extracelulares a las concentraciones submicromolares de calcio del citosol (9).

Entre los mecanismos que utiliza la célula para mantener este gradiente están: el secuestro de calcio por los organelos citoplasmáticos, la expulsión de calcio de la célula por la acción de una bomba de calcio y el intercambio sodio-calcio.

e) El papel de AMP cíclico en la secreción de insulina.

La estructura del AMP cíclico fue establecida simultáneamente en 1957 por dos grupos de investigadores, Sutherland y Rall, por una parte y Lypkin y Marham por otra. El adenosin-3',5'-monofosfato es un mononucleótido cíclico.

La formación de AMP cíclico se realiza a partir de ATP en presencia de magnesio, siendo catalizada la reacción por la adenilciclase. La adenilciclase es una enzima involucrada en el metabolismo del AMP cíclico en el tejido endocrino pancreático. Esta se encuentra en las membranas de las células y es sensible a los estímulos hormonales y nerviosos a los que responde actuando sobre el ATP para promover la formación de AMP cíclico. La adenilciclase tiene un pH óptimo moderadamente alcalino, por debajo del cual pierde su actividad.

A mediados de los sesenta surgieron evidencias indirectas de la impotencia acerca del papel que el AMP cíclico podría jugar en la secreción de insulina inducida por glucosa (12). Fue precisamente Samols y colaboradores quienes en 1965 sugirieron la idea de que el adenosín-3',5'-monofosfato podría estar actuando como segundo mensajero en las células beta.

Pues bien, concentraciones elevadas de AMP cíclico en el islote son también señales de secreción de insulina. A diferencia del calcio, el AMP cíclico no puede por sí solo liberar insulina necesita una concentración estimulante de glucosa. Desde un punto de vista de mecanismo, las acciones de AMP cíclico y calcio son distintas, pero ambas están interrelacionadas. El influjo de calcio, más que la glucosa "per se", probablemente origina el aumento en AMP cíclico y éste incrementa el calcio iónico en el citosol probablemente movilizándolo de almacenes internos (9).

El AMP cíclico ejerce su función como segundo mensajero activando proteínas quinasas específicas las cuales al catalizar la fosforilación de proteínas individuales, regulan el metabolismo celular.

f) Acción biológica de la insulina.

La insulina es la hormona cuya concentración controla el almacenamiento y movilización de nutrientes. Un nivel elevado de insulina promueve el almacenamiento de triglicéridos, glucógeno y proteínas en el tejido, mientras que niveles bajos favorecen un movimiento de nutrientes hacia el torrente sanguíneo.

La insulina promueve la utilización de carbohidratos para obtener energía, facilitando así su transporte al interior de la célula, en especial la de los tejidos adiposo y muscular. Su actividad es selectiva ya que sólo transporta hexosas y pentosas que tienen la misma configuración en los primeros tres carbonos que la D-glucosa.

La insulina incrementa la velocidad de oxidación de la glucosa en la célula por la vía glucolítica y aumenta la síntesis de glucógeno especialmente en hígado y músculos esqueléticos. El resultado neto de todos los efectos de la insulina es disminuir la concentración de glucosa en sangre.

La insulina afecta el metabolismo de las grasas y las proteínas casi tanto como el de los carbohidratos.

Efecto de la insulina en el metabolismo

Carbohidratos:

CAPTACION, DEPOSITO Y USO DE GLUCOSA POR EL HIGADO	METABOLISMO DE GLUCOSA EN EL MUSCULO	CEREBRO
1) Inhibe la fosforilasa.	1) Durante la mayor parte del día el tejido muscular depende para su energía no de la glucosa sino más bien de los ácidos grasos.	Las células cerebrales son permeables a glucosa sin intervención de la insulina.
2) Aumenta la captación de glucosa de la sangre por las células hepáticas al incrementar la actividad de la enzima glucocinasa que causa la fosforilación inicial de la glucosa después que difunde al interior de las células hepáticas.	2) Aumenta los niveles de glucógeno.	
3) Aumenta la actividad de enzimas que promueven la síntesis de glucógeno (fosfofructocinasa y glucogenosintetasa).		
4) Otros efectos: Promueve la conversión de glucosa hepática en ácidos grasos.		

Grasas:

ACCION INSULINICA	DEFICIENCIA INSULINICA
1) Efecto del exceso de insulina en la síntesis y depósito de grasas: la insulina promueve la lipogénesis activando la lipasa de lipoproteína e impide la lipólisis inhibiendo la lipasa sensible a la hormona. El efecto neto es disminuir la concentración de ácidos libres y triacilglicéridos en el plasma.	1) Aumento del empleo metabólico de grasas: lipólisis del depósito de grasa y liberación de ácidos grasos libres.
	2) Desarrollo del hígado
	3) Aumento de colesterol y fosfolípidos en la sangre en forma de lipoproteínas
	4) Efecto cetógeno y acidótico.
	5) El aumento de los ácidos grasos en el plasma por falta de insulina actúa en las células disminuyendo su utilización de glucosa.

Proteínas:

Síntesis y almacenamiento de proteínas

a.-) Aumenta la captación de aminoácidos por las células.

b.-) Tiene efecto directo en los ribosomas, aumentando la traducción de RNAm y por lo tanto la síntesis de proteínas.

c.-) Inhibe el catabolismo de proteínas.

d.-) En el hígado deprime la gluconeogénesis.

e.-) Efecto sinérgico de la insulina con la hormona de crecimiento. Quizá la necesidad de ambas hormonas se deba en parte al hecho de que cada una promueve la captación celular de una selección diferente de aminoácidos, todos necesarios para lograr el crecimiento.

C.- EL PANCREAS, LOS ISLOTES DE LANGERHANS Y LAS CELULAS BETA.

a) El páncreas: glándula mixta. Consideraciones anatómicas.

En los mamíferos el páncreas endocrino es un órgano separado, constituido por islotes celulares vascularizados que se encuentran distribuidos entre el tejido acinar (13).

Embriológicamente el páncreas de los mamíferos se desarrolla a partir de dos divertículos del duodeno, uno formando parte de la cabeza y el otro formando el resto de la cabeza, cuerpo y cola (18). Las células endocrinas pancreáticas se desarrollan a partir de los conductos pancreáticos, que son de origen endodérmico. Aunque el origen de las células endocrinas del páncreas constituye todavía tema de debate pues se ha postulado que estas células comparten ciertas características con las neuronas, lo que ha llevado a la especulación de que se hayan originado del neuroectodermo (20). En los embriones de rata de 16 días, es posible detectar síntesis de insulina (13).

En los mamíferos las arterias que nutren al páncreas se derivan de las arterias esplénica, hepática y mesentérica. El drenaje venoso lo llevan a cabo las venas esplénica y mesentérica. Los islotes están vascularizados de manera individual por una extensa red de capilares, por una a tres arteriolas y una a seis venas, dependiendo del tamaño del islote. Entrando al islote, las arteriolas terminan abruptamente en capilares (18). Las células endocrinas están dispuestas en columnas o en bandas pequeñas, de esta manera cada célula tiene acceso directo a un capilar para ayudar a la transferencia rápida de las hormonas secretadas al sistema vascular (13).

Los islotes pancreáticos reciben inervación simpática y parasimpática, las terminales nerviosas terminan abruptamente entre los islotes, por fuera de la membrana basal que los rodea. El hipotálamo parece jugar el papel integrador más importante en el balance entre la regulación simpática y parasimpática (13).

Es posible que el sistema nervioso autónomo tenga un efecto modulador en la secreción de insulina en sujetos normales y que juegue un papel en la patogénesis funcional de islotes anormales en pacientes diabéticos (18).

b) Anatomía y organización ultraestructural de los islotes de Langerhans

Los islotes de Langerhans de mamíferos son microórganos típicamente compuestos de unos pocos cientos de células endocrinas (12). Los islotes pancreáticos, de forma y tamaño variables, se encuentran distribuidos entre el tejido acinar, con un mayor número en la cola que en el cuerpo y la cabeza del páncreas.

Los islotes en el páncreas de una rata adulta tienen un tamaño de 50 a 400 μ donde el mayor volumen de islotes está compuesto por islotes medianos, aproximadamente de 200 μ de diámetro. Solamente cerca del 1 % del parénquima pancreático es endocrino. Se ha determinado que el número promedio de islotes observados en el páncreas de rata es de 13500 (18) mientras que en el humano adulto son más de un millón (41).

Los islotes están compuestos por: células beta (B) secretoras de insulina que se localizan predominantemente en el centro de los islotes; células alfa (A) localizadas en la periferia que secretan glucagon y probablemente factor liberador de corticotropina (13), células delta (D) también localizadas en la periferia, que secretan somatostatina.

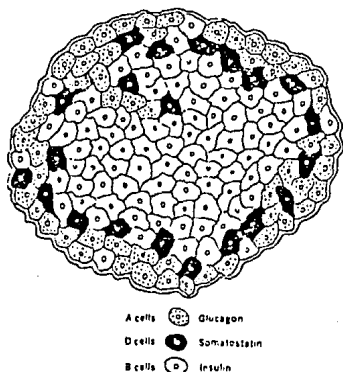


FIGURA 2.- Representación esquemática de las células en un islote pancreático de mamífero. (Orcl & Unger, 1975). La porción endocrina del páncreas humano posee entre uno y dos millones de islotes, cada uno de aproximadamente 300 μ de diámetro.

Existen dos tipos de islotes pancreáticos. En un tipo, agregados centrales de células B productoras de insulina están rodeadas por células D de somatostatina y células A de glucagon. En el otro tipo las células del PP se encuentran en lugar de las células A. Ambos tipos de islotes aparecen normalmente pero no se distribuyen homogéneamente

los islotes ricos en glucagon provienen invariablemente de la cola, cuerpo de la parte superior de la cabeza del páncreas (regiones conocidas también como parte dorsal o esplénica del páncreas), mientras que los islotes ricos en PP siempre aparecen restringidos a la parte media e inferior de la cabeza (también llamada región pancreática ventral o duodenal) (25). En los islotes también existen células endoteliales, células nerviosas y fibroblastos.

La proporción relativa de los diferentes tipos celulares endocrinos es de 75 a 80 % B, 15 a 18 % A y 2 a % 5 D (12). Existen evidencias de que las células en el islote se encuentran polarizadas, con un polo secretor localizado hacia los capilares del islote (13).

En la rata los islotes están rodeados por una membrana basal. Las mitocondrias de las células del islote son relativamente pequeñas comparadas con las mitocondrias de las células acinares adyacentes. Las células de los islotes contienen cantidades variables de retículo endoplásmico rugoso y numerosos polisomas esparcidos por todo el citoplasma.

El aparato de Golgi está generalmente localizado cerca del núcleo. El tamaño del complejo de Golgi varía con el estatus funcional de la célula individual. En la célula de un islote normal, hay relativamente pocos lisosomas; sin embargo, en células en mal estado o en aquellas en la que la secreción hormonal se ha suprimido, se observan diferentes lisosomas. Un sistema de microtúbulo-filamento está presente en las células del islote (18).

Además de los efectos hormonales distales, los diferentes productos secretados por el islote pueden mediar comunicación paracrina entre las células endocrinas como es la función ejercida por hormonas y ciertos nutrientes del torrente sanguíneo (1), es decir, la comunicación intercelular es modulada por diversos neurotransmisores y hormonas.

c) El metabolismo de la glucosa en los islotes pancreáticos.

La actividad secretora de las células beta es regulada por muchos compuestos, no obstante la glucosa es el estimulante de la secreción más importante y, a bajas concentraciones requiere de otros reguladores secundarios para ser efectiva (9).

La ruta más importante para el metabolismo de la glucosa en los islotes es la glucólisis. El transporte de glucosa a través de la membrana de las células es un proceso mediado por acarreador (12).

La mayor parte de las evidencias señalan que la secreción de insulina es causada por una serie de señales que son el resultado del metabolismo de la glucosa (9). Cuando la concentración extracelular de glucosa aumenta, se incrementa la secreción de insulina, paralelamente al metabolismo del azúcar dentro de la célula (12).

También se ha señalado el efecto de la morfología del islote en la secreción de insulina donde diferentes tipos celulares pueden interactuar a través del mecanismo paracrina

(en el espacio intersticial) o bien esta comunicación se puede establecer via un sistema portal vascular local en los islotes (41).

d) Biosociología y ultraestructura de las células beta pancreáticas

De acuerdo con Hedeskov (12), la ultraestructura de una célula beta típica podría describirse como sigue: la membrana plasmática delimita al citoplasma donde se encuentran el núcleo con nucleolo y cromatina condensada, mitocondrias pequeñas esparcidas en el citoplasma, retículo endoplásmico rugoso concentrado a un lado del núcleo, aparato de Golgi y poco retículo endoplásmico liso.

Existen además numerosos polisomas, lisosomas, microtúbulos y microfilamentos y gránulos secretorios característicos, que contienen virtualmente a toda la insulina. En el espacio entre el retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi se localizan microvesículas, especialmente durante la síntesis de insulina.

La exquisita sensibilidad a glucosa de la célula beta del páncreas juega un papel determinante en el control hormonal de la homeostasis de la glucosa. La respuesta de la célula beta está caracterizada por una descarga rápida de la hormona y por una dosificación precisa de la cantidad liberada (29).

Aunque las células beta, se piensa generalmente que son idénticas y que funcionan de una manera sincrónica, se están acumulando evidencias acerca de su heterogeneidad tanto en estructura como función (41). Investigadores en Toronto, Ginebra, Suecia y Boston han mostrado que la célula beta tiene un potencial de replicación muy pobre. En el islote adulto sólo el 3 % de las células presentan actividad mitótica (30).

Pipeleers (30) describe tres niveles en la organización sociológica de las células beta pancreáticas. El primero es la coexistencia de distintos tipos celulares cuyo impacto biológico es la complementariedad en funciones.

El segundo nivel lo constituye el estado agregado celular que potencia la respuesta celular, es decir, confiere una organización intracelular que facilita el proceso de transporte y liberación de la hormona. Y por último, el tercer nivel o estadio que lo componen las interacciones sinérgicas con las señales del medio que conllevan a la integración y coordinación en la homeostasis de la glucosa.

D.- LAS POLIAMINAS EN LOS EUKARIOTES

a) Introducción.

Las poliaminas entre las que destacan espermina, espermidina y su precursor 1,4-diaminobutano (putrescina) son cationes orgánicos de bajo peso molecular, moléculas de naturaleza no proteica, que se encuentran en forma de bases alifáticas libres así

como conjugadas con carbohidratos, esteroides, fosfolípidos y péptidos, y también como unidades subestructurales de numerosas familias de alcaloides.

El descubrimiento de la función esencial de las poliaminas en la regulación de múltiples procesos, entre ellos la división, proliferación y diferenciación celulares constituye un indicativo de que su presencia es esencial para la realización de los procesos básicos de la función celular.

b) Antecedentes históricos.

La presencia de poliaminas en materiales biológicos se reportó hace más de 300 años. Fue en 1678 cuando Antoni van Leeuwenhoek descubrió la cristalización de la espermina en el semen humano.

En 1791, Nicolas Vauquelin redescubrió esos cristales en el fluido seminal y demostró su relativa insolubilidad en agua y etanol, concluyendo que eran sales de fosfato de un catión inorgánico, probablemente calcio.

A pesar de que fueron muchos los investigadores que describieron dichos cristales, no fue hasta un siglo después cuando se identificó la naturaleza de esta sustancia cristalizada.

En 1865, Boettcher supuso que estaban formados de una proteína a la que llamó espermatina.

Se atribuye a Schreiner, en 1878, el descubrimiento de que los cristales son sales de fosfato de un compuesto orgánico básico simple.

En 1888, A. Landenburg y J. Abel, dieron el nombre de espermina a esta base orgánica por encontrarse en cantidades altas en el semen humano.

Fue hasta 1926, cuando finalmente Otto Rosenheim determinó la estructura química de la molécula de espermina, sintetizando después otra base identificada como fosfato de espermidina.

$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$	Putreína
$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$	Espermidina
$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$	Espermina

Estructura química de las poliaminas

Una vez dilucidada la estructura de la espermidina, ésta fue aislada de órganos animales, microorganismos y plantas, resultando ser una poliamina universal (23).

El descubrimiento de la putrescina y cadaverina se atribuye a Brieger en 1885 que las aisló como sales dobles de metales pesados del tejido animal (de carne putrefacta y se creyó que era un producto de descomposición (11), posteriormente se aislaron a partir de cultivos bacterianos y tejidos de plantas generalmente en estado de putrefacción o fermentación.

c) Distribución de las poliaminas.

Las poliaminas están ampliamente distribuidas en los sistemas biológicos, aunque las concentraciones relativas de putrescina, espermidina y espermina varían notablemente en células diferentes.

En general, se sabe que los procariontes tienen concentraciones mayores de putrescina que de espermidina y que no contienen espermina a diferencia de los eucariontes que poseen bajas concentraciones de putrescina y contienen espermina y espermidina (22).

Actualmente se ha demostrado que en los mamíferos los niveles tisulares son mayores en órganos con síntesis activa de ácido ribonucleico (RNA), tal es el caso de la médula ósea, la próstata y el páncreas.

d) Biosíntesis de las poliaminas en mamíferos.

La putrescina se forma a partir de la l-ornitina en una reacción catalizada por la ornitina descarboxilasa (ODC) (E.C. 4.1.1.17) y es convertida a espermidina por una sintetasa específica que utiliza S-adenosilhomocisteína (forma descarboxilada de la S-adenosil metionina), como donador de un grupo propilamina.

La espermina sintetasa convierte la espermidina en espermina con el mismo donador de grupos propilamina. La l-ornitina requerida para la biosíntesis de putrescina se obtiene por hidrólisis de l-arginina en la reacción catalizada por arginasa (E.C. 3.5.3.1) en el interior de las células. Posiblemente esta enzima se encuentre presente en tejidos extrahepáticos para facilitar la disponibilidad de la ornitina utilizada en la biosíntesis de poliaminas. Debido a esto se cree que la arginasa regula la etapa inicial de dicha biosíntesis.

La ornitina disponible proviene del plasma. La l-arginina es un aminoácido semiesencial en mamíferos ya que se sintetiza en el ciclo de la urea y existen diferentes vías metabólicas que compiten por su utilización, por lo que sus niveles generalmente son bajos; una de estas vías es la biosíntesis de poliaminas.

Los microorganismos y los vegetales poseen vías alternas para la biosíntesis de poliaminas (23). Cuando aumenta la síntesis de poliaminas se ha visto que también aumenta la actividad de arginasa lo que asegura el suministro de ornitina.

e) Inhibidor de ornitina descarboxilasa.

El inhibidor de la síntesis de poliaminas que se ha estudiado más es la DL- α -difluorometilornitina (DFMO) que fue sintetizado por Metcalf y colaboradores (1978) de naturaleza altamente específica (28) y cuyo mecanismo de acción es irreversible.

La DFMO se ha usado para inhibir la biosíntesis de putrescina in vivo e in vitro. Su toxicidad in vivo es muy baja (38).

El mecanismo de acción ocurre de la siguiente manera: ODC reconoce a DFMO como sustrato y su descarboxilación conduce a la generación de un intermediario electrofílico altamente reactivo que reacciona con un centro nucleofílico en el sitio activo de la enzima para formar un enlace covalente inactivándolo irreversiblemente. Esta inactivación está acompañada por la liberación de dióxido de carbono del grupo carboxílico de la DFMO (28).

Debido a la inhibición de la replicación celular por DFMO existe un interés considerable en el uso terapéutico potencial de este compuesto. En particular, se han llevado a cabo numerosos estudios en animales que muestran su efectividad en la inhibición del crecimiento de tumores, en el tratamiento de infecciones parasitarias, etc. (38).

f) Función de las poliaminas.

Existe información acerca de los efectos biológicos de las poliaminas, éstas actúan como factores de crecimiento en microorganismos y células de mamíferos; estabilizan membranas celulares y partículas subcelulares; tienen efectos sobre la síntesis de proteínas y afectan reacciones metabólicas.

Durante los últimos 25 años se han elucidado las rutas biosintéticas, y se han llevado a cabo muchos estudios que indican claramente que estas aminas son importantes fisiológicamente (37) aunque su función en las células de los mamíferos permanece todavía un misterio (28).

III HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Las poliaminas son cationes alifáticos íntimamente relacionados con la diferenciación celular, la síntesis macromolecular y el crecimiento en numerosos sistemas celulares (42). Precursores de la biosíntesis de las poliaminas como son la arginina y la ornitina presentan una acción insulínica en los islotes pancreáticos. Esto se ha atribuido principalmente a los efectos biofísicos de despolarización de la membrana por la acumulación de este aminoácido cargado positivamente cerca de la membrana plasmática de la célula beta (21),(2).

Estudios recientes llevados a cabo por Hougaard y colaboradores (16) han mostrado claramente que la mayoría de las poliaminas se encuentran restringidas al citoplasma de las células beta productoras de insulina, en los gránulos secretorios. Se han postulado efectos antagónicos de las poliaminas sobre la secreción de insulina. Por un lado, la glucosa estimula la biosíntesis de las poliaminas.

También se ha asociado a las poliaminas con el calcio. Se ha dicho al respecto, que éstas podrían funcionar como mensajeros para generar el flujo de calcio a la célula y movilizándolo el calcio intracelular vía una reacción de intercambio de cationes (17). Estos hallazgos llevaron a especular que las poliaminas pueden estimular la liberación de insulina, bien actuando como sustratos para las transglutaminasas (4) o funcionando como mensajeros secundarios.

Contrariamente, Thams y colaboradores (40) sugieren un papel inhibitorio de las poliaminas en la secreción de insulina, proponiendo que estas moléculas inhiben a la proteína quinasa C (31).

En los mamíferos la biosíntesis de poliaminas se lleva a cabo a partir de ornitina, por lo tanto, la ruta que conduce a la formación de putrescina es a través de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC, EC.4.1.1.17), además se cree que la descarboxilación de la ornitina es limitante en la regulación de los pasos biosintéticos de las poliaminas.

Yung y Green (43) reportaron que las poliaminas con alto número de grupos amino presentan un efecto tóxico mayor probablemente debido a la combinación de interacciones directas entre las poliaminas y los fosfolípidos de la membrana plasmática y la conversión de las poliaminas en aldehídos tóxicos (42).

Por estas razones, nosotros decidimos analizar el efecto de la putrescina sobre la secreción de insulina en células beta aisladas y cultivadas, probando su efecto en dis-

tintas concentraciones de glucosa. Trabajamos con la putrescina por tratarse de la poliamina precursora de la biosíntesis de la espermidina y la espermina así como por ser la que tiene menor número de grupos amino.

La mayor parte del conocimiento de la fisiología de las células beta con respecto a las poliaminas ha sido derivado de estudios realizados en la población mixta celular del islote pancreático, en islotes pancreáticos completos. Esto presenta limitaciones ya que los islotes aislados y perfundidos no proporcionan información sobre el comportamiento de las células individuales, por las uniones comunicantes que existen entre las células beta y entre éstas y las células alfa y delta. Asimismo, las células del islote dispersadas dan información sobre la población mixta del islote, sin diferenciar unas células de las otras.

Como se ha puesto de manifiesto, no resulta claro el comportamiento de las poliaminas en la secreción de insulina.

Si las poliaminas actúan sobre el metabolismo de la glucosa, ya sea aumentando la concentración intracelular de calcio o como mensajeros secundarios, entonces tendrán un efecto estimulador sobre la secreción de insulina, estimulada con distintas concentraciones de glucosa.

OBJETIVOS

El propósito general de este estudio es el de avanzar en el conocimiento de la función de las pollaminas y su posible modulación de la respuesta secretora de las células beta pancreáticas.

Los objetivos específicos planteados en este trabajo de investigación son:

- 1) Caracterizar el efecto de la putrescina sobre la secreción de insulina estimulada con distintas concentraciones de glucosa de células beta aisladas y cultivadas.
- 2) Evaluar el efecto de la inhibición de la síntesis de putrescina en las células beta en cultivo al estimularlas con distintas concentraciones de glucosa.
- 3) Analizar el efecto de la putrescina sobre las subpoblaciones de células beta insulares.

IV.- MATERIAL Y METODOS

A.- MATERIALES.

Procedencia de los reactivos para el cultivo y el RHPA:

Colagenasa tipo IV (EC 3.4.24.3) Worthington Biochemical Corporation (Freehold, NJ, USA); albúmina bovina, solución de penicilina-estreptomicina, proteína A, solución de sales Spinner Eagle (SS), glutaraldehído, solución de sales balanceadas Hanks (HBSS), cloruro de cromo, D(+) glucosa, azul de toluidina, IBMX, hidrobromuro de poli-l-lisina, putrescina, hepes, heparina de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO., USA); anticuerpo contra insulina de Biodesign International (Kennebunkport, ME., USA); suero bovino fetal, complemento de cobayo, RPMI 1640, solución de Alsever, antibiótico antimicótico, l-glutamina (200 mM), gentamicina de Gibco Laboratories (Grand Island, NY, USA); difluorometilornitina (Francia).

B.- OBTENCION Y CULTIVO DE LAS CELULAS BETA PANCREATICAS.

Se aislaron los islotes pancreáticos de ratas macho, adultos jóvenes de 250 a 300 g de la raza Wistar y se siguieron las tres técnicas que se mencionan a continuación para obtener las células: 1) Obtención de los islotes de Langerhans por digestión con colagenasa y toma manual de los islotes (19) Disociación de las células beta (14) y 3) Cultivo de las células aisladas.

Nota: A todas las soluciones que se emplearon en el ensayo y en el cultivo se les añadió 0.1 % de albúmina sérica bovina (BSA) como nutriente y 1 % penicilina-estreptomicina.

a) Obtención de los islotes de Langerhans.

a.1) Se anestesiaron las ratas con 60 mg/kg de peso de pentobarbital vía intraperitoneal.

a.2) La disección se llevó a cabo en condiciones limpias, no estériles. Para ello se localizó la desembocadura del conducto biliar-pancreático a la altura de su unión con el conducto biliar y se inyectaron aproximadamente 10 ml de solución de Hanks con 50 ul /ml de gentamicina para romper el tejido acinar del páncreas y facilitar la posterior

FIGURA 4.: DIAGRAMA DEL CULTIVO

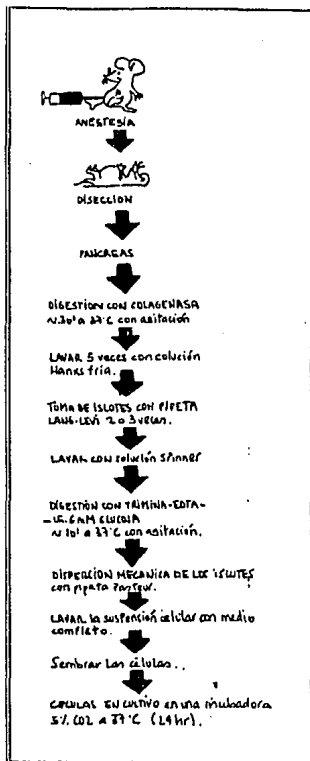


FIGURA 4.- Diagrama del cultivo.

digestión con colagenasa. Después se separaron la cola y el cuerpo del páncreas que se distinguen fácilmente una vez insuflados.

a.3) El páncreas se lavó dos veces. Se trituró y se colocó en una botella con colagenasa a una concentración final de aproximadamente 1 mg/ml. Posteriormente se incubó durante 30 minutos a 37 °C con agitación constante.

a.4) El tejido digerido se lavó dos veces con Hanks frío y se procedió a filtrarlo a través de tamices de distinto tamaño de malla de mayor a menor apertura con la finalidad de limpiar los islotes de tejido acinar y por lo tanto optimizar las condiciones de selección de los islotes.

a.5) La selección manual de los islotes de Langerhans se llevó a cabo utilizando una pipeta volumétrica Lang-Levi, bajo un microscopio de disección. La toma de islotes se realizó por lo menos dos veces para que aunado al proceso de filtración los islotes quedasen limpios de tejido acinar y evitar que las enzimas digestivas liberadas por éste digirieran las células endocrinas.

b) Disociación de las células beta.

Se lavaron los islotes con solución balanceada de Spinner (SS), que no tiene calcio y se incubaron 10 minutos en SS enriquecido con 0.5 % BSA y glucosa 15 mM, y tripsina a 37 °C, en ambiente húmedo y agitación constante.

Finalizada la incubación se dispersó el tejido con una pipeta Pasteur haciendo entrar y salir el tejido de la pipeta aproximadamente unas 40 veces.

Posteriormente la suspensión celular se lavó con SS y dos veces con RPMI 1640 sedimentando las células por centrifugación a 80 x g durante 10 minutos en cada ocasión.

c) Cultivo de las células aisladas.

Después del último lavado, las células se resuspendieron en RPMI 1640 y se sembraron en cajas de Petri para cultivo de tejidos, unas con medio completo: RPMI 1640 con 10 % de suero bovino fetal, 2 % de glutamina, glucosa, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 0.1 mM y 1 % de penicilina-estreptomicina-fungizona, y otras con medio completo y DL-difluorometilornitina (DFMO) 5mM.

Las células se cultivaron durante 24 hr a 37 °C en una incubadora con ambiente húmedo con aire y 5% de CO₂ para mantener el medio a un pH de 7.4 .

C.- IDENTIFICACION DE LAS CELULAS BETA Y ANALISIS DE LA SECRECION DE INSULINA EN PRESENCIA DE PUTRESCINA

La identificación de las células beta se llevó a cabo a través del ensayo hemolítico

inverso (RHPA) Jerne en 1974 (36) desarrolló para estudiar el sistema inmune el ensayo hemolítico que detecta la secreción de anticuerpos (Inmunoglobulina) por linfocitos B. El ensayo hemolítico inverso (RHPA) es una modificación del ensayo original. Neill y Frawley (34) lo han utilizado para estudios de secreción de células pituitarias (1983) mientras que Salomon y Meda (32) han empleado este ensayo para estudiar la regulación dependiente del contacto intercelular en la secreción de insulina (14). El ensayo modificado se llama inverso porque las células secretan el antígeno del sistema. Este método explota el fenómeno de la hemólisis mediada por complemento, en presencia de complejos antígeno-anticuerpo. Este método puede usarse para estudios en cualquier tipo de células que secreten una sustancia inmunogénica. La presencia de una placa (zona de hemólisis) que rodea a la célula la identifica como de cierto tipo (dependiendo del anticuerpo empleado) y el tamaño de la placa está directamente relacionado con la cantidad de hormona secretada. De manera que proporciona información cualitativa y cuantitativa (36). El uso del RHPA permite identificar sin ambigüedad una célula en una población celular mixta de acuerdo con la hormona que secreta.

En la figura 5 se muestra una representación esquemática del mecanismo de hemólisis mediada por complemento en presencia de un complejo antígeno-anticuerpo.

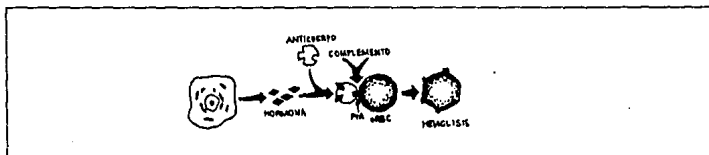


FIGURA 5.- Representación esquemática del mecanismo de hemólisis mediada por complejos antígeno-anticuerpo, en presencia de complemento. (36).

Se incuban en una monocapa, células endocrinas y eritrocitos-A; las células endocrinas son estimuladas a secretar la hormona específica en presencia de anticuerpos contra la misma. La hormona (hacia la que se dirige el anticuerpo) se libera de las células y se une al anticuerpo que a su vez está unido a la proteína A conjugada con los eRBC. Se forman entonces complejos antígeno-anticuerpo unidos a la membrana de los eritrocitos-A. Cuando a continuación se añade el complemento, los eritrocitos alrededor de las células secretoras se lisan, quedando rodeada la célula endocrina de una placa (36).

El RHPA puede subdividirse en 5 etapas:

- a) Preparación de las células del islote.

- b) Conjugación de la proteína A a la membrana de los eritrocitos de borrego (oRBC).
- c) Preparación de las cámaras de incubación.
- d) El ensayo hemolítico inverso.
- e) Análisis microscópico de la formación de inmunoplasmas.

a) Preparación de las células del islote

El ensayo en placa requiere células monodispersadas para una identificación no ambigua de las células secretoras.

Las células que están en cultivo, adheridas a las cajas de Petri antes de empezar el ensayo se despegaron con solución dispersante sin calcio ni magnesio. Se incubaron durante 10 minutos a 37 °C y se disociaron con una pipeta Pasteur silicizada. Finalmente se lavaron tres veces con solución balanceada de Hanks para resuspenderlas después del último lavado a una concentración de 100 a 200,000 células /ml.

b) Conjugación de la proteína A a la membrana de los eritrocitos de borrego (oRBC).

Los eritrocitos de borrego se conjugan con la proteína A para que unan anticuerpo a su membrana, para ello se aprovecha la alta afinidad que presenta la proteína A del *Staphylococcus aureus* por cierto tipo de inmunoglobulinas G. Así, en presencia de cloruro de cromo, la proteína A se une covalentemente a la superficie de los oRBC.

El acoplamiento de la proteína A a la membrana de los eritrocitos se llevó a cabo de la siguiente manera:

b.1) La sangre de borrego se centrifugó a 150 x g durante 10 minutos. Se extrajo el sobrenadante y los eritrocitos se lavaron 3 veces con solución salina. Los eritrocitos se conservan de esta manera hasta tres semanas en refrigeración en solución de Alsever.

b.2) Se lavó 1 ml de eritrocitos sedimentados tres veces, centrifugándolos a 150 x g durante 10 minutos y resuspendiéndolos en solución salina.

b.3) Después del último lavado se llevó a cabo el marcaje que consiste en la adición de 2.5 ml de solución salina, 0.5 ml de proteína A (1 mg/ ml en solución salina) y 2.5 ml de cloruro de cromo (0.2 mg/ ml en solución salina).

b.4) La suspensión se colocó en un baño a 30 °C por una hora. Los eritrocitos marcados se lavaron dos veces con solución salina y una vez con RPMI 1640 y se guardaron en una suspensión al 2 % a 4 °C hasta por una semana.

c) Preparación de las cámaras de incubación.

El RHPA se llevó a cabo en las cámaras de Cunningham (6) donde la mezcla de células beta y oRBC se adhiere como una monocapa. Las cámaras están construidas para aumentar la difusión lateral de la hormona secretada, de manera que se concentren grandes cantidades de hormona alrededor de las células.

Los portaobjetos usados en la construcción de las cámaras de Cunningham se cubren con poli-L-lisina para que se adhieran firmemente las células endocrinas y los oRBC como una monocapa. Los portaobjetos deben estar limpios previamente al tratamiento con poli-L-lisina para asegurar una cubierta homogénea. Estos se cubren con poli-L-lisina (0.5 mg/ ml Tris a pH de 8.20) por lo menos durante 10 minutos, después se lavan con agua destilada 5 veces y se secan al aire (36).

Las cámaras se construyeron de la siguiente manera: sobre el portaobjetos se colocaron dos tiras de cinta adhesiva que pega por los dos lados a una distancia una de la otra de aproximadamente 20 mm. Encima de las cintas adhesivas se puso un cubreobjetos de vidrio que constituye el techo de la cámara. El volumen de las cámaras es de 30 a 50 μ . Al estar abiertas por los dos lados, las soluciones son introducidas por capilaridad en un extremo y retradas por el lado contrario con papel absorbente.

d) El ensayo hemolítico inverso

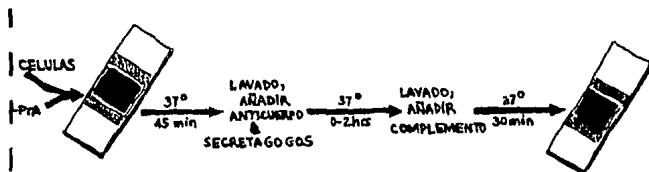


FIGURA 6.- Método utilizado para realizar el ensayo hemolítico inverso, para detectar secreción hormonal de células aisladas, en una población celular mixta. (36)

La figura 6 muestra el método utilizado para realizar el RHPA.

El ensayo se inicia con la introducción de una mezcla de las células del islote pancreático y los oRBC en las cámaras de Cunningham para que se peguen en el suelo de la cámara. La mezcla de células se preparó mezclando volúmenes iguales de células del islote y de una suspensión al 18 % de eritrocitos marcados durante 45 minutos.

Después de que las células se adhirieron, se lavaron para desplazar las células que no se pegaron. Entonces se introdujo en la cámara el anticuerpo contra insulina. Dicho antisuero se agregó en una dilución de 1:50 en Hanks junto con los secretagogos de interés que en este trabajo fueron glucosa 5.6 y 15.6 mM y putrescina 1 mM, y se incubó por una hora.

Durante el período de incubación en el que el antisuero está presente, la insulina se libera de las células beta y se une al anticuerpo formando complejos antígeno-anticuerpo unidos a la membrana de los eritrocitos marcados.

Finalizado el tiempo de incubación se lavaron de nuevo las células con Hanks para remover anticuerpos no ligados, secretagogos y hormonas que son secretadas por otras células pero que no son reconocidas por el anticuerpo.

Para el desarrollo de las placas se introdujo el complemento de cobayo en una dilución de 1:30 en Hanks y se dejó en incubación 30 minutos. Terminada la incubación, las células se fijaron con glutaraldehído al 4% en solución salina y se tiñeron con azul de toluidina y se guardaron las cámaras hasta el momento de su análisis.

e) Análisis microscópico de la formación de inmunoplasmas

El análisis de las inmunoplasmas comprende dos categorías principales: 1) Determinación del porcentaje de células formadoras de placa y 2) medición del área de la placa.

e.1) Se contaron las células en cada cámara (alrededor de 100 células por cámara). Se anotó el número de células que formaron placa y las que no, convirtiendo estos datos en porcentajes. Para este propósito se utilizó un microscopio invertido de contraste de fases a un aumento de 20 x. Para distinguir con mayor facilidad las células se tiñeron con azul de toluidina.

e.2) Se midió el área de las placas bajo el microscopio Nikon Axophot conectado a una cámara de video que proyecta la imagen en una pantalla y se calculó el área.

La actividad secretora total de las células beta se estimó calculando el índice de secreción, multiplicando el área promedio de las placas por el porcentaje de las células formadoras de placa (secretoras) (15).

La relación entre el área de las placas y la liberación de insulina es lineal.

Para todos los experimentos de RHPA cada condición experimental se llevó a cabo por duplicado.

La distribución de frecuencia de las áreas de las inmunoplasmas se llevó a cabo con la finalidad de determinar si habían subpoblaciones de células beta definidas funcionalmente (15). Las curvas se suavizaron con el programa Sigma Plot 3.3 (Jandel Scientific, Corte Madera, CA, 1987).

f) Análisis estadístico.

La validación estadística de los resultados se realizó aplicando en primer término análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguida por las pruebas de Fisher y de Duncan utilizando el programa Number Cruncher Statistical System (NCSS, versión 4.2 publicado por el Dr. Jerry L. Hintze, Kaysville, Utah, 1983). Los datos antes de procesarlos estadísticamente se normalizaron. Esto se realizó multiplicando el área de las inmunoplasmas en cada condición experimental por su factor de secreción promedio correspondiente. Todos los resultados se expresaron como la media \pm SEM.

V.- RESULTADOS

A.- Las células beta del islote pancreático en cultivo

En la figura 7 se muestran varios islotes de Langerhans que se obtuvieron después de la digestión con colagenasa por selección manual.

La figura 8 ilustra células del islote pancreático de rata obtenidas por la dispersión mecánica de los islotes en solución sin calcio.

B.- Estudio de la secreción de insulina de las células beta aisladas a través del ensayo hemolítico inverso

El ensayo hemolítico inverso (RHPA) nos permitió identificar las células beta y además caracterizar su patrón de secreción.

En la figura 9 tenemos tres células beta del islote pancreático de rata adulta. Se observa la monocapa de eritrocitos marcados con proteína A (eritrocitos-A) intactos en todo el campo a excepción del área oscura alrededor de las células, que corresponde a los fantasmas de eritrocitos-A. La hemólisis de los eritrocitos-A se desencadenó por la

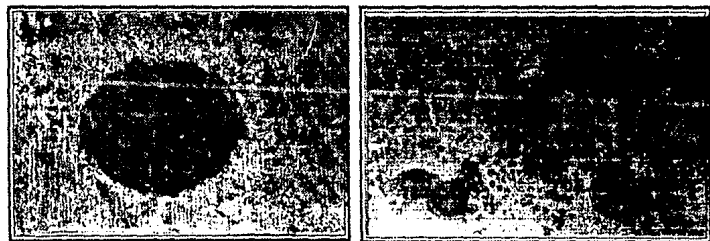


FIGURA 7.-Islotes pancreáticos de rata adulta en cultivo. Los islotes fueron obtenidos por la digestión del tejido acinar pancreático con colagenasa.



FIGURA 8.- Células del islote pancreático de la rata.

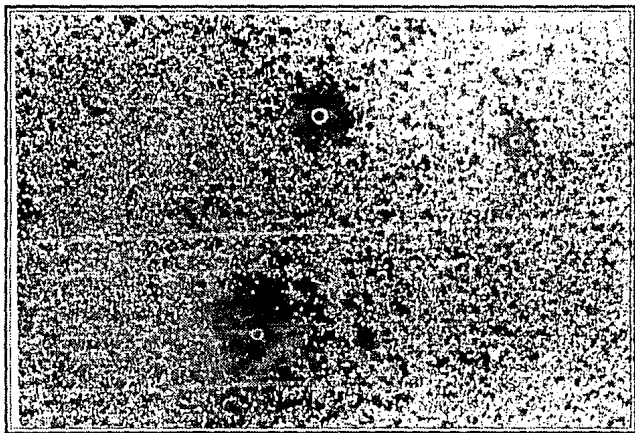


Figura 9.- Identificación mediante el ensayo hemolítico inverso de tres células beta del islote pancreático de rata. Las células beta ante el mismo estímulo responden formando inmunoplaques pequeñas, otras medianas y otras grandes

unión de la insulina secretada por la célula beta al anticuerpo contra insulina y a su vez a los eritrocitos-A, en presencia de complemento.

En el análisis de las inmunoplasmas se midieron alrededor de 50 a 100 células con su correspondiente duplicado. Se tomaron en cuenta únicamente las células aisladas ya que los acúmulos conservan las uniones comunicantes intercelulares presentando un comportamiento secretorio diferente al de las células aisladas.

a) Efecto agudo de la putrescina sobre la secreción de insulina en las células beta pancreáticas.

El efecto agudo de la putrescina de acuerdo al estado metabólico de la célula y las concentraciones basal y estimulada de glucosa fue el siguiente:

Como puede observarse en la figura 10, la secreción basal de insulina (glucosa 5.6 mM) no se ve afectada por la adición de putrescina. Sin embargo, cuando la concentra-

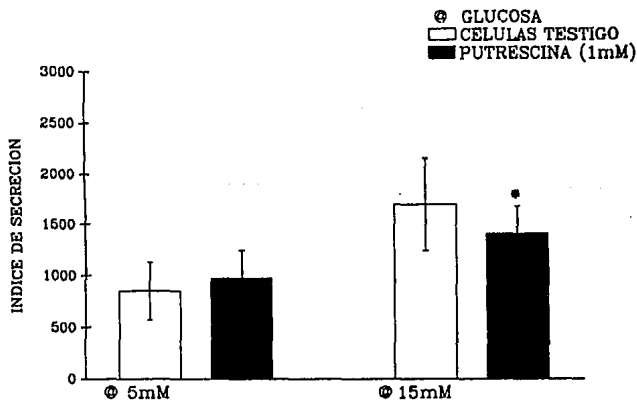


FIGURA 10.- Efecto de la putrescina sobre la secreción de insulina de células aisladas. A baja concentración de glucosa el índice de secreción no es estadísticamente significativo entre los dos grupos. Sin embargo, a concentración estimulante de glucosa la putrescina reduce en un 25 % el índice de secreción. * $P < 0.01$ con respecto al testigo.

ción de glucosa es alta, la pollamina redujo el índice de secreción de 1902 ± 132 a 1429 ± 102 ($P < 0.01$), es decir un 25 %.

Esto nos muestra un efecto inhibitorio de la putrescina sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa.

b) Inhibición de la síntesis de putrescina en las células beta en cultivo estimuladas con distintas concentraciones de glucosa.

Al inhibir la síntesis de putrescina con el inhibidor DFMO se observó un aumento en el índice de secreción de insulina en ambas concentraciones de glucosa, como ilustra la figura 11.

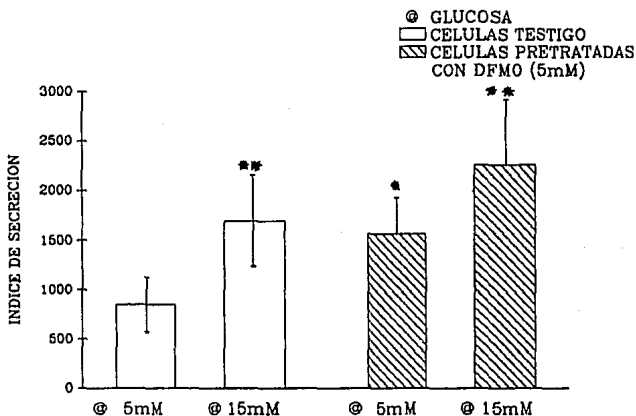


FIGURA 11.- Efecto del inhibidor de la biosíntesis de putrescina (DFMO) sobre la secreción de insulina de células beta pancreáticas. En ambos casos el aumento en la concentración de glucosa incrementó significativamente el índice de secreción de insulina (* $P < 0.01$). El tratamiento con DFMO aumentó la secreción hormonal con respecto al control. En glucosa 5 mM este aumento fue más notorio (* $P < 0.01$) que en alta concentración de glucosa (** $P < 0.05$).

En 5.6 mM de glucosa el índice de secreción de las células testigo fue de 1164 ± 108 mientras que en las células pretratadas con DFMO fue de 1639 ± 112 lo que representa un aumento del 41 % en la secreción de insulina por parte de las células beta pancreáticas deficientes de putrescina ($P < 0.01$).

En 15.6 mM de glucosa el índice de secreción fue de 1902 ± 132 y 2321 ± 165 en las células testigo y en las células pretratadas con el inhibidor de la biosíntesis de poliaminas, respectivamente. En concentración estimulante de glucosa, el aumento en el índice de secreción resulta más moderado que en condiciones basales, incrementando la secreción de insulina en un 22 % ($P < 0.05$).

Por consiguiente, la disminución de esta poliamina en el sistema resulta en una mayor liberación de insulina de las células beta en condiciones basal y estimulante de glucosa.

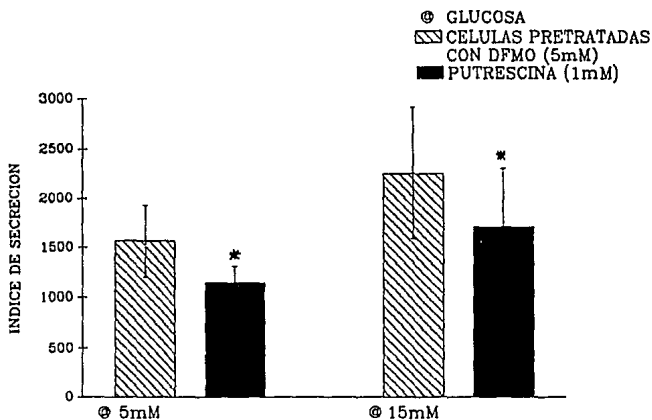


FIGURA 12.- Efecto de la putrescina sobre la liberación de insulina de células aisladas pretratadas con DFMO (5 mM). Se observa una clara disminución de alrededor de un 25 % en la secreción basal y estimulada de insulina de las células beta pancreáticas (* $P < 0.01$).

c) La secreción de insulina de células beta aisladas en presencia de putrescina en un sistema deficiente de poliaminas.

La figura 12 muestra el efecto agudo de la putrescina sobre la secreción de insulina de células beta pancreáticas pretratadas con DFMO.

En concentración de glucosa basal, el índice de secreción en las células pretratadas con DFMO fue de 1639 ± 112 y al adicionar la putrescina bajó a 1122 ± 78 , disminuyendo en un 31 % ($P < 0.01$)

En alta concentración de glucosa el efecto agudo de la poliamina en la liberación de insulina en las células beta pretratadas con DFMO conduce a la disminución en un 25 % del índice de secreción, es decir, de 2321 ± 165 a 1734 ± 141 en las células pretratadas y en las células a las que se les adicionó la putrescina, respectivamente ($P < 0.01$).

Por lo tanto, como se ha podido comprobar, la secreción de insulina de células beta en presencia de putrescina en un sistema deficiente de poliaminas se reduce aproximadamente en una cuarta parte en condiciones de alta y baja glucosa, indicando un efecto inhibitorio de la putrescina sobre la secreción de insulina.

C.- Análisis del efecto de la putrescina en las subpoblaciones funcionales de células beta insulares.

Hiriart y Ramírez-Medeles (15) han descrito la existencia de diferentes subpoblaciones funcionales de células beta que se pueden clasificar de acuerdo a la cantidad de insulina secretada en un tiempo determinado.

Como previamente lo habían descrito, en 5.6 mM de glucosa (secreción basal) se observan dos subpoblaciones funcionales de células beta: células SP, que forman inmunoplasmas pequeñas (menores a $1900 \mu^2$), y células MP, que forman inmunoplasmas medianas (alrededor de $3000 \mu^2$) (figura 13). Con concentración alta de glucosa (15.6 mM) además de las subpoblaciones previamente descritas se observa otra subpoblación de células LP que forma inmunoplasmas grandes (mayores de $6000 \mu^2$).

a) Efecto agudo de la putrescina sobre las subpoblaciones de células beta pancreáticas.

La figura 13 nos muestra el efecto de la putrescina sobre la secreción basal de insulina. Los porcentajes de las subpoblaciones de células SP y MP fueron semejantes en ambas condiciones, lo cual era de esperarse ya que la putrescina en condiciones basales no afecta el índice de secreción de insulina.

Cuando se analizó el efecto de la putrescina en concentración alta de glucosa sobre las subpoblaciones de células beta (figura 14) sólo se observaron células SP, lo cual

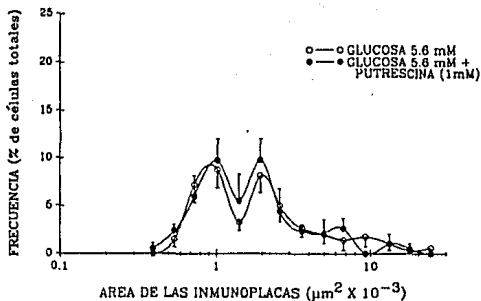


FIGURA 13.- Efecto de la putrescina sobre la distribución de frecuencias del área de las inmunoplasmas de insulina en baja glucosa. A esta concentración de glucosa la mayor parte de las células responden formando inmunoplasmas de insulina pequeñas y medianas. El comportamiento es semejante en ambas condiciones como se puede comprobar. Los datos graficados son la media SEM de n=6 experimentos.

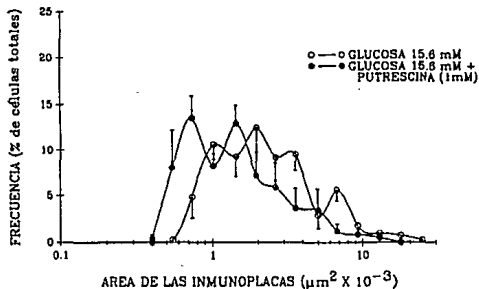


FIGURA 14.- Efecto de la putrescina sobre la distribución de frecuencias del área de las inmunoplasmas de insulina a concentración alta de glucosa en células beta aisladas. Se puede observar que la putrescina reduce la secreción de insulina a expensas de inhibir preferentemente las células MP y LP.

sugiere que las poliaminas reducen la secreción de insulina a expensas de inhibir preferentemente las células con mayor tasa de secreción de insulina, es decir, las células MP y LP.

Por consiguiente, la putrescina *in vitro* presenta un efecto inhibitorio sobre la secreción estimulada de insulina que se manifiesta por la reducción de las 3 subpoblaciones funcionales en una sola subpoblación de células SP, es decir, de las células con menor tasa de secreción de insulina.

b) Análisis de las subpoblaciones funcionales de células beta en cultivo cuando se inhibe la biosíntesis de putrescina.

En la figura 15, la concentración basal de glucosa se puede observar que el porcentaje de células SP y MP fue de 56.9 % y 43.1 %, respectivamente; y no se observaron células LP. Sin embargo, en las células tratadas con el inhibidor de la síntesis de poliaminas (DFMO), a esta misma concentración de glucosa se observa el reclutamiento de células

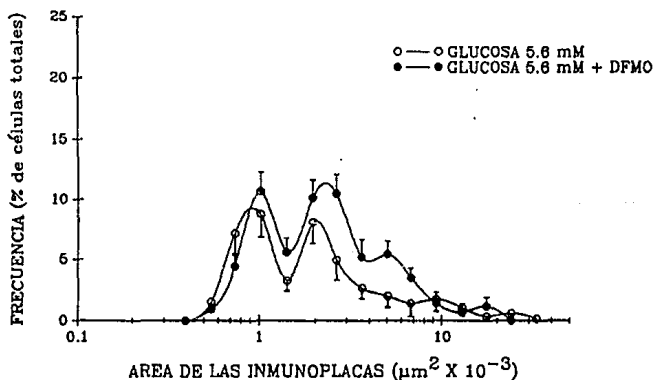


FIGURA 15.- Efecto de la inhibición de la síntesis de putrescina sobre la distribución de frecuencias del tamaño del área de las inmunoplaquetas de insulina en concentración basal de glucosa. En las células pretratadas con DFMO se observa el reclutamiento de células LP. Cada punto representa la media SEM de 6 experimentos.

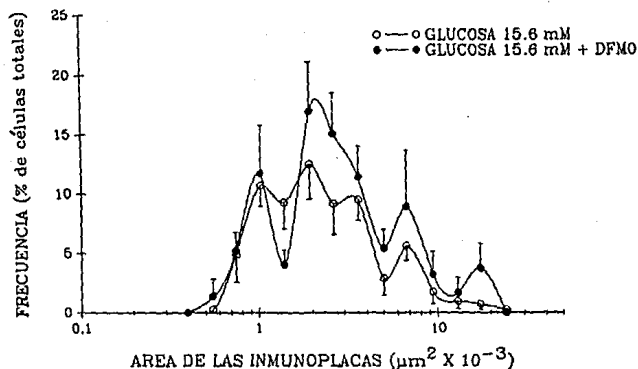


FIGURA 16.- Efecto de la inhibición de la síntesis de putresina sobre la distribución de frecuencias del tamaño de las inmunoplasmas de insulina en concentración estimulante de glucosa. En ambos casos, las células responden formando inmunoplasmas de los tres tamaños SP, MP y LP. Las células privadas de poliaminas presentan un porcentaje más elevado de células MP y LP que las control.

LP. En estas condiciones, la representación de cada subpoblación fue 36.9% de células SP, 44.2 % de células MP y 18.9 % LP.

En 15.6 mM de glucosa (secreción estimulada) se observan las tres subpoblaciones en las células control y en las células pretratadas con DFMO. Los porcentajes respectivos fueron 36.7 % SP, 49.7 % MP y 13.6 % LP para las células testigo y 27.1 % de células SP, 55 % MP y 19.9 % de LP en las células pretratadas (figura 16).

El hecho de provocar la deficiencia en la concentración de poliaminas al cultivar las células beta durante 24 hr con el inhibidor de la biosíntesis de poliaminas (DFMO) y observar el aumento en la tasa de secreción de las células formadoras de placas medianas y grandes (MP y LP) sugiere que la disminución de putrescina en el sistema, con el consiguiente aumento en la secreción de insulina, esté relacionado con las subpoblaciones funcionales viéndose reflejado como una tendencia a formar placas de mayor tamaño.

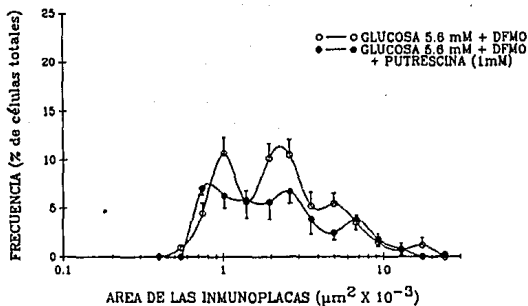


FIGURA 17.- Efecto agudo de la putrescina sobre la distribución de frecuencias del área de las inmunoplasmas de insulina en baja glucosa, en células pretratadas con DFMO. En las circunstancias señaladas se observa un ligero aumento en las poblaciones de células SP y MP.

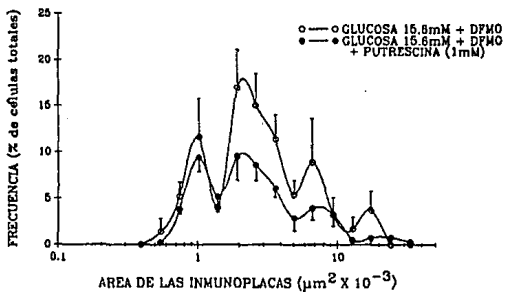


FIGURA 18.- Efecto agudo de la putrescina sobre la distribución de frecuencias del área de las inmunoplasmas de insulina en concentración estimulante de glucosa, en células pretratadas con DFMO. Se observa que el porcentaje de las células SP aumenta a expensas de las células MP y LP.

c) Análisis del efecto agudo de putrescina sobre las subpoblaciones funcionales de células beta pretratadas con DFMO.

En la figura 17 se ilustra el efecto agudo de la putrescina sobre la distribución de frecuencia del área de las inmunoplasmas de las células beta pretratadas con DFMO. En ambos casos se observan las tres subpoblaciones. El porcentaje de las células LP es semejante en ambas condiciones, mientras que en presencia de putrescina el porcentaje de las células MP disminuyen y las SP aumentan, ambas en un 17 %.

En alta concentración de glucosa también aparecen las tres subpoblaciones (figura 19). El efecto agudo de la putrescina en estas condiciones, en las células beta cultivadas con DFMO provoca un aumento del 39 % de las células con menor tasa de secreción de insulina, es decir las células SP, mientras que las células MP y LP disminuyen en un 7 % y 29 % respectivamente. Observamos por lo tanto, que el porcentaje de células SP aumenta a expensas de las otras dos subpoblaciones.

El efecto agudo de putrescina sobre las subpoblaciones de células beta deficientes de poliamina por acción del inhibidor DFMO se pone de manifiesto en la expresión de mayor número de células formadoras de Inmunoplasmas pequeñas, es decir células SP. En concentración baja de glucosa, esto se lleva a cabo a expensas de las células MP, mientras que en alta glucosa por las células MP y LP.

VI.- DISCUSION DE RESULTADOS

Si las poliaminas actúan sobre el metabolismo de la glucosa, ya sea aumentando la concentración intracelular de calcio o como mensajeros secundarios, entonces tendrán un efecto estimulador sobre la secreción de insulina, estimulada con distintas concentraciones de glucosa.

En este trabajo se estudió: 1) el efecto agudo de la putrescina sobre la secreción de insulina en las células beta pancreáticas, 2) el efecto de la inhibición de la síntesis de putrescina sobre la secreción hormonal y 3) la secreción de insulina de células beta aisladas en presencia de putrescina en un sistema deficiente de poliaminas. Cada condición experimental se realizó en 5.6 mM y en 15.6 mM de glucosa. Los tres aspectos fueron relacionados con las subpoblaciones funcionales de las células beta insulares.

Hasta hace relativamente poco tiempo no se contaba con una técnica con la sensibilidad suficiente como para detectar la secreción de células aisladas. Por lo cual, existe poca información acerca del funcionamiento individual de estas células. Los dos parámetros que se pueden medir en el RHPA, son indicativos de funcionalidad de cada célula. El área de la inmunoplaaca, permite evaluar la cantidad de insulina secretada, ya que es proporcional a la misma. El porcentaje de células que responden al secretagogo permite evaluar la cantidad de células funcionantes.

A partir del RHPA se pudo comprobar la aparición de las dos subpoblaciones en 5.6 mM de glucosa y a concentración alta de glucosa, el cambio a la distribución trimodal.

De acuerdo a los resultados obtenidos se observa lo siguiente:

A.- Efecto agudo de la putrescina sobre la secreción de insulina en las células beta pancreáticas.

El índice de secreción de insulina en condiciones basales de glucosa, no se ve afectada por la adición de putrescina. Esto concuerda con el análisis de las subpoblaciones, donde las distribuciones de frecuencias del control y de las células con putrescina se traslapan, siendo prácticamente iguales los porcentajes de células formadoras de inmunoplaacas pequeñas y medianas, es decir, SP y MP (figuras 10 y 13).

Sin embargo, en concentración estimulante de glucosa (15.6 mM) la putrescina presenta un efecto inhibitorio sobre la secreción de insulina que se manifiesta por la re-

ducción de las tres subpoblaciones funcionales a la expresión de células con menor tasa de secreción de insulina (SP) (figuras 10 y 14).

En este caso específico no se descarta la posibilidad de que el sistema estuviese saturado de poliamina y por lo tanto que nos impidiese ver el efecto de la putrescina agregada; ya que las concentraciones intracelulares de las poliaminas parecen estar muy controladas como se esperaría de moléculas involucradas en la modulación de la secreción de insulina. Con el fin de aclarar este punto, se procedió a estudiar y analizar las consecuencias de cultivar las células pancreáticas en presencia del inhibidor de la biosíntesis de putrescina (DFMO), para asegurar de esta manera la disminución de putrescina en las células, y observar en estas condiciones el efecto directo de la putrescina sobre la secreción de insulina.

B.- Inhibición de la síntesis de putrescina en las células beta en cultivo estimuladas con distintas concentraciones de glucosa.

Intentos para evaluar la importancia de las poliaminas en la función de las células beta están asociados con ciertas dificultades. Se utilizó un inhibidor de la enzima cuya velocidad es limitante en la regulación de los pasos biosintéticos de las poliaminas para provocar la deficiencia en la concentración de éstas. Esto se consiguió, como se ha mencionado anteriormente, cultivando las células con DFMO (5 mM) durante 24 hrs.

Los resultados obtenidos mostraron que la disminución de la putrescina en el sistema aumentó la secreción de insulina. Este efecto está relacionado con las subpoblaciones funcionales, viéndose reflejado como una tendencia de las células a secretar mayor cantidad de insulina, formando placas de mayor tamaño (MP y LP). (figuras 11, 15 y 16).

Ya que no se midió el contenido de putrescina no tenemos la certeza de haber inhibido totalmente la síntesis de ésta. Por otro lado, las rutas alternas para la síntesis de las otras poliaminas quedaron intactas, por lo que no se descarta la participación de éstas en la secreción de insulina. No obstante, estos datos muestran que la putrescina tiene un efecto inhibitorio sobre la secreción de insulina, que es más notorio en condición basal que estimulante.

C.- La secreción de células beta aisladas en presencia de putrescina en un sistema deficiente de poliaminas.

El hecho de cultivar las células beta pancreáticas con el inhibidor de la biosíntesis de las poliaminas (DFMO) durante 24 hr provoca la deficiencia en la concentración de putrescina en la célula beta. Lo que se pretende en esta sección es comprobar el efecto inhibitorio que ha parecido mostrar la putrescina a lo largo de este estudio mediante la observación del efecto agudo y directo de ésta en este sistema.

Los resultados obtenidos confirman las observaciones antes descritas ya que la secreción de insulina de células beta en presencia de putrescina, en un sistema deficiente de poliaminas se reduce aproximadamente en una cuarta parte en condiciones basal y estimulante de glucosa, indicando un efecto inhibitorio de la putrescina sobre la secreción de insulina. Este efecto inhibitorio de la putrescina se pone de manifiesto en la expresión de mayor número de células que responden formando isletos pequeños, es decir, células SP. En concentración baja de glucosa, donde el efecto agudo de la putrescina es ligeramente mayor, esto se lleva a cabo a expensas de las células MP, mientras que en alta glucosa por las células MP y LP (figuras 12.17 y 18).

Nuestra hipótesis de trabajo inicial proponía un efecto estimulatorio de la secreción de insulina. Nuestras observaciones indican que la putrescina inhibe la secreción de insulina de las células beta aisladas en cultivo. No obstante, las poliaminas "in situ" podrían participar como moduladores en la liberación de insulina, llevando a cabo una regulación fina, en la que la putrescina evitaría que hubiese un exceso de insulina circulante. Sería deseable evaluar el efecto de otras poliaminas sobre la secreción de insulina en nuestras condiciones experimentales para aclarar este punto.

En la literatura no existe consenso acerca de la función de estas moléculas en el páncreas. La complejidad histológica del páncreas endocrino, aunado al insuficiente conocimiento acerca de las interacciones paracrinas insulares; han hecho extremadamente difícil adoptar conclusiones firmes y definitivas al respecto. Un ejemplo de lo anterior, es el caso particular de la presencia de ODC (enzima precursora de la biosíntesis de las poliaminas) en las células alfa de los islotes pancreáticos de rata (8). Debido a la existencia de comunicación entre estos dos tipos celulares (alfa y beta) pudiera ser que las poliaminas producidas por las células alfa fueran capaces de influir en procesos llevados a cabo por la célula beta.

Según Welsh y colaboradores (42) la putrescina y la espermidina parecen ser necesarias para mantener la biosíntesis normal de insulina y proteínas, mientras que la espermina ejerce un papel en la liberación de insulina estimulada por glucosa. Contrariamente, Thams y colaboradores (40) han observado que las poliaminas son agentes inhibitorios (especialmente espermina) por su competitividad por los sitios de unión de calcio, pudiendo así interferir con la asociación de la proteína quinasa C a la membrana y modulando su capacidad para responder a la activación por diacilglicerol, (35).

Hasta el momento no se había estudiado que las poliaminas tuviesen un efecto diferencial sobre la heterogénea población de células beta insulares. Nuestros resultados sugieren que la putrescina tiene un efecto predominante sobre las células con mayor índice de secreción de insulina.

Sería interesante continuar estudiando el papel de las poliaminas en la secreción y biosíntesis de insulina. Así como estudiar los mecanismos intracelulares que subyacen a la inhibición en la secreción de insulina que encontramos en este trabajo.

VII.- CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

1-. Como ya se había determinado por otros investigadores, las células beta aisladas del islote pancreático de rata adulta aisladas son capaces de responder, secretando insulina al estímulo de secretagogos como la glucosa. También se pudo observar que las células beta ante el mismo estímulo tienen una respuesta heterogénea. Algunas células forman inmunoplaquetas pequeñas, otras medianas y otras grandes.

2-. La inhibición de la biosíntesis de putrescina en las células beta cultivadas con DFMO provoca un aumento en el índice de secreción de insulina en condiciones basal y estimulante de glucosa, siendo más notorio en condición basal.

3-. El suministro agudo de la putrescina en células beta insulares deficientes de poliaminas muestra un efecto inhibitorio de la putrescina sobre la secreción de insulina en concentraciones de glucosa basal y estimulante. Este efecto es ligeramente mayor en concentración basal de glucosa.

4-. El efecto inhibitorio de la putrescina se manifiesta predominantemente sobre las células con mayor índice de secreción de la hormona.

5-. La putrescina (presente en los gránulos secretores de las células beta junto con las otras dos poliaminas) podría tener una función moduladora a través de una regulación fina de la secreción de insulina por las células beta y participar junto con otras hormonas insulares en la homeostasis de la glucosa.

VIII.- BIBLIOGRAFIA

- (1) Ahren, B., Taborsky G.I., Parte D. Jr. Neuropeptidergic versus cholinergic and adrenergic regulation of islet hormone secretion. *Diabetologia*, 29:827-361 1986
- (2) Blachler, F., Leclercq-Meyer, V., Marchand, J., Woussen-Cole, M-C., Mathias, PCF., Sener, A. and Malaisse WJ. Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. Functional response of islets to L- arginine and L-ornithine. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1013: 144-151, 1989.
- (3) Blundell, T., Dodson, G., Hodgkin, D. and Mercola, D. Insulin: The structure in the crystal and its reflection in chemistry and biology. *Adv. Prot. Chem.*, 26: 280-402, 1979.
- (4) Bungay, P.J., Griffin, M. Involvement of polyamines in stimulus secretion coupling in the pancreatic beta cell. *Biochem. Soc. Transactions.*, 13: 353-356, 1985.
- (5) Cahia, G.F., Jr., Etzwiler, D.D., Freinkel, N. Control and diabetes *N.Engl.J.Med.*, 294:1004, 1976
- (6) Cunningham, A.J. and Szenberg, A. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology.*, 14: 599-603, 1968.
- (7) Denton, R.M., Browncey, R.W. and Belsham, G.J. A partial view of the mechanism of insulin action. *Diabetologia.*, 21: 347-362, 1981.
- (8) Dorn, A. and Bernstein, H-G. Remarkable localization of ornithine decarboxylase in rat pancreas. *Eur. J. Cell. Biol.*, 41: 127-129, 1986.
- (9) Gold, G. and Grodsky, G.M. The secretory process of the beta cells of the pancreas. *Cell Biology of the Secretory Process*. Cantin, M. Ed. New York. Karger., 359- 388, 1984.
- (10) Grodsky, G.M. and Bennett, L.L. Cation requirements for insulin secretion in the isolated perfused pancreas. *Diabetes.*, 15: 910-913, 1966.
- (11) Heby, O. Putrescine, Spermidine and Spermine. *NIPS vol 1 / February , 1966.*

- (12) Hedekov, C.J. Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiological Reviews.*, 60: 442-509, 1980.
- (13) Hiriart, M. Análisis de los canales iónicos y la actividad secretora de células beta individuales del páncreas de rata. CINVESTAV, tesis de doctorado, 1988.
- (14) Hiriart, M., Matteson, D.R. Na channels and two types of Ca channels in rat pancreatic beta cells identified with the reverse hemolytic plaque assay. *J. Gen. Physiol.*, 91: 617-639, 1988.
- (15) Hiriart, M., Ramirez-Medeles, M.C. Functional subpopulations of individual pancreatic beta cells in culture. *Endocrinology*, 128: 3193-3198, 1991.
- (16) Hougaard, D.M., Nielsen, J.H. and Larsson, L-I. Localization and biosynthesis of polyamines in insulin-producing cells. *Biochem. J.*, 238: 43-47, 1986.
- (17) Koenig, H., Goldstone, A. and Lu, C.Y. Polyamines regulate calcium fluxes in a rapid plasma membrane response. *Nature.*, 305: 530-534, 1983.
- (18) Lacy, P.E and Greider. Ultrastructural organization of mammalian pancreatic islets, in: *Handbook of Physiology*, section 7, *Endocrinology*, vol 1, *Endocrine pancreas*, pp.77-89. Ed.R.O Greep and EB Astwood, Am. Physiol. soc., 1972
- (19) Lacy, P.E. and Kostianovsky. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes.*, 16:35-39, 1967.
- (20) Le Douarin, N.M. On the origin of the pancreatic endocrine cells. *Cell.*, 53: 169-171, 1988.
- (21) Malaisse, W.J., Blachier, F., Mourtada, A., Camara, J., Albor, A., Valverde, I. and Sener, A. Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. Metabolism of L-arginine and L-ornithine in pancreatic islets. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1013:133-143, 1989.
- (22) Méndez, J.D.: Poliaminas, en *Bioquímica e Inmunología*. Hicks, J.J. y Díaz-Zagoya, J.C. (Eds.), Facultad de Medicina, UNAM., México, 1989. Vol. II., pp. 365-385.
- (23) Méndez, J.D.: Polyamines and human reproduction, en : *The Physiology of Polyamines*. Bachrach, U. and Helmer, Y. (Eds.) C.R.C. Press. Inc., Florida, USA., 1989. Vol. I. pp. 24-36.
- (24) Neill J.D., Frawley, L.S. Detection of hormone release from individual cells in mixed populations using a reverse hemolytic plaque assay-*Endocrinology.*, 112:1135-1137, 1983

- (25) Orci, L. Macro-and micro-domains in the endocrine pancreas. *Diabetes.*, 31:538-565, 1982.
- (26) Orci, L and Unger, R.H. Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D-cells. *Lancet.*, 2:1243-44, 1975
- (27) Orci, L., Vassalli, J-D. and Perrelet, A. La fábrica de insulina. *Scientific America.*, 1:52-61, 1986
- (28) Pegg, A.E. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.*, 234:249-262, 1986.
- (29) Pipeleers, D. Islet cell interactions with pancreatic beta cells. *Experientia.*, 40:1114, 1984.
- (30) Pipeleers, D. The biosociology of pancreatic beta cells. *Diabetologia.*, 30:227-291, 1987.
- (31) Qi, D-F., Schatzman, R.C., Mazer, G.J., Turner, R.S., Raynor, R.L., Liao, S. and Kuo, J.F. *Biochem. J.*, 213:281-288, 1983.
- (32) Salomon, D., Meda, P. Heterogeneity and contact-dependent regulation of hormone secretion by individual beta cells. *Exp. Cell Res.*, 162:507-520, 1986.
- (33) Sanger, F. Chemistry of insulin. *Science.*, 129:1340-1344, 1959.
- (34) Sanger, F. *Brit. M.Bull.*, 16:183-188, 1960
- (35) Schuber, F. Influence of polyamines on membrane functions. *Biochemical Journal.*, 260:1-10, 1989.
- (36) Smith, P.F., Luque, E.H. and Neill, J.D. Detection and measurement of secretion from individual neuroendocrine cells using a reverse hemolytic plaque assay. *Neuroendocrine peptide methodology*, 1989.
- (37) Tabor, C.W. and Tabor, H. 1,4-Diaminobutane (putrescine), spermidine and spermine. *Ann. Rev. Biochem.*, 45:285-308, 1976.
- (38) Tabor, C.W. and Tabor, H. Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.*, 53: 749-790, 1984.
- (39) Tepperman: *Secreciones internas del páncreas. en fisiología metabólica y Endocrinología. Interamericana 3^{er} ed. México, 1973. cap.10 .pp. 172-175*
- (40) Thams, P., Capito, K. and Hedeskov, C.J. An inhibitory role for polyamines in protein

kinase C activation and insulin secretion in mouse pancreatic islets. *Biochem. J.*, 237: 131-138, 1986.

(41) Weir and Bonner-Weir. Islets of Langerhans: The puzzle of intraislet interactions and their relevance to diabetes. *J. Clin. Invest.*, 85:983-987, 1990.

(42) Welsh, N. and Sjöholm, A. Polyamines and insulin production in isolated mouse - pancreatic islets. *Biochem. J.*, 252:701-707, 1988.

(43) Yung, M.W and Green, C. The binding of polyamines to phospholipid bilayers. *Biochemical Pharmacology.*, 35: 4037-4041, 1986.