

300627
21
20j

UNIVERSIDAD LA SALLE



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

"EFECTO DE ARGININA Y ESPERMIDINA SOBRE LA FUNCION ENDOCRINA DEL PANCREAS"

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
SANDRA VIRGINIA MARTINEZ DIAZ

DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. JOSE DOMINGO MENDEZ

MEXICO, D. F.

IMPRESO EN
FALLA DE ORIGEN

1992



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

EFECTO DE ARGININA Y ESPERAMIDINA SOBRE LA FUNCION ENDOCRINA DEL PANCREAS

	PAGINAS
RESUMEN	1
I INTRODUCCION	2
II OBJETIVOS	4
III HIPOTESIS	5
IV ANTECEDENTES	
4.1. POLIAMINAS	7
4.1.1. Biosíntesis, interconversión y degradación de poliaminas en mamíferos.	7
2.1.2. Interacciones entre el ciclo de la urea, biosíntesis de poliaminas y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos	11
4.1.3. Efecto de las poliaminas en el crecimiento y proliferación celular	13
4.2. METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS Y POLIAMINAS.	13
4.3. METABOLISMO DE AMINOACIDOS E INSULINA	16
4.4. PANCREAS	
4.4.1. Función exócrina	18
4.4.2. Función endócrina	18
4.4.3. Anatomía del páncreas endócrino.	19
4.4.4. Insulina.	20
4.4.4.1. Química de la insulina y precursores.	21
4.4.4.2. Biosíntesis y almacenamiento de la insulina	23
4.4.4.3. Liberación de la insulina.	26
4.4.4.4. Secreción basal de insulina.	31
4.4.4.5. Cíclica de la liberación de insulina.	32
4.4.4.6. Distribución de la insulina y la proinsulina.	33
4.4.4.7. Degradación de la insulina y proinsulina.	34
4.4.4.8. Respuestas celulares a la insulina.	35
4.4.4.9. Receptor de la insulina.	36
4.4.4.10. Regulación de los receptores insulínicos	39
4.4.4.11. Acontecimientos de la unión post-receptor	39
4.4.4.12. Sistema de transporte de la glucosa.	40
4.4.5. Hiperglicemia experimental	42
4.4.5.1. Pancreatectomía.	43
4.4.5.2. Hiperglicemia química.	44
a) Aloxa	44
b) Estreptozotocina	45

4.5. DIABETES	
4.5.1. Principios Generales	47
4.5.2. Clasificación clínica.	48
4.5.2.1. Diabetes Juvenil.	48
4.5.2.2. Diabetes del Adulto.	50
V MATERIAL Y METODOS	53
5.1. MATERIAL BIOLOGICO	53
5.2. METODO.	53
5.3. PREPARACION DE LA MUESTRA.	56
5.3.1. Extracción de sangre y Tejido pancreático.	56
5.3.2. Preparación de la muestra:	56
5.3.3. Separación de alicuotas.	59
5.4. ANALISIS BIOQUIMICOS.	
5.4.1. Determinaciones en suero sanguíneo	59
5.4.1.1. Determinación de Glucosa.	59
5.4.1.2. Determinación de triacilglicéridos	60
5.4.1.3. Determinación de alfa amilasa.	60
5.4.1.4. Determinación de triacilglicéridos.	60
5.4.1.5. Determinación de Proteínas.	61
5.4.2. Determinaciones en Tejido Pancreático.	
5.4.2.1. Determinación de Peso Seco.	61
5.4.2.2. Determinación de Actividad de Arginasa.	61
5.4.2.3. Determinación de Proteínas.	62
VI RESULTADOS	
6.1. GLUCOSA EN SUERO.	65
6.2. TRIACILGLICERIDOS EN SUERO.	65
6.3. PROTEINAS EN SUERO.	66
6.4. ALFA AMILASA EN SUERO.	66
6.5. PROTEINAS EN HOMOGENIZADO.	66
6.6. ACTIVIDAD DE ARGINASA EN SUERO.	67
6.7. ACTIVIDAD DE ARGINASA EN HOMOGENIZADO.	67
TABLAS DE RESULTADOS	68
GRAFICAS DE RESULTADOS	72
VII DISCUSION DE RESULTADOS	79
7.1. METODOLOGIA.	79
7.1.1. Material biológico.	79

7.1.2. Sustancias administradas.	79
7.1.2.1. Aloxana.	81
7.1.2.2. Insulina.	82
7.1.2.3. Arginina.	83
7.1.2.4. Espermidina.	83
7.2. PARAMETROS ANALIZADOS.	
7.2.1. Grupo de ratas tratadas con aloxana	85
7.2.1.1. Glucosa.	85
7.2.1.2. Triacilgliceridos.	86
7.2.1.3. Alfa amilasa en suero.	87
7.2.1.4. Proteinas en suero.	87
7.2.1.5. Proteinas en homogenizado.	87
7.2.1.6. Actividad de arginasa en suero.	88
7.2.1.7. Actividad de arginasa en homogenizado.	88
7.2.2. Grupo de ratas tratadas con insulina.	89
7.2.2.1. Glucosa.	89
7.2.2.2. Triacilgliceridos.	89
7.2.2.3. Alfa amilasa en suero.	90
7.2.2.4. Proteinas en suero.	90
7.2.2.5. Actividad de arginasa en suero y homogenizado.	90
7.2.3. Grupo de ratas tratadas con arginina y espermidina.	90
7.2.3.1. Glucosa.	92
7.2.3.2. Triacilgliceridos.	92
7.2.3.3. Alfa amilasa en suero.	93
7.2.3.4. Proteinas en suero y homogenizado.	94
7.2.3.5. Actividad de arginasa en suero y homogenizado.	
VIII CONCLUSIONES	95
IX APENDICE	96
9.1. TECNICAS	
9.1.1. Determinacion de glucosa en suero sanguineo.	96
9.1.1.1. Fundamento de la prueba.	96
9.1.1.2. Contenido del reactivo.	96
9.1.1.3. Preparacion del reactivo.	97
9.1.1.4. Almacenamiento del reactivo	97
9.1.1.5. Recoleccion y almacenamiento de la muestra	97
9.1.1.6. Material requerido.	97
9.1.1.7. Procedimiento.	98
9.1.1.8. Calculos.	98
9.1.1.9. Precauciones.	98

9.1.2. Determinación de triacilglicéridos en suero sanguíneo.	100
9.1.2.1. Fundamento de la prueba.	100
9.1.2.2. Contenido del reactivo.	100
9.1.2.3. Preparación del reactivo.	101
9.1.2.4. Almacenamiento del reactivo	101
9.1.2.5. Recolección y almacenamiento de la muestra	101
9.1.3. Determinación de urea.	102
9.1.3.1. Fundamento de la prueba.	102
9.1.3.2. Contenido del reactivo.	102
9.1.3.3. Procedimiento.	102
9.1.4. Determinación de proteínas.	104
9.1.4.1. Contenido del reactivo.	104
9.1.4.2. Procedimiento.	104
9.1.5. Determinación peso seco.	106
9.1.5.1. Contenido del reactivo.	106
9.1.5.2. Procedimiento.	106
X BIBLIOGRAFIA	107

R E S U M E N

La administración intramuscular de espermidina y arginina a diferentes tiempos después de daño pancreático producido por aloxana en ratas de la cepa Long Evans, indujo cambios bioquímicos indicativos de una posible recuperación pancreática.

El grupo de ratas dañadas con aloxana presentó un incremento en la concentración de glucosa, triacilglicéridos, actividad de arginasa sérica y proteínas tisulares, así como una inhibición en los niveles de arginasa tisulares.

En el grupo tratado con espermidina (5mg/Kg) se cuantificó la recuperación en la actividad de arginasa sérica, en proteínas en homogenizado, alfa amilasa y triacilglicéridos.

En los grupos de ratas tratados con arginina aunque la recuperación existió, ésta fue menos evidente que para los tratados con espermidina.

El efecto de espermidina en páncreas dañado con aloxana representa una promisoriosa opción a estudiar.

INTRODUCCION

Las poliaminas, entre las que destacan espermina, espermidina y su precursor putrescina son cationes orgánicos de bajo peso molecular que se encuentran ampliamente distribuidos en todos los sistemas celulares. En general, se sabe que los procariontes contienen 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.

La función biológica de estas moléculas ha sido tema de muchas investigaciones. Se ha demostrado que se sintetizan en grandes cantidades durante el crecimiento de tejido normal y neoplásico (1). Además de tener efectos importantes en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (4) las poliaminas pueden actuar como sustratos de las transglutamilasas las cuales están presentes en células productoras de insulina (2,3,7) y desempeñan un papel importante en la liberación de la hormona.

Estudios recientes indican que las poliaminas se localizan en células productoras de insulina y que su biosíntesis "in vitro" es estimulada por glucosa (2,6). Otros estudios sugieren que en adipocitos, la espermidina tiene un efecto parecido a la insulina puesto que inhibe la lipólisis y estimula la conversión de glucosa a dióxido de carbono, procesos que sin duda se relacionan con cambios en la permeabilidad de la membrana celular. (5).

Debido a la presencia de las poliaminas en células beta pancreáticas, a su comportamiento parecido a la insulina y a que se encuentran íntimamente relacionadas con procesos de división y proliferación celular, el presente estudio evalúa los efectos de espermidina y de la arginina que es precursor de la biosíntesis de poliaminas en la función endócrina del páncreas de rata afectado por aloxana, así como analizar también un posible efecto inductor de la recuperación de la función endócrina pancreática.

O B J E T I V O S**OBJETIVO GENERAL:**

Analizar por métodos fisicoquímicos los efectos producidos por aloxana en la porción endócrina del páncreas, así como su posible recuperación inducida por arginina y espermidina .

OBJETIVO PARTICULAR:

Estudiar el efecto in vivo de la espermidina y la arginina sobre el metabolismo de la glucosa sanguínea.

H I P O T E S I S

La administración de arginina , precursor de la biosíntesis de poliaminas y espermidina recupera la función de los islotes de Langerhans afectados por aloxana.

La espermidina regula el metabolismo de la glucosa al facilitar su transporte a través de la membrana celular.

IV

ANTECEDENTES

La presencia de poliaminas en materiales biológicos se reportó hace más de 300 años. Actualmente se ha demostrado que en los mamíferos los niveles tisulares de estas moléculas son mayores en órganos con síntesis activa de ácido ribonucleico (RNA) (4), tal es el caso de la médula ósea, la próstata y el páncreas. En este último se han detectado altas concentraciones de espermina particularmente en las células productoras de insulina (2,6).

Las concentraciones de poliaminas se incrementan de manera marcada en el hígado de rata en regeneración, en tales circunstancias se observa un incremento en la actividad de las enzimas involucradas en su biosíntesis (8,9).

Existe poca información a cerca de la actividad farmacológica de las poliaminas. La putrescina ha sido administrada a ratas por vía intraperitoneal en dosis de 300-400 mg /kg de peso e inyectada en cerebro por vía ventricular (100 nmol/rata) con lo que se ha demostrado que esta tiene un efecto analgésico-dosis dependiente. En estas circunstancias no se ha observado ninguna toxicidad colateral (10).

4.1. 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, los procariontes tienen más altas concentraciones de putrescina que de espermidina y carecen de espermina.

Los eucariontes tienen generalmente bajas concentraciones de putrescina y tienen espermidina y espermina.

La putrescina es el precursor de la síntesis de la espermidina y la espermina; en las células animales esta diamina se obtiene de la ornitina, sin embargo, en las células vegetales superiores en bacterias y hongos la putrescina puede obtenerse a partir de agmatina (32), que a su vez es producida por la descarboxilación de arginina.

4.1.1. Biosíntesis, interconversión y degradación de poliaminas en mamíferos.

En los mamíferos, la biosíntesis de poliaminas se lleva a cabo a partir de la ornitina, ésta proviene del plasma, además de que puede formarse dentro de las células por acción de la arginasa. Es posible que esta enzima ampliamente distribuida en los diferentes tejidos, se encuentre presente en tejidos extrahepáticos para facilitar la disponibilidad de ornitina para la biosíntesis de poliaminas. Por esta razón, se ha pensado que la arginasa puede ser una de las enzimas que regulan la etapa inicial de la biosíntesis de poliaminas, debiendo resordarse que su participación fisiológica tradicionalmente estudiada se

relaciona con el ciclo de la urea.

La ruta que conduce a la formación de putrescina es a través de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC). Esta enzima depende para su actividad de fosfato de piridoxal.

Para convertir a la putrescina en espermidina debe adicionarse un grupo propilamina. Este grupo se deriva de la metionina, la cual primero es convertida en S-adenosilmetionina y luego descarboxilada por la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMD) el producto de la descarboxilación, S-adenosilhomocisteamina, es utilizado como donador de grupos propilamina para la síntesis de espermidina y espermina.

La SAMD de los mamíferos es activada por putrescina e inhibida por espermidina; esta enzima, que depende del piruvato como cofactor, está presente en los tejidos en muy altas concentraciones.

Es importante mencionar que la incorporación de los grupos propilamina para la síntesis de espermidina y espermina se lleva a cabo por la acción de las enzimas espermidina sintetasa y espermina sintetasa respectivamente. (Figura No 1)

A pesar de la similitud entre estas dos reacciones cada enzima tiene cierta especificidad por su propio sustrato. Las aminopropiltransferasas se encuentran presentes en diversas células en cantidades mayores que las descarboxilasas. Se ha pensado que son reguladas por la disponibilidad de sus sustratos, particularmente la S-adenosilhomocisteamina, sin embargo, en el caso de la espermidina sintetasa se ha observado que su actividad

también se eleva en respuesta a hormonas, regeneración tisular y factores de crecimiento celular.

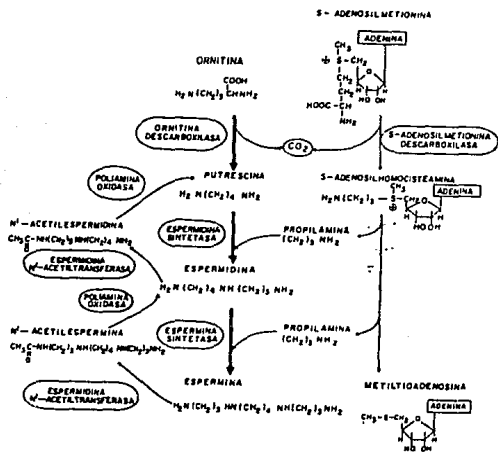


FIGURA 1 : Biosíntesis de poliaminas y su interconversión en células de mamífero.

Por otra parte, se ha demostrado que las reacciones catalizadas por las dos sintetetasas son irreversibles, y que la conversión de la espermina en espermidina y de ésta en putrescina ocurre *in vivo*. Esta interconversión tiene lugar por acción de las enzimas: espermidina-N-acetiltransferasa y poliamina oxidasa.

Por otra parte la putrescina puede ser oxidada por la diamina oxidasa produciendo gamma-aminobutiraldehído en lugar de convertirse en espermidina; este aldehído puede posteriormente ser oxidado a gamma aminobutirato (GABA) o dar origen a compuestos cíclicos. Pero la putrescina puede también ser acetilada por una enzima microsomal y la monoacetilputrescina ser oxidada por una monoamina oxidasa, para producir GABA lo que podría ocurrir en tejidos como el cerebro. (Figura No 2).

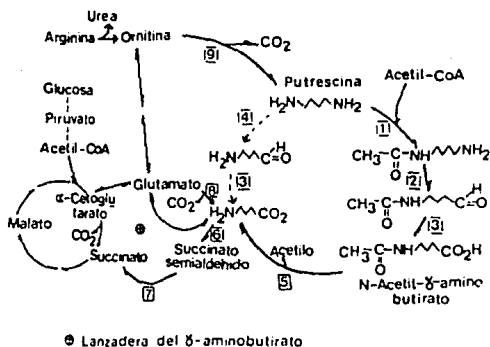


FIGURA 2 : Metabolismo de putrescina vía ácido gamma amino butírico.

Las poliaminas acetiladas han sido encontradas en sangre y orina pero en cantidades pequeñas y no es clara la importancia de la acetilación que permite la excreción de poliamina.

4.1.2. Interacciones entre el ciclo de la urea, biosíntesis de poliaminas y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

El ciclo de la urea ha sido bien identificado en su conjunto y ahora se sabe que consiste de 5 pasos, como se muestra en la Figura No 3 :

- 1) La conversión de bicarbonato y amonio en carbamoil fosfato.
- 2) Formación de citrulina a partir de ornitina y carbamoil fosfato.
- 3) Conversión de citrulina y aspartato en argininosuccinato.
- 4) Hidrólisis de argininosuccinato para formar arginina.
- 5) Degradación de arginina para formar ornitina y urea.

La ornitina así formada está nuevamente disponible para su utilización en el paso 2 y la urea es excretada.

Los dos pasos iniciales son catalizados por las enzimas mitocondriales, carbamoilfosfato sintetasa I y ornitina transcarbamilasa, y los tres últimos por las enzimas citoplasmáticas, argininosuccinato sintetasa, argininosuccinasa y arginasa respectivamente.

Estas enzimas solamente están presentes en cantidades suficientes para llevar a cabo la ureogénesis en el hígado.

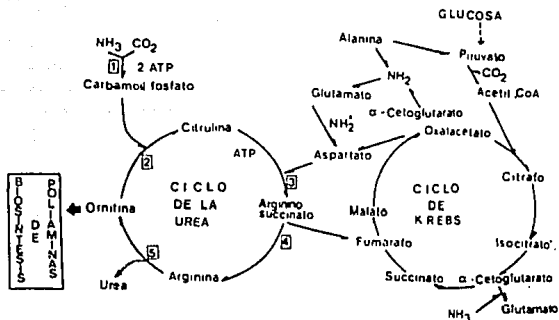


FIGURA 3 : Interacciones entre el ciclo de la urea, el ciclo de Krebs y la biosíntesis.

La síntesis de argininosuccinato es un paso importante en la interacción del ciclo de la urea con el de Krebs. La alanina es transaminada para formar piruvato, y su grupo amino lo cede al alfa cetoglutarato, pasando éste a glutamato. El piruvato es descarboxilado para entrar al ciclo del ácido cítrico como un fragmento de dos carbonos.

El glutamato por una reacción de transaminación con el oxalacetato, forma aspartato y se regenera el alfa cetoglutarato. El aspartato así formado contiene el segundo grupo amino destinado para la síntesis de la urea. El fumarato que se obtiene por hidrólisis de argininosuccinato regresa al ciclo del ácido

cítrico y la arginina queda disponible para la síntesis de proteínas en tejidos extrahepáticos.

Por otra parte, la arginasa efectúa la conversión de arginina en ornitina y urea y así se completa el ciclo. Se ha observado que cuando aumenta la síntesis de poliaminas aumenta la actividad de arginasa y que así se incrementa el suministro de ornitina hacia ODC.

4.1.3. Efecto de las poliaminas en el crecimiento y proliferación celular.

Se ha demostrado en muchos sistemas celulares que las poliaminas son necesarias para el crecimiento óptimo; en la mayoría de las células esta necesidad es absoluta.

En la figura No 4 se muestran algunos de los efectos biológicos de las poliaminas.

4.2. METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS Y POLIAMINAS .

La incubación de adipocitos de rata con insulina, espermidina o espermina, estimula la conversión de glucosa a dióxido de carbono e inhibe la lipólisis, estos efectos han sido observados cuando las concentraciones de las poliaminas varían entre 1-50 μ M (6).

Cuando se utilizan concentraciones elevadas de espermidina y espermina, el aumento de la oxidación de la glucosa y la supresión de la lipólisis son idénticos a los efectos producidos por insulina.

EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS POLIAMINAS

1 POLIAMINAS COMO FACTORES DE CRECIMIENTO

- En microorganismos.
- En células de mamífero.

2 ESTABILIZACIÓN DE MEMBRANAS CELULARES.

3 ESTABILIZACIÓN DE PARTICULAS SUBCELULARES.

4 ASOCIACIÓN CON ÁCIDOS NUCLEICOS

- Estabilización del DNA contra la desnaturalización de DNA.
- Asociación con tRNA.
- Estabilización de la forma superenrollada del DNA.
- Empacamiento del DNA en bacteriófagos.
- Estimulación de la síntesis de DNA.
- Estimulación de la síntesis de RNA.
- Modificación de la actividad de ribonucleasas.
- Estabilización del RNA recién sintetizado.

5 EFECTOS SOBRE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.

- Fijación de moléculas de tRNA a ribosomas.
- Estimulación de metilación del tRNA.
- Reemplazamiento de Mg^{++} en la reacción de aminocil tRNA sintetasa.
- Asociación con ribosomas.
- Fidelidad de la traducción.
- Iniciación de la traducción.
- Estimulación de la nucleotidiltransferasa de tRNA.

6 EFECTOS SOBRE VARIAS REACCIONES METABÓLICAS.

- Estimulación de nucleótido cinasas.
- Modificación de las actividades de proteínas cinasas.
- Incremento de la ADP-ribosilación de proteínas nucleares.
- Activación de fosforilasa b.
- Estimulación de lipólisis.
- Activación de colina cinasa.
- Incremento en la utilización de fructosa en espermatozoides (epidídimo).
- Inhibición de ATPasa.
- Modificación de la actividad de acetil colina esterasa.
- Inhibición de la agregación de plaquetas.
- Estimulación del metabolismo de estradiol en microsomas de hígado.

El mecanismo por el cual la espermidina y la espermina tienen acciones parecidas a la insulina no está muy estudiado, sin embargo, se sabe que no se debe a la fuerza iónica de estas moléculas, ya que al someter al mismo estudio a los adipocitos de rata, la putrescina (de fuerza iónica similar) no presenta este comportamiento, por lo que se cree que la inhibición de la lipólisis por poliaminas se debe a supresiones en los niveles de Adenosín Monofosfato cíclico (AMPC), dicha afirmación se establece ya que la lipólisis inducida con epinefrina o teofilina se inhibe por las poliaminas, sin embargo cuando se administra dibutiril AMPC esta acción no se produce (5).

Las poliaminas intervienen en varios procesos biológicos a nivel de membrana. El grupo de Elgavish demostró que estas moléculas estimulan el transporte de D-glucosa en células ciliadas renales. Dicho transporte quizá se deba a la inhibición de la vía Na^+ / H^+ por espermina, estimulando así el mecanismo "simport" de D-glucosa y Na^+ . En presencia de Mg^{++} la espermina permite tener un 10% de la actividad de la Mg-ATPasa esto se debe a la habilidad de esta poliamina por reemplazar el Mg^{++} en la síntesis de ATP. El Mg^{++} reduce la carga negativa de ATP formando Mg-ATP que después se combina con la ATPasa. Las poliaminas tienen un efecto similar combinándose con el ATP (11).

Recientemente se ha demostrado que algunas enzimas de la vía glucolítica como hexocinasa, fosfofructocinasa y piruvato cinasa del sitio de implantación de la rata son activadas significativamente por espermina (12, 13)

Por medio de estudios de respirometría se sabe que la espermidina y espermina son capaces de activar la conversión de glucosa a dióxido de carbono, siendo la estimulación esencialmente producida por insulina en células intactas y no así en células lisadas. En este punto, las poliaminas se comportan de manera similar a la cisteína, oxitocina y prostaglandinas, las cuales también tiene un efecto similar a la insulina (5).

4.3. METABOLISMO DE AMINOACIDOS E INSULINA.

El primer aminoácido con capacidad reconocida para estimular la secreción de insulina fue la leucina. Este efecto se encuentra exagerado en presencia de hiperplasia patológica de las células Beta y en los tumores (36).

Como se observa en la figura No. 5 la mayor parte, o quizá todos los aminoácidos fomentan la liberación de insulina. El más potente de los estudiados en el hombre es la arginina (precursor de las poliaminas).

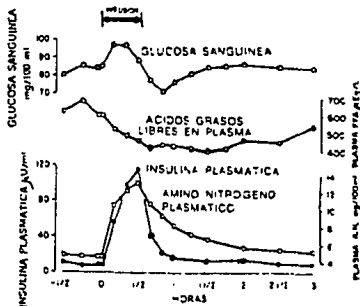


FIGURA 5

Tras la infusión de 30g de una mezcla de 10 aminoácidos esenciales a 35 individuos sanos durante 31 ocasiones, se observa un aumento inmediato en el nivel de insulina plasmática que guarda relación con el aumento de nitrógeno amino. Tan solo se observa una elevación transitoria y ligera en el nivel plasmático de glucosa. Con una disminución progresiva en los niveles de ácidos grasos libres (Segun Floyd, J.: "Stimulation of insulin secretion by aminoacids" J. Clin Invest 45:1487, 1966.

En el perro se ha sugerido la existencia de diferentes potencias, pero esta evaluación es compleja debido a la interacción del nivel de glucosa prevalente y algunos, pero no todos los aminoácidos. Así, la leucina puede estimular la liberación de insulina in vitro en ausencia de glucosa, lo que no sucede con la arginina; las respuestas a ambas están potenciadas por la glucosa, pero el efecto es mayor en el caso de la arginina. Lo anterior quizá es debido a que la leucina puede ser oxidada completamente por el islote mientras que la oxidación de arginina es mucho más difícil, si es que tiene lugar. Por esto, los mecanismos de estimulación parecen ser diferentes de unos aminoácidos a otros. Aunque algunos aminoácidos no metabolizables pueden inducir la liberación de insulina en presencia de glucosa, parece claro que parte de la estimulación es independiente del metabolismo de éstos. El mecanismo por el cual los aminoácidos estimulan la secreción de insulina, puede ser a través de dos vías; una de las cuales depende de la interacción con un receptor de membrana y la otra, de la estimulación del metabolismo intracelular. Estas dos funciones varían en cuanto a su importancia de unos aminoácidos a otros, por eso la dependencia de glucosa es tan variable. La observación de que el efecto de la arginina sobre la liberación de insulina es multifásica hace pensar que la duración del estímulo es otra variable importante. La administración experimental de proteína y glucosa juntas dan lugar a menores niveles de glucosa y respuestas insulínicas más altas que cuando la glucosa es dada sola (14).

4.4. PANCREAS.

Las concentraciones tisulares de poliaminas han sido determinadas en algunos órganos. Se sabe que el páncreas de rata contiene 8.62 moles/g de peso húmedo a diferencia del cerebro humano que únicamente contiene 0.23 (15).

4.4.1. Función exócrina.

El páncreas es la principal fuente de enzimas (alfa-amilasa, quimotripsinógeno, etc.) que actúan sobre el duodeno, yeyuno y en menor cantidad en el ileón. En los seres humanos la síntesis de enzimas pancreáticas es de aproximadamente 10 g de proteína por día. El páncreas de rata que sólo contiene 0.2 g de proteína en sus tejidos sintetiza cerca de 0.4 g de proteína enzimática en 24 horas. El páncreas también secreta bicarbonato el cual neutraliza el contenido ácido que el estómago pasa al duodeno. Esta secreción lleva el pH a un valor de 6-7 en el duodeno lo cual permite que las enzimas digestivas actúen con mayor eficacia.

4.4.2. Función endócrina.

El páncreas exócrino juega un papel importante en la función gastrointestinal, pero la influencia sobre el metabolismo corporal la ejerce el páncreas endócrino a través de las acciones de la insulina y el glucagón. El papel endócrino del páncreas fue reconocido por vez primera en 1886 cuando Minkowski y Von Mering produjeron diabetes en perros después de una pancreatometomía total.

4.4.3. Anatomía del Páncreas endócrino.

La función endócrina pancreática se lleva a cabo en los islotes de Langerhans.

En la actualidad se debate aún el origen de las células endócrinas del páncreas. Pearse sugirió que las células de los islotes se originan a partir del neuroectodermo; su hipótesis se basa en una característica enzimática común de las células endócrinas secretoras de polipéptidos, y que consiste en su capacidad para sintetizar aminas a partir de precursores comunes. Por ello las clasificó como pertenecientes al sistema APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxilation). (16)

Pearse ha sugerido que todas las células que tienen esa propiedad derivan de la cresta neural. Mientras que algunas células derivan de este tejido, tienen como principal función la secreción de aminas. Muchas de las células secretoras de polipéptidos retienen la capacidad para convertir precursores en sus aminas correspondientes tal es el caso de la conversión de dihidroxifenilalanina a dopamina y de 5-hidroxitriptófano a serotina. En experimentos con páncreas de feto de ratón se observó células claras sin gránulos secretores con características APUD, que más tarde contenían insulina y glucagón. Es posible que en un estadio muy precoz del desarrollo, estas células emigrasen hasta el intestino primitivo y más tarde formaran las células secretoras de péptidos de tubo digestivo y páncreas. La teoría APUD está confirmada por el hallazgo de células endócrinas secretoras de polipéptidos de origen

inequívocamente ectodérmico (células C de tiroides), que comparten características citoquímicas con las células APUD del páncreas endócrino e intestino .

Aunque aproximadamente hay un millón de islotes repartidos por todo el páncreas, su peso tan sólo representa el 1% del total, no obstante su bajo porcentaje, los islotes pancreáticos desempeñan un papel importante en el control del metabolismo, ya que además de insulina producen tres hormonas: Glucagón (una proteína antagonista de la acción de la insulina pues eleva los niveles de glucosa en la sangre), polipéptido pancreático (regula la liberación de las enzimas digestivas pancreáticas) y somatostatina (una proteína que inhibe la secreción de las hormonas producidas por los islotes).

Cada islote de Langerhans aloja aproximadamente a 300 células productoras de hormonas. Mediante la exposición de cortes de islotes a anticuerpos específicos para cada hormona, reforzada por el marcaje de estos anticuerpos con una molécula fluorescente, se ha demostrado que cada hormona se sintetiza en un diferente tipo de célula, las células Beta, constituyen más del 70% de la población celular de los islotes y secretan la insulina directamente a la circulación sanguínea.

4.4.4. Insulina.

La insulina es una proteína relativamente pequeña con peso molecular de 5734 daltones. En 1955 Sanger determinó su estructura, siendo la primera proteína secuenciada .

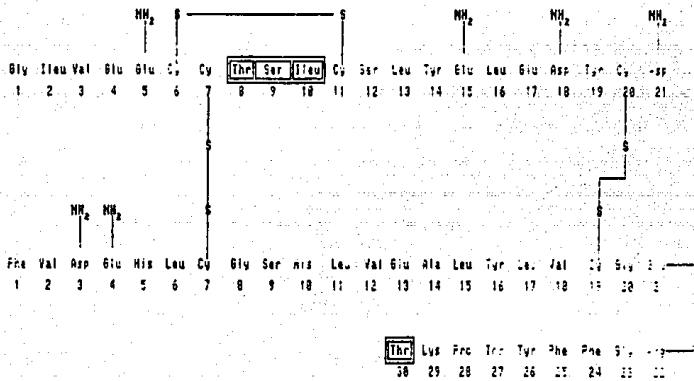
4.4.4.1. Química de la Insulina y Precursores.

La insulina cristalina generalmente contiene de 0.3 a 0.6% de zinc, con frecuencia se observan diversos dímeros y hexámeros. La insulina es relativamente más soluble a pH comprendidos entre 4 y 7. Su punto isoeléctrico es a pH=5.3 .

Como se muestra en la figura No 6, la molécula de insulina está formada por dos cadenas polipeptídicas diferentes (una cadena A que consiste en 21 aminoácidos que es ácida y una cadena B que consta de 30 aminoácidos la cual es básica), unidas por dos puentes disulfuro en las posiciones 7 y 20 de la cadena A y 7 y 19 de la cadena B.

El mecanismo de ensamblaje de esta proteína se descubrió en 1960 por Donald F. Steinert y colaboradores, ellos incubaron células con aminoácidos marcados con un isótopo radiactivo. Las células incorporaron aminoácidos en las proteínas, quedando así al descubierto por su marcador radioactivo. Así se descubrió que la insulina se sintetizaba realmente como un fragmento de una proteína mayor: Proinsulina.

La proinsulina tiene una cadena adicional a la insulina que se denomina Péptido C, éste se encuentra unido a la cadena A y B. El péptido de unión contiene residuos ácidos, prolina, lisina, alanina, valina y leucina. En ambos extremos del péptido C se encuentran regiones con gran proporción de residuos polares y poco más allá de estas regiones hay residuos básicos.



	Cadena A			Cadena B	
	8	9	10	30	31
Hombr	Thr	Ser	Ileu	Thr	-
Cerdo	Thr	Ser	Ileu	Ala	-
Conejo	Thr	Ser	Ileu	Ser	-
Guey	Phe	Ser	Val	Ala	-

FIGURA 6: Secuencia de insulina humana y su diferencia con algunas especies animales.

La porción central contiene elevada concentración de residuos de glicina rodeados por restos esencialmente hidrófobos. Esta composición indica que la parte central de la molécula es más flexible y de hecho puede plegarse sobre sí misma a través de las interacciones de la porción no polar dando lugar a una micela hidrófoba que puede interaccionar con una zona hidrófoba en la superficie de la molécula de insulina durante el plegamiento peptídico.

También se ha descrito un precursor de insulina de mayor tamaño, aproximadamente 11500 daltones. La traslación del RNA ha permitido la síntesis de suficientes cantidades de este material, como para identificarlo en la rata y lamprea. Los aminoácidos extras están localizados exclusivamente en el extremo amino; en la rata hay 24. Como sucede con otras proteínas presecretoras hay un gran número de aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas. Se ha sugerido que éstos son importantes para la unión de polisomas a la membrana microsomal durante la síntesis de proinsulina. Esta proteína que ha sido denominada Pre-proinsulina, es difícil de aislar en la célula intacta debido a que inmediatamente después de su síntesis es desdoblada a proinsulina.

4.4.4.2. Biosíntesis y almacenamiento de la insulina.

La Figura No. 7 es una representación esquemática de lo siguiente: En el núcleo de la célula beta, el gen que codifica la molécula precursora, la preproinsulina, se transcribe en Acido ribonucleico (RNA). El RNA mensajero, es exportado al citoplasma; aquí da instrucciones a las ribosomas anclados en el retículo

endoplasmático rugoso para que ensamblen aminoácidos y formen la preproinsulina. La presecuencia se corta probablemente cuando la preproinsulina entra en el retículo endoplasmático rugoso quedando la proinsulina; esta última se compone de la secuencia de aminoácidos que formará la insulina unida por el péptido C. La proinsulina unida probablemente a los receptores y las proteasas se transportan en pequeñas vesículas, hasta el polo Cis del aparato de Golgi; en este lugar se forman por evaginación vesículas que van hasta la siguiente cisterna y se fusionan con ella. Estas vesículas poseen una membrana con un recubrimiento distintivo. Cuando se alcanza el punto más alejado del Aparato de Golgi o Trans, las vesículas recubiertas con clatrina dan lugar a los gránulos de secreción revestidos. En estos gránulos las proteasas comienzan a hidrolizar el péptido C y las moléculas de proinsulina para producir insulina, este proceso va acompañado de la pérdida de revestimiento de clatrina, el resultado es la formación de los gránulos desnudos que contienen en su mayor parte insulina, que se libera a través de la membrana celular.

Puesto que los gránulos contienen insulina y péptido-C en proporciones equimolares, parece probable que el almacenamiento ocurra en primer lugar, y sea seguido por el desdoblamiento en el interior del gránulo. La insulina forma un complejo con el zinc y es almacenada. El gránulo de la célula Beta también contiene lípidos y en algunas especies monoaminas (16, 22, 23).

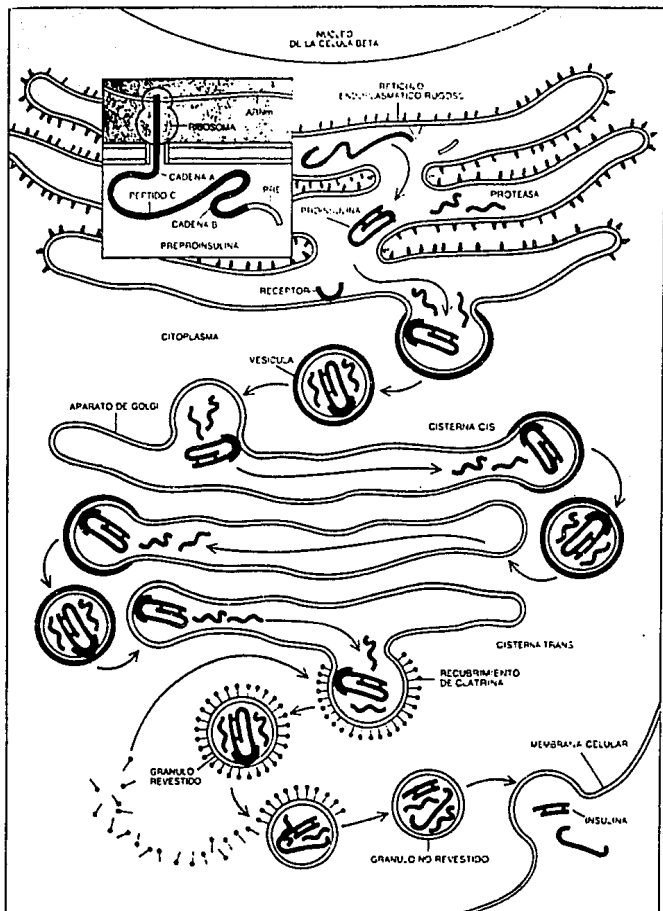


FIGURA 7 : Biosíntesis de la insulina.

El número de gránulos presente es un buen indicador de la cantidad de insulina disponible, sin embargo no refleja la velocidad de síntesis o liberación de la insulina, si no tan sólo el balance entre ambos procesos en algún momento. En el páncreas se almacena una gran cantidad de insulina (alrededor de 40 gramos o 200 unidades en el caso de el hombre).

En general cuando hay una disminución prolongada en la síntesis y secreción de insulina pueden observarse un número de cambios en las células beta sucediendo así un descenso en el tamaño del núcleo, menor número de gránulos, acentuación del Aparato de Golgi y disminución de ribosomas.

El microscopio electrónico demuestra que los gránulos de insulina varían considerablemente en sus propiedades tintoriales. Puesto que los gránulos más viejos son los primeros en ser liberados, probablemente las diferencias en la tinción representan diferentes estadios en el proceso de maduración de los gránulos. Sin embargo, sólo el 2 al 5% de la actividad insulínica en el páncreas es proinsulina.

4.4.4.3. Liberación de la insulina.

Los gránulos Beta se almacenan hasta que tiene lugar un estímulo en la secreción de insulina. En el proceso de liberación el primer cambio observado es la marginación de los gránulos beta en la membrana plasmática de la célula beta. Las paredes de estos sacos se fusionan con la membrana plasmática celular y se rompen liberando su contenido hacia el espacio extracelular. Lacy ha llamado a este proceso de eyección del gránulo

omeiocitosis (20). Tras la desaparición del gránulo, permanecen ciertas proyecciones citoplasmáticas llamadas microvilli, las cuales se extienden desde la superficie de la célula beta al espacio extracelular. El número de los microvilli aumenta en proporción directa a la tasa de secreción de gránulos beta por omeiocitosis.

La glucosa es el principal regulador de la célula Beta, el mecanismo de esta regulación ha sido intensamente estudiado, sin embargo Matchinsky mostró que la secreción de insulina tiene lugar en un animal sin aumento en la concentración de los intermediarios metabólicos de la glucosa en las células insulares. En base a éstos estudios perfiló que la primera fase de secreción de insulina o secreción precoz, es el resultado directo del reconocimiento de la glucosa como una molécula por un "glucorreceptor". Los estudios con aloxana "in vitro" han reforzado esta teoría. Este compuesto produce una inhibición inmediata de la secreción de insulina mediada por glucosa, pero no tiene ningún efecto sobre la secreción inducida por tolbutamida indicando así que los mecanismos secretores permanecen intactos. La glucosa impide su efecto tóxico; indicando una competición entre ambas sustancias; esta protección es estereoespecífica, la forma alfa-D-glucosa es más efectiva que la beta-D-glucosa. También es protector un análogo no metabolizable de la glucosa, 3-O-metil-D-glucosa lo que indica que el metabolismo no es imprescindible para el efecto protector. Puesto que el transporte de las hexosas permanece inalterado, parece claro que la aloxana no afecta este punto de la

interacción entre la glucosa y la membrana. El ácido barbitúrico también es protector, pero no parece que sea captado por las células de los islotes, todo ello hace pensar que la membrana celular es el punto de la acción (21).

La hipótesis del glucorreceptor no desecha el papel del metabolismo de la glucosa en la regulación de la liberación de insulina, más bien parece probable que la glucosa inicie la liberación a través del mecanismo del glucorreceptor de la membrana y al mismo tiempo potencie la eficacia de otros segretagogos a través de su mecanismo intracelular. Este papel de potenciador parece ser crítico puesto prácticamente ningún otro estimulador de la célula beta liberará insulina en la ausencia de glucosa. La glucosa también juega un papel crucial en la síntesis de insulina, pero el mecanismo de este efecto es desconocido.

El proceso de liberación de insulina desde las células beta requiere la presencia de calcio extracelular. La velocidad de liberación de insulina tras la estimulación con glucosa es directamente proporcional a la de captación de calcio por el islote esto ha dado lugar al concepto de que existe un acoplamiento entre el estímulo para la secreción de insulina por calcio de un modo análogo al proceso de acoplamiento estimulación-contracción en el músculo. Lacy ha mostrado evidencias sobre la existencia de "microtubulus" en las células beta y de su participación en el proceso de transporte intracelular de gránulos secretores hasta la membrana plasmática. Su hipótesis de trabajo es que el calcio dispara un proceso coontractil en el cual los microtubulus facilitan el movimiento de los gránulos

desde el interior de la célula a la superficie celular .

El movimiento por tanto parece ser necesario para la liberación, pero no ejerce ningún control sobre ella.

Aunque la emiocitosis es probablemente el mecanismo más importante de liberación de los gránulos Beta desde el punto de vista cualitativo, puede que no sea el único.

Como se observa en la Figura 8 los gránulos que contienen pro-insulina forman yemas en las cisternas de Golgi y pueden ser liberados por seis posible procesos:

- 1) Emeiocitosis convencional de gránulos secretores maduros en conjunción con elementos microtubulares contráctiles.
- 2) Emeiocitosis de gránulos secretores maduros.
- 3) Liberación de microvesículas independientes del aparato de Golgi.
- 4) Liberación de insulina del gránulo como resultado del aumento de la permeabilidad de la membrana granular, con retención de la membrana tras la evacuación de su contenido.
- 5) Emeiocitosis de los gránulos que han sufrido alteraciones físicas y químicas en su contenido.
- 6) Cambios fisicoquímicos en el contenido del gránulo seguidos por su peso hacia el citoplasma.

Aunque la mayoría de la insulina probablemente se libera a través del proceso a) , no se han explorado otros métodos.

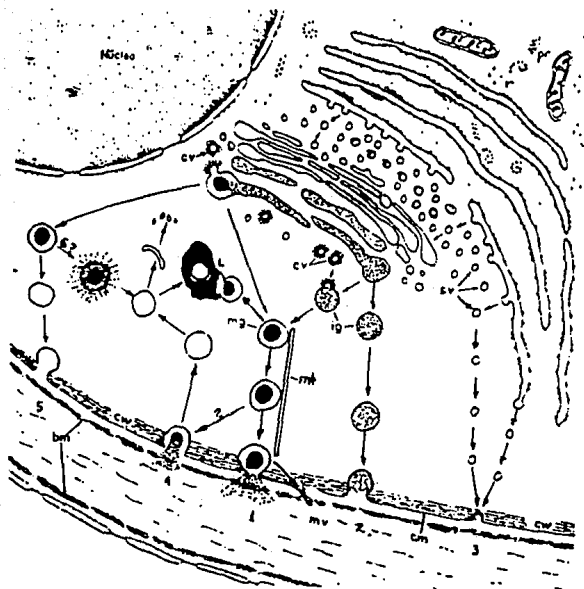


FIGURA 9 : Procesos de liberación de insulina.

- | | |
|-------------------------|---------------------------|
| ca = membrana celular | mg = granulos maduros |
| pr = polirribosoma | L = lisosoma |
| ig = granulos inmaduros | sv = microvesiculas |
| ba = membrana basal | r = ribosoma |
| mt = microtubulos | cv = vesiculas revestidas |
| mv = microvilli | cw = hendidura celular |

4.4.4.4. *Secreción basal de insulina.*

La secreción basal de insulina es la segregada en respuesta a señales endógenas en un individuo en reposo después de un ayuno nocturno, es decir, mucho después de la última comida, de tal modo que los nutrientes absorbidos ya no tienen un efecto directo sobre la célula Beta pancreática. En el hombre esto significa un ayuno nocturno de 16 horas. In vitro los niveles de glucosa inferiores a 100-125 mg/dl no estimulan la secreción de insulina. Por eso la secreción de insulina en situación basal probablemente es independiente de la glucosa.

La función de la glucosa a concentraciones inferiores a 100 mg/dl es análogo al papel permisivo de los esteroides en la regulación de la neoglucogénesis hepática. Puesto que los estimuladores puestos como aminoácidos, hormonas intestinales y neurotransmisores autonómicos, tienen una eficacia variable sobre la célula beta cuando los niveles de glucosa varían entre 25 y 100 mg/dl, parecen existir importantes interacciones entre la glucosa sanguínea y los niveles de otros estimuladores en la secreción basal de insulina.

Si el efecto de los factores neuroendócrinos aumenta la secreción de insulina, entonces los niveles de insulina basal tienden a ser más altos y el nivel de glucosa basal más bajo. Por el contrario, si tienden a inhibir la secreción de insulina, la glucosa basal tenderá a ser más alta mientras que la concentración de insulina basal será más baja.

4.4.4.5. Cinética de la liberación de insulina

Se cree que la glucosa regula la liberación de la insulina de tres modos diferentes, los cuales se ilustran en la Figura 9 :

- a) Como un controlador del depósito pequeño de tal modo que un cambio en la concentración de glucosa da lugar a una secreción rápida de insulina.
- b) Por su metabolismo como un regulador del depósito grande dando lugar a una respuesta tardía.
- c) Por la producción de un intermediario que regula la síntesis de insulina dando lugar a una respuesta muy tardía denominada secreción crónica de insulina.

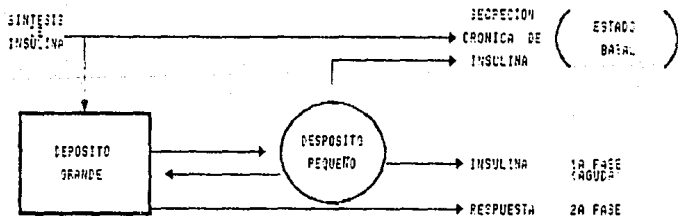


FIGURA 9 : Regulación de la secreción de insulina.

4.4.4.6. Distribución de la insulina y la Pro-insulina.

Existen muchos factores que influyen en la distribución de insulina, entre otros la velocidad de degradación en diferentes tejidos. Cuando en un hombre normal se inyecta insulina marcada con Yodo 131, después de una hora aparece menos del 15% de la insulina en el plasma. Tanto en diabéticos como en hombres sanos la insulina porcina tiene una vida media de menos de cinco minutos. Los estudios con ratas han mostrado que casi todos los tejidos acumulan alguna cantidad de insulina pero en concentraciones claramente diferentes; el cerebro y los eritrocitos captan muy poca hormona mientras que las mayores concentraciones se observan en el riñón y en el hígado, estos dos órganos junto con el músculo esquelético y el plasma acumulan el 61% de la insulina marcada inyectada (26).

El hígado es el órgano que capta más insulina, fundamentalmente porque la insulina segregada por el páncreas debe atravesar el hígado antes de alcanzar la circulación periférica; varios estudios han demostrado que del 40% al 50% de la insulina de la vena porta es captada por el hígado durante un sólo paso transhepático; 45 minutos después de la ingesta de glucosa, aparece insulina en la bilis.

Dado que el hígado secuestra una gran cantidad de insulina segregada, los cambios en la actuación de extracción hepática afectarán en gran medida la cantidad de insulina disponible por los tejidos periféricos.

El riñón extrae el 40% de la insulina presente en el plasma de la sangre que perfunde las arterias renales y este proceso no parece ser saturable.

La vida media de la insulina porcina es de 20 minutos en el cerdo y de 18 minutos en el mono. A diferencia de lo que sucede con la insulina, la pro-insulina y el péptido C no son aclarados cuando atraviesan el hígado de la rata. Así pues, el riñón es el principal órgano responsable del metabolismo de la pro-insulina.

La incapacidad del hígado para extraer la proinsulina en contraste con su gran eficacia en la extracción de insulina, podría explicar la gran diferencia de niveles plasmáticos de estas hormonas que se observan tras la administración de glucosa. Cuando se inyectó pro-insulina por vía intravenosa en ratas, no se pudo demostrar ninguna conversión de proinsulina a insulina una hora después, sin embargo, si la cantidad de pro-insulina fue lo suficientemente grande se observó una hipoglucemia marcada, lo que sugiere que la pro-insulina ejerce un efecto insulínico.

4.4.4.7. Degradación de insulina y pro-insulina.

Esencialmente cualquier tejido del cuerpo tiene la capacidad de degradar la insulina y prácticamente no se vuelve a formar insulina a partir de los productos de degradación. El hígado y el riñón constituyen los principales puntos de destrucción (aproximadamente un 80%). Gran parte de la insulina extraída por los riñones es degradada en lugar de excretada. En todos los tejidos estudiados (con excepción del páncreas), la

degradación de la pro-insulina tiene lugar a una velocidad del 10% de la degradación de la insulina.

4.4.4.8. Respuestas celulares a la insulina.

La insulina estimula las reacciones metabólicas para la síntesis y/o almacenamiento de carbohidratos, grasas, proteínas y Ácidos nucleicos. Regula el transporte de membrana de muchas sustancias y participa en la formación de macromoléculas.

Las siguientes son algunas de las funciones específicas de la insulina:

- a) Aumenta el transporte a través de la membrana plasmática de glucosa y otros monosacáridos, algunos aminoácidos, algunos ácidos grasos de potasio y magnesio.
- b) Aumenta la actividad de ATPasa sodio-potasio activada por magnesio.
- c) Aumenta la oxidación de la glucosa.
- d) Aumenta la glucogenogénesis.
- e) Aumenta la lipogénesis.
- f) Aumenta la síntesis de proteínas.
- g) Aumenta la formación de ATP, DNA y RNA.
- h) Disminuye la glucogenolisis.
- i) Disminuye la lipólisis.
- j) Disminuye la proteólisis.
- k) Disminuye la gluconeogénesis.
- l) Disminuye la ureogénesis.
- m) Disminuye la cetogénesis.

n) La insulina no estimula el transporte de glucosa en los eritrocitos y en la mayor parte de las zonas del cerebro; tampoco promueve la reabsorción tubular renal de la glucosa, ni la absorción de la glucosa por la mucosa intestinal.

4.4.4.9. Receptor de la insulina.

El mecanismo de acción de la insulina a semejanza del de otras hormonas peptídicas, se inicia por la unión a un receptor de superficie. Estos receptores específicos para la insulina, se han demostrado en adipocitos, hepatocitos y células musculares en las cuales la unión de insulina guarda relación con sus efectos biológicos.

La interacción insulina-receptor presenta las características generales de la unión hormona-receptor. El receptor es ampliamente específico para insulina activa y derivados de insulina. La insulina y sus derivados compiten por los lugares de unión en proporción directa a su actividad biológica; por ejemplo, la molécula de proinsulina que tiene una actividad biológica del 5% en relación con la de la insulina, compete con una cantidad 20 veces mayor a ésta. La insulina unida no es desplazada por péptidos no insulínicos tal como la hormona del crecimiento y glucagón, incluso cuando estas hormonas se encuentran en concentraciones muy altas.

El receptor de insulina es una glucoproteína con un peso molecular de 300,000 y puentes disulfuro. En la Figura No. 10 se muestra un modelo del receptor insulínico. En este modelo hipotético, se aprecian dos componentes de gran tamaño, cada uno

con un peso molecular de 125,000 y otros dos componentes más pequeños todos mantenidos con puentes disulfuro, cuando éstos se rompen la insulina se liga a una proteína de peso molecular de 125,000 (presumiblemente uno o ambos de los componentes de gran tamaño).

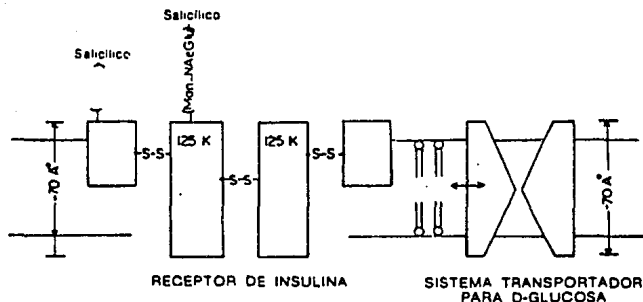


FIGURA 10 : Receptor de insulina.

En este modelo el sistema de transporte de la glucosa es adyacente al receptor aunque parece que ambos sistemas, son componentes diferentes de la membrana celular.

Gran parte de la insulina situada en el interior de la célula puede obtenerse intacta en los minutos que siguen al proceso de la incorporación hacia el interior lo que muestra que los complejos insulina-receptor se encuentran internalizados.

Como se observa en la figura No. 11 los complejos insulina-receptor del interior finalmente se asocian con estructuras lisosómicas, dando lugar a la degradación de la insulina, probablemente también tiene lugar la degradación del receptor en esta misma estructura.

La penetración de la insulina hacia el interior de la célula hace pensar que la hormona intacta o un producto de degradación pudieran ser mediadores intracelulares de su acción biológica: sin embargo, en este momento no hay evidencia que apoye esta posibilidad.

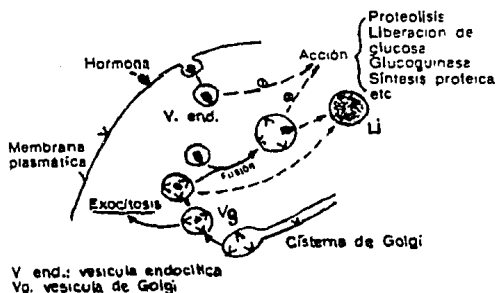


FIGURA 11 : Internalización del complejo insulina-receptor.

Tan sólo un bajo porcentaje de los receptores resultan ocupados por concentraciones de insulina lo suficientemente grandes como para tener efectos biológicos. Una disminución en el número de receptores no alteraría el efecto máximo de la insulina.

4.4.4.10. Regulación de los receptores insulínicos.

El mejor regulador de la unión de la insulina con el receptor es la propia insulina. La unión con el receptor está inversamente relacionada con el nivel de insulina circulante, cuando los niveles de insulina son muy altos la unión con el receptor resulta frenada (regulación negativa).

Aunque la unión de la insulina a los receptores de membrana está sometido a regulación y esta modulación puede contribuir a la sensibilidad de la célula respecto a las acciones de la insulina, a priori es imposible predecir la respuesta celular global a la insulina sobre las bases de la unión con el receptor, puesto que los acontecimientos que siguen a dicha unión son importantes y en ocasiones pueden predominar.

4.4.4.11. Acontecimientos de la unión postreceptor.

La señal o señales intracelulares que son generadas como resultado de la unión de la insulina a su receptor y que median los efectos insulínicos, por el momento no están bien caracterizadas. Quizás la capacidad de la insulina para bloquear el efecto lipolítico de un número de diversas hormonas se debe a la inhibición de la producción de Adenosin Mono Fosfato cíclico (AMPc) que resulta de la acción de estas hormonas.

4.4.4.12. Sistema de transporte de la glucosa.

El efecto de la insulina sobre el transporte de la glucosa esta muy estrecha entre relacionado con la unión a su receptor y ha sido demostrado en músculo esquelético, cardiaco y tejido adiposo pero no parece que el transporte de glucosa en los hepatocitos dependa de la insulina.

Algunos estudios sugieren que la insulina da lugar a un aumento en el reclutamiento de proteínas transportadoras de glucosa procedentes del aparato de Golgi hacia el interior de la membrana plasmática dando lugar a un aumento en el número de unidades transportadoras de glucosa otros estudios sugieren que la insulina activa moléculas transportadoras.

El sistema transportador de hexosas:

1) Muestra estereoespecificidad, en el sentido en que es receptivo para azúcares tales como galactosa, D-xilosa, y L-arabínosa, pero no para D-arabínosa, ramnosa, gluconato o glucoronato.

2) Presenta cinética de saturación, lo que habla a favor de una limitación en el número de transportadores específicos.

3) La velocidad de entrada de los azúcares hacia el interior de la célula es relativamente lenta en comparación con su difusión hacia el líquido extracelular.

4) Los azúcares sensibles a la insulina compiten entre sí por el transporte.

5) En el diafragma de la rata , el efecto insulínico es

más sensible a las variaciones de temperatura de lo que sería de esperar en un sistema de difusión simple.

La insulina promueve el uso prioritario de la glucosa para la formación de glucógeno en relación con otras vías metabólicas, lo cual ha sido atribuido a la capacidad de la insulina para estimular la glucógeno sintetasa. La anoxia y algunos inhibidores de fosforilación oxidativa, promueven la entrada de glucosa hacia el interior de las células pero no se observan algunas de las consecuencias metabólicas de la presencia de insulina, por ejemplo: la glucogenogénesis está muy reducida.

Muchos agentes efectivos sobre la membrana celular pueden activar el sistema transportador de la glucosa. Ha sido objeto de particular interés la activación de dicho sistema de transporte por agentes con múltiples sitios de unión con la membrana celular. Estos incluyen las lecitinas vegetales tales como la concanavalina A y la aglutinina del germen de trigo. Aunque no parece probable que estos agente se unan exclusivamente a los receptores insulínicos, promueven la acumulación localizada de los receptores sobre la membrana celular de un modo análogo a la formación de agregados de complejos insulina-receptor. Estos agentes también tienen efectos insulínicos sobre la lipólisis en los adipocitos.

También se ha observado activación del transporte de glucosa por anticuerpos frente a receptores insulínicos y a otros constitutivos de la membrana plasmática. Estos anticuerpos interfieren con la unión de la insulina y pueden activar el

sistema de transporte de la glucosa en adipocitos tripsinizados los cuales son incapaces de unir insulina. Los fragmentos monovalentes de estos mismos anticuerpos no tienen ningún efecto sobre el transporte de la glucosa, pero esta actividad puede recuperarse tras la administración de anticuerpos frente a los fragmentos. El conjunto de estos datos indica que los agentes capaces de tener una unión multivalente con la membrana celular pueden presentar un efecto semejante al de la insulina sobre el sistema transportador de glucosa.

No se puede determinar, de momento, si esta ligadura cruzada con las proteínas de la membrana constituyen un paso esencial para la actividad de la insulina.

También se han valorado las relaciones estructurales entre el receptor insulínico y el sistema transportador de glucosa. Utilizando complejos insulina-ferritina se han visualizado receptores individuales así como grupos de dos o tres receptores en la membrana de los adipocitos con independencia de la unión de estos receptores con la insulina. Cuando se utilizó Citocalisina B, una lecitina vegetal para romper los grupos de receptores, la actividad sobre el transporte de glucosa resultó bloqueada. La Citocalisina D un compuesto similar al anterior pero que no rompe los agregados de receptores de insulina, no tenía ningún efecto sobre el sistema transportador de glucosa. Estos hallazgos sugieren que existe una relación estructural muy íntima entre los receptores insulínicos y el sistema transportador de glucosa. El análisis de la proteína transportadora de glucosa obtenida de membranas celulares a

mostrado que se trata de una proteína estructuralmente distinta del receptor insulínico.

Además de los efectos inmediatos sobre la insulina, existen datos que hacen pensar que la insulina tiene un efecto a largo plazo sobre el sistema transportador de glucosa. En presencia de hiperinsulinemia inducida en ratas por la administración diaria de insulina o una dieta con elevado contenido de carbohidratos aumenta el transporte de glucosa mediado por la insulina en adipocitos. Por otra parte durante la hipoinsulinemia inducida por el ayuno o por la estreptozotocina, la respuesta a la insulina del sistema transportador de glucosa de los adipocitos estaba inhibida. Como antes se indicó estos efectos pueden superar las consecuencias de los cambios resultantes de la unión insulínica cuando éstos dan lugar en sentido opuesto.

4.4.5. Hiperglucemia experimental

Los modelos animales de diabetes mellitus han jugado un papel importante en la comprensión de la fisiopatología y etiología de la enfermedad. Estos modelos han sido muy útiles para la comprensión de las consecuencias del déficit de insulina y la regulación de la fisiopatología de la fuente de energía.

4.4.5.1 Pancreatectomía.

La pancreatectomía total o parcial, conduce a diabetes ocasionada por déficit de insulina y al mismo tiempo produce una deficiencia en somatostatina, glucagón y polipéptido pancreático.

Se estima que al menos el 75% del páncreas debe ser resecaado para poder observar hiperglucemia. La pancreatectomía total conduce a un estado con tendencia a la cetosis, lo que no se observa con una pancreatectomía parcial.

4.4.5.2. Hiperglucemia química.

a) Aloxana. Es tóxico para las células beta y da lugar a hiperglucemia tras su administración intravenosa en todas las especies animales excepto en cobaya y en pollo. El efecto tóxico del aloxana parece ser extracelular puesto que no resulta captada en los islotes sino que permanece en el espacio extracelular. El aloxana bloquea la liberación de insulina estimulada por la glucosa tanto in vivo como in vitro antes de la destrucción de la célula beta. Puesto que el efecto destructor del aloxana resulta inhibido por la glucosa y sus análogos algunos de los cuales no son metabolizables, se ha sugerido que el aloxana tiene un efecto tóxico directo sobre el glucorreceptor. De acuerdo con esta idea se ha observado que el anómero alfa de la glucosa y 3-O-metil glucosa son mejores protectores de la beta toxicidad del aloxana que el isómero beta. La vida corta en el plasma de esta substancia (uno o dos minutos) también apoya esta idea.

Tras la administración del aloxana se observan cambios histológicos que consisten en pérdida de gránulos seguidos por fragmentación del citoplasma y, al cabo de unas horas, acúmulo de cromatina y agregación de material intercromático en el núcleo de las células beta. En ninguna especie se ha observado efecto tóxico sobre las células Alfa. Esta substancia no es

particularmente eficaz en el tratamiento de insulinomas humanos. Se ha observado que el aloxana induce un cambio reversible en la sensibilidad de la lengua a la glucosa, estos estudios sugieren la existencia de sistemas receptores de glucosa en lugares distintos a las células beta que son del mismo modo sensibles al aloxana.

b) **Estreptozotocina.** Este producto es tóxico para las células beta de diversas especies incluyendo el cobaya, pero no el pescado o los pollos. En algunas especies resulta también dañadas las células alfa; por eso los efectos tóxicos de la estreptozotocina no son tan específicos como los del aloxana. La respuesta clínica a la droga consiste en una hiperglucemia permanente. La respuesta inicial se asocia con inhibición de la liberación insulínica por los islotes de los animales estudiados in vitro. La fase hipoglucémica probablemente representa el aumento en la liberación de insulina durante la destrucción tóxica de las células beta.

En contraste con los efectos del aloxana, la hiperglucemia inducida por estreptozotocina no es bloqueada por la glucosa o epinefrina. Sin embargo los efectos de estreptozotocina resultan anulados por la administración de 2-deoxi-D-glucosa y 3-o-metil glucosa.

Un resumen de los diferentes modelos experimentales de diabetes mellitus se muestra en la Figura No. 12

MODELOS EXPERIMENTALES EN DIABETES MELLITUS

TIPO Y ESPECIE

CARACTERISTICAS

QUIRURGICO

Pancreatectomia
Rata, perro, gato

Deficit hormonal global y agudo.
La forma inestable requiere una extirpacion superior a 90% .

QUIMICO

Aloxana
Rata, raton, primate y perro.

Deficit selectivo de las celulas B. Puede oscilar desde hiperglucemia leve a cetoacidosis.
La glucosa es protectora

Estreptozotocina

Rata, raton

Efecto dosis-respuesta gradual
La nicotinamida es protectora.
Las dosis multiples pueden dar lugar a insulinitis tardia

VIRICA

Variante EMC-M
Raton

Solo son suceptibles algunas razas

HIPERGLUCEMIA ESPONTANEA

Sindromes resistentes a la cetosis:

Raton amarillo
Raton obeso
Raton adiposo
Raton diabetico
Raton KK poligenico
Rata de arena
Raton espinoso

La mayor parte de estos animales muestran hiperplasia de celulas Beta e hiperglucemia

obeso
obeso, la severidad depende de la raza
obeso
obeso, la severidad de la hiperglucemia depende de la raza
delgado, insulin-resistente
obesos, puede no ser hiperglucemicos
Hiperglucemia dependiente de la dieta

Sindromes con tendencia a la cetosis:

Hamster chino

Rata BB

Por lo general delgados con bajos niveles de insulina

Herencia variable, la forma clinica oscila entre hiperglucemia leve a cetosis

Insulinitis de inicio brusco, perdida selectiva de celulas Beta
Mueren en cetoacidosis

4.5. DIABETES.

4.5.1. Principios generales.

La diabetes mellitus se considera como un síndrome con respuesta variable al tratamiento.

Aunque en ausencia de un factor genético fácilmente medible, la presencia o ausencia de diabetes mellitus se puede considerar mediante la observación de los siguientes puntos:

a) Hiperglucemia. Existe una anomalía en el metabolismo de los carbohidratos que resulta en hiperglucemia y que a menudo se asocia con catabolismo acelerado de grasas y proteínas. Esta anomalía probablemente contribuye a las otras manifestaciones pero no parece que sea la única causa.

b) Macroangiopatía. Existe aterosclerosis acelerada y calcificación de la capa media.

c) Microangiopatía. Existe una anomalía en la membrana basal capilar caracterizada por engrosamiento y anomalía en la función. Estas lesiones capilares se suelen denominar concomitantes microvasculares de la diabetes

d) Neuropatía. Existen defectos sensoriales y motores periféricos, alteración en el sistema nervioso autónomo, desmielinización segmentaria y anomalías en las células de Schwann.

Ninguna de estos hallazgos es específico de la diabetes.

4.5.2. Clasificación clínica de la diabetes.

En los últimos años ha quedado claro que entre los diversos tipos clínicos no sólo existen diferencias clínicas sino también genéticas. En la Figura No. 13 se enumeran las diferencias entre los tipos más comunes. Aunque en cada caso las diferencias genéticas interaccionan con factores ambientales para producir el cuadro clínico final, la importancia y naturaleza de cada factor ambiental varía según el rasgo genético.

4.5.2.1. Diabetes juvenil.

Este tipo también es conocido como diabetes insulino-dependiente. Tiene un comienzo brusco, hiperglucemia severa y rápida progresión hacia la cetoacidosis y muerte a menos que sea tratada con insulina. Al rededor del 50% de estos pacientes son diagnosticados antes de los 21 años, con el pico de incidencia en torno a la pubertad. No se considera una enfermedad congénita aunque existan casos en niños menores de 1 año de edad.

Clinicamente los pacientes con este tipo de diabetes son delgados y después del tratamiento hay poca tendencia a la obesidad.

En la separación de los diversos grupos de diabetes mellitus, han resultado muy útiles los estudios clínicos con gemelos monocigóticos. Utilizando el British Diabetes Association Registry, Pyke y col. (43) lograron identificar más de 90 parejas en las cuales al menos uno de los gemelos padecía diabetes mellitus. Analizando la frecuencia de concordancia y discordancia se observó un fenómeno llamativo en relación con la edad. En casi

todos los gemelos diagnosticados como diabéticos después de los 45 años, había una concordancia completa para la diabetes en el otro gemelo y dentro de los cuatro años; en contraste, sólo el 50% de los gemelos de aquellos diagnosticados antes de los 45 años desarrollaron diabetes mellitus clínica. Continuando el análisis se observó que los diagnosticados antes de la edad de 45 años fueron casi siempre casos de comienzo súbito, tratados con insulina del tipo denominado diabetes juvenil; aquellos diagnosticados después de los 45 años, fueron casi siempre de comienzo lento, no insulín-dependientes. Estos datos indican que algún factor ambiental es importante en la diabetes del tipo juvenil, mientras que los factores genéticos pueden ser suficientes para dar lugar a la diabetes de tipo adulto. Esto no quiere decir que todos los diabéticos del tipo adulto tengan la misma anomalía genética, y que los diabéticos del tipo juvenil carezcan de un factor genético predisponente.

Aunque los estudios con gemelos indican que debe de existir una importante influencia ambiental en la patogéniá de este síndrome, también hay una evidencia importante en favor de un factor genético. Se ha demostrado que la diabetes juvenil en caucásicos se asocia con antígenos HLA-B-8 y BW-15 del sistema de histocompatibilidad. Desafortunadamente no existe un marcador absoluto en la diabetes tipo juvenil; aunque sea necesario el tratamiento con insulina.

4.5.2.2. Diabetes del adulto.

Se le denomina diabetes no insulín-dependiente. Los pacientes pueden sobrevivir sin desarrollar cetoacidosis en ausencia del tratamiento con insulina; son generalmente obesos, por lo general, este tiene un comienzo lento y asintomático. Este tipo no se asocia con ningún antígeno HLA.

La incidencia de diabetes no insulín-dependiente es mayor entre los familiares de personas de las personas diagnosticadas de esta enfermedad que la que se observa entre los miembros de la familia de los pacientes con diabetes juvenil.

La diabetes del adulto es una de las enfermedades crónicas más comunes, afectando al 1-5% de la población total. Son individuos de más de 45 años. El número de casos de diabetes es 10 veces mayor que en aquellos con edad por debajo de los 45; por eso está claro que la diabetes juvenil es mucho menos frecuente. La incidencia del adulto en mujeres es aproximadamente del 25% mayor que en varones.

Insulina

En pacientes con hiperglucemia basal moderada (115-200mg/dl), la secreción basal de insulina es normal. Más aún, los niveles de insulina pueden estar elevados debido a la frecuente presencia de obesidad en este grupo de pacientes. Tanto en sujetos normales como en enfermos con diabetes del adulto, los niveles basales de insulina no guardan relación con la glucosa basal, sino más bien aumentan y disminuyen con cambios en la adipocidad relativa. Presumiblemente, esto representa un cambio

compensador en relación con la resistencia a la insulina asociada a la obesidad. Esta compensación permanece prácticamente alterada en pacientes con hiperglucemia basal leve o moderada.

Cuando se administra glucosa intravenosa a sujetos normales se observa un incremento máximo en los niveles de insulina al cabo de 3-5 minutos que es comparable a la primera fase de la secreción de insulina que se aprecia durante la estimulación in vitro. En los diabéticos adultos (120mg/dl) no se observa esta primera fase de secreción de la insulina durante la administración intravenosa de glucosa. Los niveles de insulina entre los 10-60 minutos después del pulso de glucosa son comparables a la segunda fase de la respuesta insulínica in vitro y muestran gran variabilidad. Las respuestas secundarias a la glucosa intravenosa en diabéticos adultos delgados se encuentran reducidas en aquellos con una concentración mayor de 120 mg/dl o más.

CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS DOS GRANDES TIPOS DE DIABETES MELLITUS

TERMINOLOGIA DEL GRUPO DE DIABETES	DIABETES MELLITUS INSULIN-DEPENDIENTES	DIABETES MELLITUS NO INSULIN-DEPENDIENTES
TERMINOLOGIA CLINICA ALTERNATIVA	Diabetes de comienzo juvenil Diabetes inestable	Diabetes de la madurez Diabetes del adulto Diabetes estable
EDAD DE COMIENZO	Generalmente menos de 40	Generalmente mas de 40
GENETICA	Menos de 10% de parientes de primer grado afectados	Mas de 20% de parientes de primer grado afectados
HLA	Asociado con HLA-B-8, BW-15, DW-3, DW-4	No hay asociacion con HLA
INMUNIDAD	Aumento de fenomenos autoinmunes	No aumento de fenomenos autoinmunes
PESO CORPORAL	Generalmente delgados	Generalmente obesos
METABOLISMO	Tendencia a cetosis	Resistente a cetosis
TRATAMIENTO	Insulina	Adelgazamiento. Puede necesitar insulina o agentes orales

FIGURA 13

M A T E R I A L Y M E T O D O S

5.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Se emplearon ratas adultas macho de la cepa Long-Evans de 4-5 meses de edad y de 330±30 g de peso.

Durante los experimentos las ratas se mantuvieron en condiciones controladas de luz y temperatura "ad libitum" (10-14 h y 20°C).

5.2. METODO.

Las ratas se dividieron en nueve grupos :

- 1) Control
- 2) Tratados con aloxana al 10 % y trascurridas 96 horas se les sacrificó.
- 3) Tratados con aloxana al 10% , después de 96 horas se les aplicó una dosis de insulina y otra más al día siguiente. 24 horas más tarde fueron sacrificadas.
- 4) Tratados con aloxana al 10%, después de 96 horas aplicación de Insulina cada 24 horas durante 3 días el tercer día se aplicó 2 horas antes del sacrificio
- 5) Tratados con aloxana al 10%,. después de 96 horas aplicación de Insulina y 2 horas después sacrificio.
- 6) Tratados con aloxana al 10% después de 96 horas administración de arginina a una concentración de

100 mcg/Kg de peso cada 24 horas durante 3 días y al tercer día la dosis se aplicò 2 horas antes del sacrificio.

- 7) Tratados con aloxana al 10% despuès de 96 horas aplicaciòn de arginina a una concentraciòn de 100mcg/Kg de peso dos horas antes del sacrificio.
- 8) Tratados con aloxana al 10% despuès de 96 horas tratamiento con espermidina a una concentraciòn de 1mg/Kg de peso dos horas antes del sacrificio
- 9) Tratados con aloxana al 10% y despuès de 96 horas tratamiento con espermidina [5mg/kg de peso] dos horas antes del sacrificio.

A los grupos de ratas tratadas con aloxana al 10% (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) disuelta en cloruro de sodio 0.154 M se les aplicò una dosis de 120 mg/Kg de peso por la arteria caudal media que se ilustra en la figura No. 14.

La dosis de insulina de acciòn intermedia (CP 310S, NPH; Lilly, Tlalpan, México) para los grupos a los cuales se les suministrò fue de 1.5 U/100 g de peso

La dosis de arginina suministrada fue de 100 mcg/Kg de peso, por vía intramuscular tal soluciòn fue preparada en agua estèril a una concentraciòn de 0.1 mg/ml.

Con respecto a las dosis de espermidina empleadas, se suministrò 1 mg/Kg de peso y 5 mg/Kg de peso por vía intramuscular, tales soluciones fueron hechas en agua estèril a concentraciones de 1 mg/ml y 5 mg/ml respectivamente.

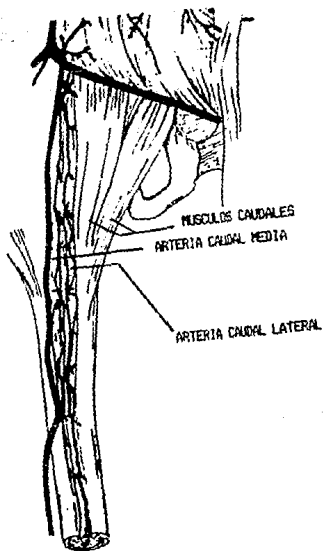


FIGURA 14 : Arteria caudal media.

5.3. PREPARACION DE LA MUESTRA.

5.3.1. Extracción de sangre y tejido pancreático.

En todos los grupos las ratas fueron sometidas a un ayuno durante 18 horas antes de haber sido sacrificadas.

Se administró Dehydrobenzperidol solución inyectable 2.5 mg/ml (Janssen Pharmaceutica, Puebla, México) como tranquilizante, a una dosis de 2.5 mg/Kg de peso. Después de 15 minutos se aplicó Ketamina (solución inyectable 50 mg/ml) como anestésico a dosis de 50 mg/Kg de peso y transcurridos otros 15 minutos se procedió a realizar disección por la línea media (Figura 15).

La sangre fue obtenida de la arteria aorta inferior antes de llegar a su bifurcación hacia las femorales (Fig 16). Una vez extraídos de 5-6 ml de sangre se procedió a disecar el páncreas.

5.3.2. Preparación de las muestras

a) La sangre arterial se incubó a 37°C durante 15 minutos, posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos y se recuperó el suero separando los componentes celulares.

b) El páncreas fue disecado y una vez que se eliminaron los restos de tejido adiposo, se procedió a pesarlo y homogenizarlo en 3.5 ml de solución de cloruro de sodio 0.154 M. Inmediatamente después se separaron las alícuotas para realizar las diversas determinaciones programadas.

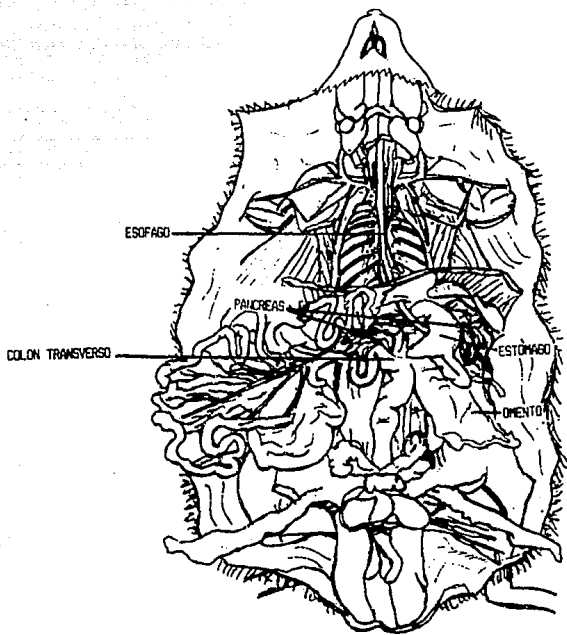


FIGURA 15 : Anatomía de la rata (línea media).

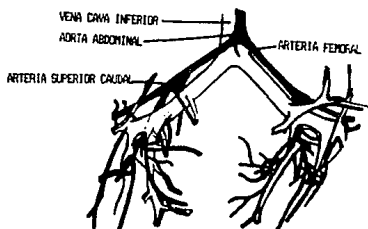
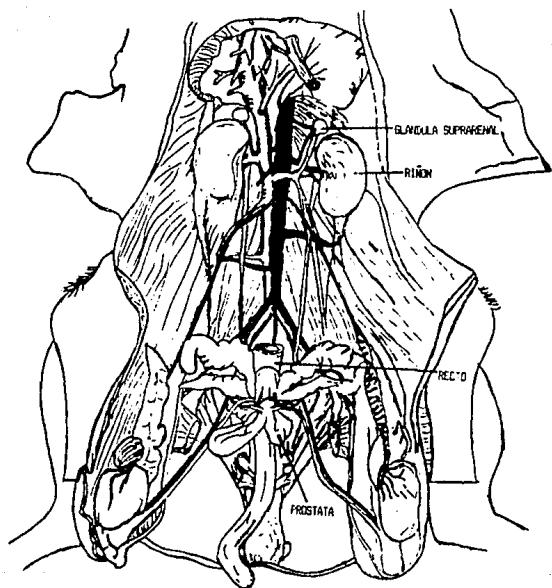


FIGURA 16 : Sistema circulatorio de la rata.

5.3.3. Separación de alícuotas.

Las muestras de suero sanguíneo y de homogenizado obtenidas de ambos grupos de ratas se separaron y analizaron de la siguiente manera:

En suero

- 1) Glucosa 20 mcl
- 2) Triacilglicéridos 10 mcl
- 3) Actividad de alfa-amilasa 40 mcl
- 4) Actividad de arginasa Dilución 1:100 con amortiguador estipulado y tomar 900 mcl
- 5) Proteínas dilución 1:10, tomar 10 mcl

En homogenizado

- 1) Peso Seco 50 mcl
- 2) Actividad de arginasa 200 mcl
- 3) Proteínas 100 mcl

5.4. Análisis bioquímicos

Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado. Los fundamentos, la preparación de reactivos y elaboración de curvas estándar se incluyen en el Apéndice capítulo IX del presente estudio.

5.4.1. Determinaciones en suero sanguíneo.

5.4.1.1. Glucosa (Test-combination glucosa GOD-POD. Boehringer, Mannheim, Alemania Occidental).

Después de tomar la alícuota de 20 mcl de suero se le

agregó 2.0 ml de amortiguador/enzimas/4-aminofenazona/fenol, se mezcló perfectamente, se incubó 10 minutos a 37°C en la oscuridad y se midió la absorbancia final a 530 nm previa calibración del colorímetro (CP-1 Science essentials) frente al blanco reactivos.

5.4.1.2. Triacilglicéridos. (Reactivo Triacilglicéridos Color. Gilford Systems, Oberlin, Ohio, U.S.A.)

A 10 μ cl de suero se le añadió 1.0 ml del reactivo Triacilglicéridos Color, una vez transcurridos 20 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) se realizó una lectura de absorbancia a 530 nm en espectrofotómetro previamente calibrado (UNICAM 1800) frente a un blanco de reactivos.

5.4.1.3. Alfa-amilasa. (Reactivo Alfa-amilasa. Gilford Systems, Oberlin Ohio U.S.A.)

A una alícuota de 40 μ cl se le agregó 1.0 ml del reactivo para alfa-amilasa después de un periodo de incubación a 37°C en una celda se realizó una lectura de absorbancia inicial a 405 nm en espectrofotómetro (UNICAM 1800) y una lectura más de absorbancia final una vez transcurrido 1 minuto, frente a un blanco de reactivos.

5.4.1.4. Actividad de arginasa. (27).

A una alícuota de suero se le hizo una dilución 1:100 con amortiguador de Tris HCl 0.04M conteniendo cloruro de manganeso 0.2 mM en NaCl 0.154 M. De esta dilución se tomaron

0.9 ml y se activaron a 55°C durante 1 h. Al final de este tiempo se agregó 0.1 ml de una solución acuosa de arginina 0.4 M / glicina 0.15 M, se incubó durante 15 min a 37°C y pasado este lapso, esta mezcla se sumergió en un baño de agua hirviendo durante 7 min. Después de esto se tomó una alícuota de 0.2 ml para medir la actividad de arginasa cuantificando la urea según el método propuesto (apêndice).

5.4.1.5. Proteínas. (28).

Una alícuota de suero fuê diluida 1:10 y de esta dilución se tomaron 10 mcl para determinar proteínas según el método propuesto por Lowry (apêndice).

5.4.2. Determinaciones en tejido pancreático.

5.4.2.1. Peso Seco. (29).

Se utilizaron 50 mcl del homogenizado para la determinación de peso seco por colorimetría.

5.4.2.2. Actividad de Arginasa. (27).

A 200 mcl de homogenizado se les adicionó 0.5 ml de amortiguador de Tris HCl 0.04M conteniêdo cloruro de manganeso 0.2 mM disuelto en solución salina 0.154 M. Se activó durante 1 h. a 55°C y se centrifugó. Una alícuota del sobrenadante se diluyó 1:100 y de esta dilución se tomaron 0.9 ml a los cuales se les agregó 0.1 ml de una solución acuosa de arginina 0.4 M y glicina 0.15M, se incubó durante 15 min. a 37°C y pasado este lapso de tiempo se introdujo la mezcla de reacción en un baño

de agua hirviendo por 7 min, una vez terminado esto se procedió a separar una alícuota de 0.2ml para determinar la actividad de arginasa cuantificando la urea.

5.4.2.3. Proteínas. (28).

A 100 ml de homogenizado se le agregaron 0.5ml de NaOH 1N, la mezcla así obtenida se incubó durante 30 minutos a 37°C, se centrifugó y al sobrenadante se le diluyó 1:10. De esta dilución se tomaron 0.2 ml para la determinación de proteínas.

RESULTADOS

Los resultados del presente estudio se expresan a través de gráficas comparativas para cada determinación. En cada una de ellas se ven reflejadas los valores obtenidos para los grupos de ratas implicadas.

Por otra parte, las valores de desviaciones estándar y el número de muestras involucradas en cada análisis se encuentran expresados en las tablas correspondientes.

Por cuestiones prácticas se hará referencia a un número cuando se hable de los grupos de ratas sometidos a estudio, Tal relación se encuentra en la Figura No 17.

GLOSARIO DE ELEMENTOS EN GRAFICAS

CLAVE	GRUPO
1	CONTROL.
2	TRATADO CON ALOXANA (DIAETICAS).
3	TRATADO CON ALOXANA E INSULINA CADA 24 hrs. DURANTE DOS DIAS.
4	TRATADO CON ALOXANA E INSULINA CADA 24 hrs. DURANTE 3 DIAS, LA ULTIMA DOSIS 2 hrs. ANTES DEL SACRIFICIO.
5	TRATADO CON ALOXANA E INSULINA 2 hrs. ANTES DEL SACRIFICIO.
6	TRATADO CON ALOXANA Y ARGININA 100 mg/Kg CADA 24 hrs. DURANTE 3 DIAS, LA ULTIMA DOSIS 2 hrs. ANTES DEL SACRIFICIO.
7	TRATADO CON ALOXANA Y ARGININA 100 mcg/Kg 2 hrs. ANTES DEL SACRIFICIO.
8	TRATADO CON ALOXANA Y ESPERMIDINA 1 mg/Kg 2 hrs. ANTES DEL SACRIFICIO.
9	TRATADO CON ALOXANA Y ESPERMIDINA 5 mg/Kg 2 hrs. ANTES DEL SACRIFICIO.

FIGURA 17

6.1. DETERMINACION DE GLUCOSA EN SUERO.

Para el grupo de ratas control , el contenido de glucosa en suero se encuentra entre los 120-130 mg/dl. En el caso de las ratas que fueron sometidas a la acción de la aloxana, tal valor se incrementa 2.63 veces (338 mg/ dl).

En esta determinación cabe señalar que los grupos de interés son los grupos tratados con insulina dos horas antes de su sacrificio pues son ellos quienes logran bajar el nivel de glucosa en suero entre 75-50% en promedio.

Los grupos tratados con arginina y espermidina no tienen una recuperación significativa en sus niveles de glucosa e incluso en el grupo No 6 tratado con arginina tales niveles se ven aumentados.

6.2. TRIACILGLICERIDOS EN SUERO.

La concentración de triacilglicéridos en suero se ve incrementada al doble en las ratas tratadas con aloxana. La recuperación en los niveles de dicho parámetro se da al igual que para la glucosa en los grupos a los cuales se les administró insulina 2 horas antes de su sacrificio (grupo 4 y 5), sin embargo, la recuperación en los niveles también ocurre en los grupos No 6 y 9 tratados con arginina y espermidina respectivamente.

6.3. PROTEINAS EN SUERO.

Los valores obtenidos en este parámetro no tienen diferencias significativas, a pesar de ello cabe señalar que la recuperación del nivel de proteínas en suero no se da en ninguno de los grupos sometidos a tratamiento comparados con el grupo control, todos ellos tienen valores menores a la referencia.

6.4. ALFA AMILASA EN SUERO.

La concentración de la enzima se encuentra disminuida en un 45% para el grupo de ratas tratadas con aloxana en relación con el grupo control. Es importante señalar que el grupo tratado con arginina (No 7) recuperó la actividad de la enzima en un 100%, lo mismo ocurrió en el grupo No 5 tratado con insulina, para el caso del grupo al que se le suministró espermidina a una concentración de 5 mg/ Kg de peso, tal recuperación fue de 85%.

6.5. PROTEINAS EN HOMOGENIZADO.

Con respecto a la cantidad de proteína en homogenizado, el valor determinado para el grupo control se recuperó para el grupo No 4 tratado con insulina, y los grupos No 8 y 9 tratados con espermidina.

Los grupos restantes no muestran una recuperación de los niveles control.

6.6. ACTIVIDAD DE ARGINASA EN SUERO.

La actividad más baja de esta enzima se encuentra en el grupo tratado con la mayor concentración de espermidina. El resultado de este parámetro para el grupo de ratas tratadas con aloxana se eleva en comparación con el grupo control, la misma situación ocurre para los grupos de ratas tratadas con insulina y con arginina.

6.7. ACTIVIDAD DE ARGINASA EN HOMOGENIZADO.

La concentración control para esta determinación no se ve recuperada en ninguno de los casos propuestos, por el contrario, se ve disminuida aún más que el grupo aloxanizado, el grupo que tiende a la recuperación de los niveles basales de actividad es el tratado con arginina (Grupo No 6).

GLUCOSA EN SUERO

GRUPO DE RATAS	mg/dl	NUMERO DE RATAS
1 CONTROL	128.65 + 7.31	6
2 DIABETICAS	338.48 + 52.99	4
3 INSULINA GRUPO 1	151.23 + 134.45	4
4 INSULINA GRUPO 2	32.55 + 40.26	4
5 INSULINA GRUPO 3	66.20 + 16.94	4
6 ARGININA GRUPO 1	399.23 + 84.84	4
7 ARGININA GRUPO 2	253.14 + 144.69	4
8 ESPERMIDINA GRUPO 1	235.14 + 131.93	4
9 ESPERMIDINA GRUPO 2	261.41 + 77.76	4

TRIACILGLICERIDOS EN SUERO

GRUPO DE RATAS	mg/dl	NUMERO DE RATAS
1 CONTROL	41.15 + 8.22	6
2 DIABETICAS	87.33 + 6.73	4
3 INSULINA GRUPO 1	132.59 + 44.60	4
4 INSULINA GRUPO 2	36.05 + 3.89	4
5 INSULINA GRUPO 3	38.54 + 5.40	4
6 ARGININA GRUPO 1	50.51 + 11.75	4
7 ARGININA GRUPO 2	87.40 + 23.72	4
8 ESPERMIDINA GRUPO 1	76.92 + 35.68	4
9 ESPERMIDINA GRUPO 2	46.12 + 9.97	4

ALFA AMILASA EN SUERO

GRUPO DE RATAS	mg/dl	NUMERO DE RATAS
1 CONTROL	1240 + 224.68	12
2 DIABETICAS	679.9 + 72.20	4
3 INSULINA GRUPO 1	1633 - 871.62	4
4 INSULINA GRUPO 2	971.2 + 186.85	4
5 INSULINA GRUPO 3	1294.7 + 128.62	4
6 ARGININA GRUPO 1	842.2 + 132.0	4
7 ARGININA GRUPO 2	1296 + 91.45	4
8 ESPERMIDINA GRUPO 1	958.1 + 285.75	4
9 ESPERMIDINA GRUPO 2	1059 + 141.13	4

PROTEINAS EN SUERO

GRUPO DE RATAS	g/dl	NUMERO DE RATAS
1 CONTROL	8.55 - 0.48	12
2 DIABETICAS	7.09 + 0.31	4
3 INSULINA GRUPO 1	6.49 + 0.35	4
4 INSULINA GRUPO 2	5.95 + 0.33	4
5 INSULINA GRUPO 3	7.99 + 0.95	4
6 ARGININA GRUPO 1	6.46 + 0.04	4
7 ARGININA GRUPO 2	7.29 + 0.69	4
8 ESPERMIDINA GRUPO 1	7.37 + 0.30	4
9 ESPERMIDINA GRUPO 2	6.68 + 0.77	4

PROTEINAS EN HOMOGENIZADO

GRUPO DE RATAS	mg proteina/ mg peso seco	NUMERO DE RATAS
1 CONTROL	0.489 + 0.70	8
2 DIABETICAS	0.738 + 0.12	4
3 INSULINA GRUPO 1	0.716 + 0.10	4
4 INSULINA GRUPO 2	0.424 + 0.04	4
5 INSULINA GRUPO 3	0.811 + 0.03	4
6 ARGININA GRUPO 1	0.807 + 0.04	4
7 ARGININA GRUPO 2	0.566 + 0.10	4
8 ESPERMIDINA GRUPO 1	0.423 + 0.05	4
9 ESPERMIDINA GRUPO 2	0.432 + 0.05	4

ARGINASA EN SUERO

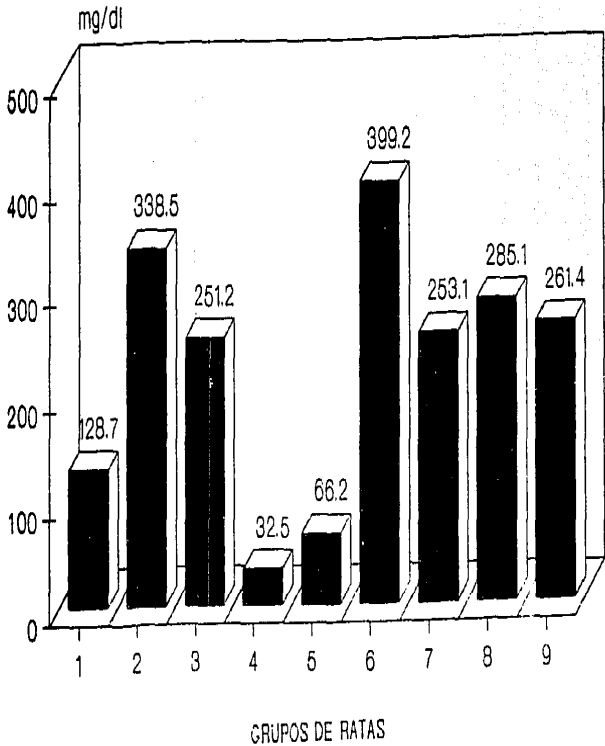
GRUPO DE RATAS	mg/dl	NUMERO DE RATAS
1 CONTROL	11.53 + 0.35	7
2 DIABETICAS	17.93 + 1.63	6
3 INSULINA GRUPO 1	20.01 + 6.26	4
4 INSULINA GRUPO 2	27.15 + 9.58	4
5 INSULINA GRUPO 3	22.76 + 5.73	4
6 ARGININA GRUPO 1	22.95 + 1.77	4
7 ARGININA GRUPO 2	18.06 + 4.19	4
8 ESPERMIDINA GRUPO 1	15.87 + 1.89	4
9 ESPERMIDINA GRUPO 2	10.14 + 1.70	4

ARGINASA EN HOMOGENIZADO

GRUPO DE RATAS	mg/dl	NUMERO DE RATAS
1 CONTROL	684 + 68.12	4
2 DIABETICAS	204.7 + 29.15	6
3 INSULINA GRUPO 1	175.6 + 40.77	4
4 INSULINA GRUPO 2	87.9 + 12.90	4
5 INSULINA GRUPO 3	65.3 + 7.66	4
6 ARGININA GRUPO 1	273.0 + 107.45	4
7 ARGININA GRUPO 2	133.5 + 30.36	4
8 ESPERMIDINA GRUPO 1	199.9 + 36.06	4
9 ESPERMIDINA GRUPO 2	15.9 + 11.37	4

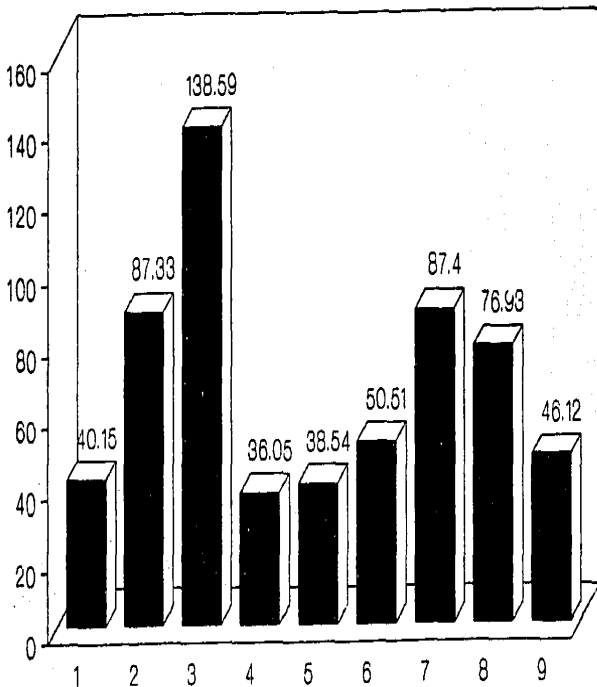
GLUCOSA EN SUERO

mg/dl



TRIACILGLICERIDOS EN SUERO

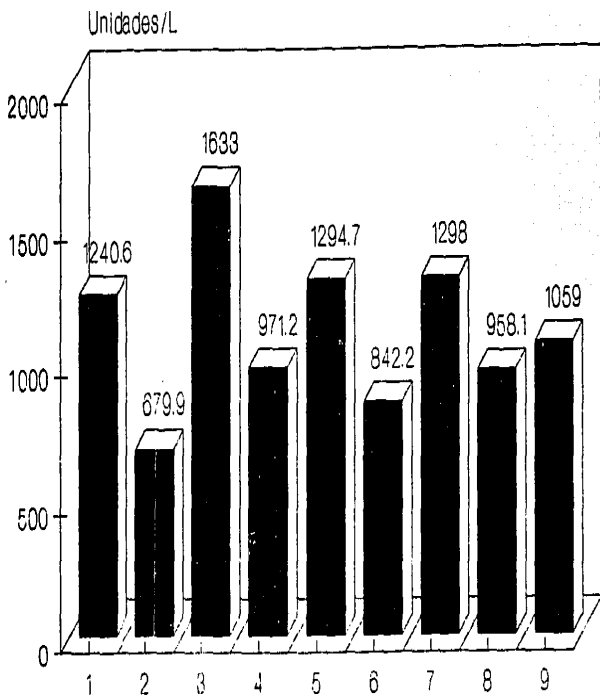
mg/dl



GRUPOS DE RATAS

ALFA AMILASA EN SUERO

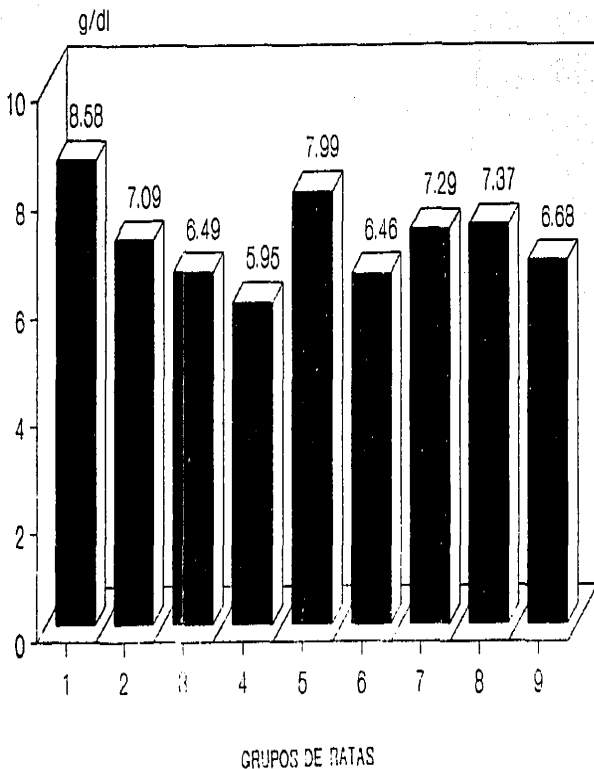
Unidades/L



GRUPOS DE RATAS

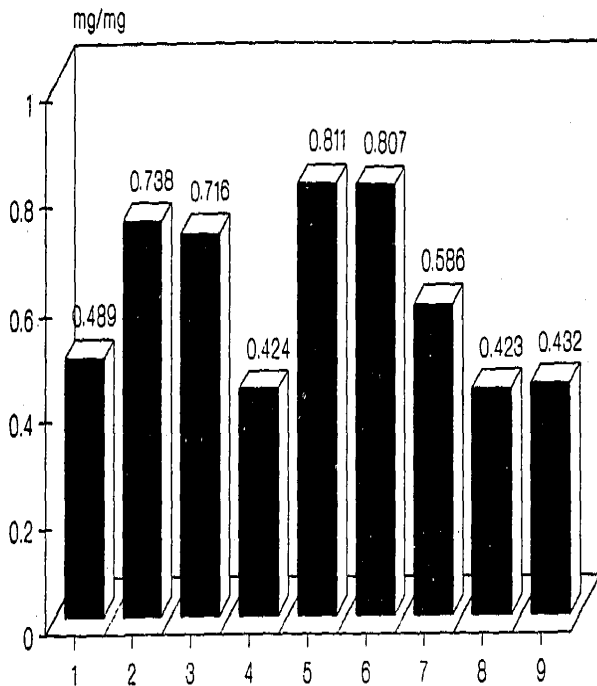
PROTEINAS EN SUERO

g/dl



PROTEINAS HOMOGENIZADO

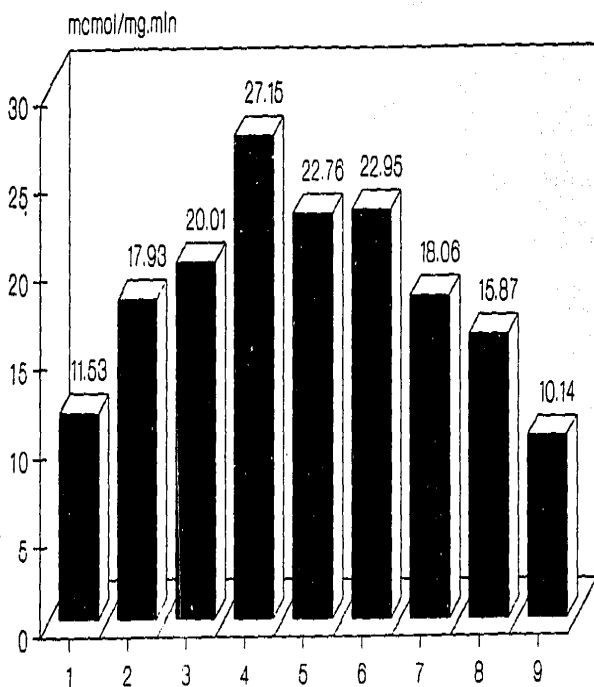
mg prot/mg peso seco



GRUPOS DE RATAS

ACTIVIDAD ARGINASA SUERO

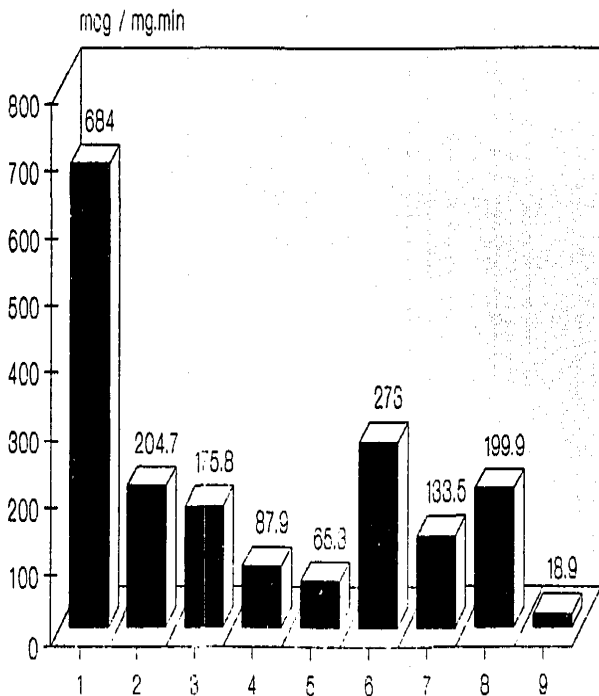
mcmol urea/mg prot.min



GRUPOS DE RATAS

ARGINASA EN HOMOGENIZADO

mcg urea/ mg proteina.min



GRUPOS DE RATAS

V I I

D I S C U S I O N D E R E S U L T A D O S

Los siguientes textos tienen por objeto explicar los resultados obtenidos en el presente estudio así como apoyar los fundamentos de la metodología utilizada.

7.1. METODOLOGIA

7.1.1. Material biológico.

El modelo experimental utilizado fueron las ratas Long Evans debido a los antecedentes experimentales que de esa cepa se tienen en el laboratorio en el cual se realizó el presente estudio, además de su disponibilidad en cuanto a sexo y peso en el bioterio de la Unidad de Investigación Biomédica del I.M.S.S.

7.1.2. Sustancias administradas.

7.1.2.1. Aloxana

Existen básicamente dos sustancias que se emplean para producir diabetes experimental en animales, la estreptozotocina y la aloxana. La primera daña las células más lentamente además de que se han observado efectos tóxicos en otros tejidos particularmente el riñón. Con esta sustancia se ha detectado la ausencia de hiperglucemia en pacientes que la han recibido, lo cual sugiere que las células Beta del hombre son relativamente resistentes, por estas razones se decidió ocupar la aloxana como inductor de diabetes experimental en este trabajo.

La aloxana bloquea la liberación de insulina estimulada por glucosa antes de la destrucción de la célula beta.

En la bibliografía se muestra a la sustancia involucrada como selectiva para la destrucción de células beta pancreáticas (40), sin embargo, este estudio indica que al menos se lleva a cabo un desequilibrio en la función de las células alfa pancreáticas puesto que el control exócrino contemplado en el trabajo (actividad de alfa amilasa) se ve afectado entre el grupo control y el grupo de ratas tratadas con aloxana.

Por otra parte, la dosis elegida de aloxana se estableció en base a pruebas dosis- tiempo de respuesta realizadas previamente, en conjunción con datos obtenidos en la bibliografía, éstos varían en cuanto a la forma de aplicación y la dosis (entre 60-400 mg/ Kg de peso). Se decidió por lo tanto, empezar con la dosis más baja reportada en la bibliografía. Una dosis de 60mg/Kg de peso por vía intravenosa en ratas Long Evans 96 horas después de su administración no produjo cambios significativos ni constantes en la concentración de glucosa en suero sanguíneo. Tal hallazgo originó que la concentración de aloxana probada se aumentara a 120 mg/ Kg de peso por vía intravenosa y se observó que a las 96 horas después de la administración se tenían variaciones en el contenido de glucosa en suero sanguíneo de 120 mg/dl (Control) a 300 mg/dl.

Se debe evaluar la posibilidad de ocupar una concentración mayor de aloxana (200 mg/Kg de peso con el objeto de disminuir los tiempos de prueba).

7.1.2.2. Insulina

La dosis de insulina elegida para lograr la recuperación de los grupos afectados fue de 1.5 U/ 100 g de peso concentraciones similares han sido ocupadas por Departamentos de Farmacología y Nutrición en la Universidad de California para observar el efecto de la insulina sobre la gluconeogénesis y la síntesis de proteínas (38), sin embargo, se encontró que tal dosis pudo haber sido excesiva, esto se enuncia en base a que se tuvieron problemas con un grupo de ratas afectado por aloxana el cual recibió 3 dosis de insulina cada 24 horas y después de la última dosis las ratas cayeron en un choque hipoglucémico que las condujo a la muerte. La aseveración de que la dosis empleada de insulina es alta se debe también a diversos reportes en los que se muestran que el páncreas humano tiene una secreción basal de insulina de 1 U/hora (41,42).

Por otra parte la insulina utilizada fue NPH de 100 unidades, la acción de este tipo de insulina es intermedia, la duración es de 24-28 horas razón por la cual se decidió inyectar cada 24 horas, su rango máximo de acción se encuentra entre las 6-12 horas después de la inyección aunque se ha demostrado que su acción comienza a partir de las 2 horas de inyección.

Cabe señalar que el tipo de insulina utilizada tiene un aporte de protamina, tal efecto se evaluará en la sección correspondiente a la determinación de proteínas.

Es necesario por tanto evaluar la posibilidad de realizar un estudio utilizando una insulina de tipo Regular de

acción rápida cuyo rango máximo de acción se encuentre entre 2-4 horas y cuya concentración sea menor a 100 unidades, este último punto para facilitar el manejo de la dosis. Se sugiere utilizar la insulina CP 280S o CP 240S. En la figura No 18 se muestran las acciones de diversas insulinas

7.1.2.3. Arginina.

La dosis de arginina utilizada, se estableció con base en estudios realizados en la Universidad de Tokushima, Japón(39) donde se aplicó una sobredosis de arginina en ratas Wistar (Mayor a 500 mg/ 100g de peso) y las ratas murieron a las pocas horas después de la inyección. Así pues, ellos reportan que con una dosis de 250 mg/ 100g de peso se tienen daños histológicos en los acinos pancreáticos y no se observan cambios en el páncreas endócrino. Es por esta razón que se decidió ocupar una dosis menor de arginina (100 mcg/ Kg de peso por vía intramuscular).

La administración de arginina por vía oral es mejor que por vía intravenosa, este efecto se debe a la liberación en la mucosa intestinal de una o varias hormonas gastrointestinales que por vía hemática modificarían la secreción de la célula beta; sin embargo, en el presente estudio la administración se realizó por vía intramuscular puesto que se pretendía comparar la acción de la insulina (aplicada por vía intramuscular) con la de la arginina.

Es necesario por tanto, evaluar la posibilidad de efectuar un experimento rediseñando lo siguiente:

- a) La cantidad de arginina suministrada deberá probarse a dosis mayores a la del presente estudio.
- b) La forma de administración de la arginina para con ello tener una respuesta potenciada, se sugiere administración intragástrica o intraperitoneal.

7.1.2.4. Espermidina.

La dosis de espermidina ocupada fue fijada con base a un estudio anterior en el cual se administraba Espermina a una concentración de 1 mg/Kg de peso 6 horas después del daño hepático y se obtuvieron cambios bioquímicos y ultraestructurales indicativos de una posible recuperación hepática. Aunque no es la misma poliamina cabe señalar que la espermidina es precursora de la síntesis de Espermina.

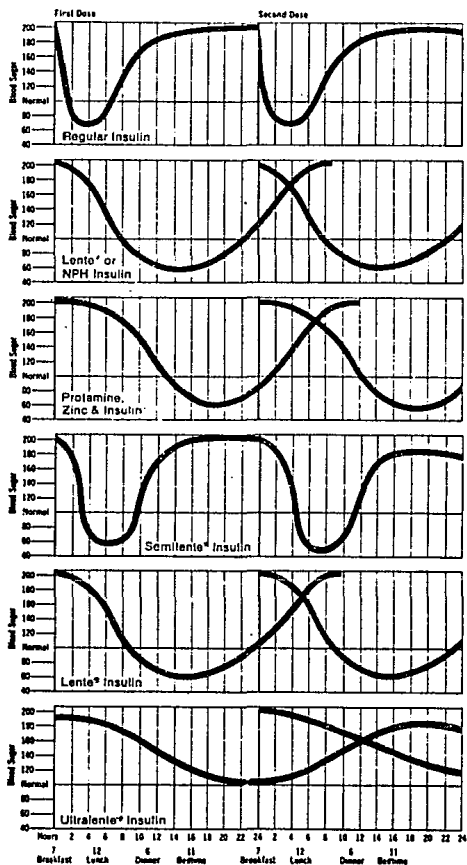


FIGURA 18 : Tipos de insulina

7.2. PARAMETROS ANALIZADOS.

7.2.1. GRUPO DE RATAS TRATADAS CON ALOXANA.

Los resultados obtenidos en todos los parámetros para el grupo de ratas tratadas con aloxana presentan variaciones significativas en relación al grupo de ratas control.

7.2.1.1. Glucosa.

Para glucosa la variación obtenida tiene un incremento de 2.63 veces en relación a las ratas control.

La respuesta de la aloxana es trifásica, inicialmente se produce hiperglucemia, presumiblemente debida a la interferencia en la liberación de insulina en las células Beta, seguida por hipoglucemia marcada probablemente secundaria a la destrucción de las células Beta con liberación de insulina y por hiperglucemia permanente secundaria al daño sobre las células beta. En este experimento 96 hrs. bastaron para llegar a la tercera fase con una dosis de 120 mg/Kg de peso.

La cantidad de glucosa detectada en suero para el grupo de ratas tratadas con aloxana puede ser un indicativo de que éstas se encontraban en cetoacidosis.

Cabe señalar que durante las pruebas dosis respuesta para la aloxana con una concentración de 60 mg/Kg de peso, a las 48 hrs. se llegaba a la segunda fase.

7.2.1.2. Tricilglicéridos.

El nivel de triacilglicéridos para ratas diabéticas se ve incrementado, lo anterior podría parecer contradictorio puesto que en diabetes la síntesis hepática de triacilglicéridos está alterada ya que la lipoprotein lipasa (la principal enzima encargada del metabolismo de las lipoproteínas ricas en triacilglicéridos) depende para su acción de la presencia de insulina. Durante la diabetes el déficit de insulina conduce a una inhibición marcada en la actividad de lipoprotein lipasa.

Así pues el método de detección de triacilglicéridos utilizado en este estudio es indirecto. Se provoca una hidrólisis de los triacilglicéridos que produce glicerol y ácidos grasos. El glicerol formado se involucra en una reacción Redox que produce un cambio de color en los reactivos, por lo que en realidad la cantidad medida es glicerol y efectivamente este parámetro se encuentra elevado en la diabetes (cetoacidosis) al igual que la cantidad de ácidos grasos libres.

7.2.1.3. Alfa amilasa en suero.

Este parámetro enzimático fue determinado en el presente trabajo para evaluar si el daño ocasionado por aloxana era únicamente endócrino.

A pesar de no haber medido un daño histológico, una disminución en la actividad de alfa amilasa como la determinada en este experimento indica un posible desequilibrio en el páncreas exócrino.

Es conveniente mencionar que la alfa amilasa es una enzima

que hidroliza el almidón formando alfa dextrinas, alfa maltosa y alfa glucosa. En ratas diabéticas el contenido de alfa glucosa es alto, por lo que la enzima que cataliza su producción puede disminuir su actividad al tener en exceso el producto que ella forma. Esta es otra razón por la cual la actividad de alfa amilasa disminuyó en ratas diabéticas.

7.2.1.4. Proteínas en suero.

La cantidad de proteínas en suero para el grupo de ratas diabéticas disminuyó con respecto a las ratas control, esto es debido a la inhibición de la síntesis de proteínas provocada por la falta de insulina .

7.2.1.5. Proteínas en homogenizado.

El contenido de proteínas en homogenizado encontrado en ratas diabéticas con respecto a las ratas control es mayor. Lo anterior se debe quizá a la respuesta trifásica producida por la aloxana, en la que la última fase es característica de una destrucción de las células Beta lo que origina que los contenidos citoplasmáticos se viertan al espacio extracelular y el contenido protéico aumente.

7.2.1.6. Arginasa en suero.

La actividad de la enzima en el suero de las ratas diabéticas con respecto a las ratas control se incrementó de manera significativa, esto se debe a que la función del ciclo de la uréa (en donde actúa la arginasa) es la de captar el grupo amino de los aminoácidos para someter anabólicamente a éstos

cuando los niveles de proteínas y aminoácidos son altos como fue detectado en los resultados obtenidos de proteínas en homogenizado para las ratas diabéticas.

Por otra parte, la actividad de arginasa en suero probablemente se aumenta debido a que se pretende restablecer la actividad de arginasa perdida en homogenizado de páncreas.

7.2.1.7. Arginasa en homogenizado.

El daño producido en ratas diabéticas se ve expresado en los resultados obtenidos para arginasa en homogenizado. La actividad de esta enzima se reduce significativamente debido a la destrucción celular ocasionada por la acción de la aloxana.

7.2.2. GRUPO DE RATAS TRATADAS CON INSULINA.

7.2.2.1. Glucosa en suero.

Para el grupo tratado con insulina cada 24 horas los resultados difieren con respecto a los 2 grupos control. Lo anterior se debe a que el tipo de insulina utilizada fue NPH cuya acción es de 24-28 horas por lo que al momento del sacrificio de este primer grupo tratado con insulina la acción de ésta concluía, es por esta razón que el nivel de glucosa detectado se encuentre alto.

Los niveles de glucosa para el segundo y tercer grupo tratados con insulina disminuyeron significativamente con respecto al grupo de ratas diabéticas.

Para el caso del grupo tratado con insulina durante 48 horas y 2 horas antes del sacrificio, los niveles de glucosa

encontrados fueron menores al grupo control e incluso menores al grupo tratado con insulina unicamente 2 horas antes del sacrificio, ésto fue debido a la respuesta acumulada del organismo a la insulina.

7.2.2.2. Triacilglicéridos en suero

La insulina es la principal hormona que promueve el almacenamiento de nutrientes en el tejido adiposo y previene la lipólisis.

La insulina promueve la formación de triacilglicéridos y por lo tanto la disminución en el glicerol. Esto se muestra en los resultados obtenidos para ambos grupos de ratas tratadas con insulina 2 horas antes del sacrificio.

En el caso de las ratas tratadas con insulina cada 24 horas la acción de la insulina parece terminar y por lo tanto se origina un incremento en la lipólisis lo que origina niveles altos de glicerol.

7.2.2.3. Alfa amilasa en suero

Para los tres grupos de ratas tratados con insulina, la actividad de alfa amilasa con respecto a las ratas diabéticas aumentó, ésto se debe a que la insulina aumenta la oxidación de la glucosa .

El grupo de ratas tratado con insulina que presenta la mayor concentración de glucosa en suero, es a su vez el que tiene la mayor actividad de alfa amilasa y el grupo que se presenta menor cantidad de glucosa tiene la menor actividad de alfa amilasa respectivamente.

7.2.2.4. Proteínas en suero.

La cantidad de proteínas en suero se recuperó casi en su totalidad, únicamente en el grupo tratado con insulina 2 horas antes del sacrificio. Esto se debe a la acción del tipo de insulina utilizado y al aporte de nitrógeno que ésta representa (protamina).

Para el caso de las ratas de los otros 2 grupos tratados con insulina el resultado no se igualó con respecto al grupo control probablemente debido a que la dosis no fue suficiente para restablecer el daño causado por la aloxana.

7.2.2.5. Actividad de arginasa en suero y homogenizado.

La actividad de arginasa en suero se incrementó por arriba del grupo control y incluso de las ratas diabéticas para todos los grupos de tratados con insulina. Lo anterior puede deberse a una especie de homeostasis para lograr así el equilibrio entre la falta de actividad de la enzima en páncreas.

Por otra parte, la disminución tan dramática de la actividad de la enzima en homogenizado es debida quizá a la acción de la insulina sobre el ciclo de la urea puesto que se ha comprobado que la insulina disminuye la ureogénesis y con ello la actividad de la enzimas implicadas en este ciclo.

7.2.3. GRUPO DE RATAS TRATADAS CON ARGININA Y ESPERNIDINA.

7.2.3.1. Glucosa en suero.

El nivel de glucosa en suero para las ratas tratadas con arginina no recuperó los valores de las ratas control.

Para el grupo tratado con arginina cada 24 horas se determinó un incremento en la glucosa con respecto incluso al grupo de las ratas diabéticas, lo anterior evidentemente fue debido a la dosis baja de arginina utilizada, a su forma y al tiempo de administración (demasiado tiempo transcurrido entre la última dosis y el sacrificio).

En comparación con este grupo de ratas, el otro grupo tratado con arginina 2 horas antes del sacrificio redujo las concentraciones de glucosa; se sabe que la arginina es el más potente aminoácido que estimula la liberación de insulina, esto debido a que la arginina puede interaccionar con el receptor de membrana, sin embargo, el páncreas de las ratas (sitio donde se produce ésta) se encontraba dañado por la aloxana por lo que la liberación de la insulina sólo se podría dar en las partes no dañadas, el presente resultado por tanto, sugiere que se llevó a cabo una recuperación de las células dañadas gracias a la acción de la arginina que estimuló la síntesis de poliaminas (implicadas en el crecimiento celular).

Otra razón por la cual la concentración de glucosa no disminuyó hasta el valor control a pesar de existir evidente recuperación se debe a que la arginina estimula la síntesis de putrescina, ésta a su vez, puede ser oxidada por diaminooxidasas dando peróxido de hidrógeno como producto secundario. El reactivo utilizado para la determinación de glucosa es sensible al peróxido de hidrógeno, por lo que el resultado obtenido puede ser una suma de la concentración de glucosa y la de peróxido de

hidrógeno en suero.

Así pues, cuando se administró espermidina los resultados fueron similares a los obtenidos con las ratas tratadas con arginina, cabe señalar que las poliaminas además de estar relacionadas con la proliferación y crecimiento celular tienen acciones parecidas a la insulina como por ejemplo

- Suprimen la síntesis de AMPc al igual que la insulina.*
- Estimulación de la síntesis de proteínas*

Por otra parte, se encuentra firmemente establecido que la omisión de Calcio extracelular anula la secreción de insulina mediada por glucosa y otros agentes insulínotropos in vitro. Así, el proceso de liberación de insulina desde las células beta, requiere la presencia de calcio extracelular puesto que éste es responsable de la actividad de transglutamilasas. Las poliaminas estimulan la liberación de insulina porque actúan como sustatos de las transglutamilasas.

Otra razón por la cual el transporte de glucosa aumenta en el grupo de ratas tratadas con espermidina es debido a que ésta interactuó con un receptor de membrana.

Por otra parte, la espermidina y arginina tienen estructura similar a las sulfoniluræas que son utilizadas como hipoglucemiantes orales.

7.2.3.2. Triacilglicéridos en suero.

Para el grupo de ratas tratadas con la concentración mayor

de espermidina los triacilglicéridos disminuyeron con respecto al grupo diabético llegando a tener valores similares al grupo control.

Lo anterior se puede deber a que las poliaminas inhiben la lipólisis al igual que la insulina. Se cree que la inhibición de la lipólisis se deba a la supresión en los niveles de AMPc (Se ha inducido la lipólisis con 2 homonas y ésta fue inhibida por espermidina pero cuando se administró dibutiril AMPc no fue inhibida).

7.2.3.3. Alfa amilasa en suero.

Para los grupos tratados con espermidina la recuperación de la actividad de alfa amilasa fue evidente; lo anterior puede deberse a 2 razones:

La primera involucra una probable regeneración de los acinos pancreáticos.

La segunda, indica que la actividad de alfa amilasa dependiente de iones Calcio, aumentó debido a la acción de la espermidina que como ya se había discutido anteriormente tiene características de catión divalente .

En el grupo tratado con arginina cada 24 horas la recuperación es menos evidente, esto quizá por la dosis baja de esta sustancia y la forma de administración. Para el otro grupo tratado con arginina la recuperación es casi al 100% lo que indica que esta sustancia no sólo ejerce un efecto sobre el páncreas endócrino sino también sobre la parte exócrina.

7.2.3.4. Proteínas en Suero y Homogenizado.

Los resultados de proteínas en suero no revelan cambios

significativos para los grupos tratados con arginina ni espermidina.

Por el contrario, las determinaciones de proteínas en homogenizado si sufieron cambios importantes; Para los grupos tratados con espermidina la concentración de proteínas en homogenizado igualó al grupo control. Esto se debe a que las poliaminas son parte importante en la síntesis de proteínas y división celular.

La recuperación de la concentración de proteínas en las ratas tratadas con arginina solo se da en el grupo al cual se le administró este aminoácido dos horas antes del sacrificio .

7.2.3.5. Actividad de arginasa en suero y homogenizado.

La actividad de arginasa en suero aumento con respecto al grupo control para los grupos tratados con arginina. esto es debido a la activación de esta enzima por su sustrato.

Por otra parte, la actividad de esta enzima en homogenizado se igualó con respecto al control para el grupo tratado con espermidina dos horas antes del sacrificio.

La actividad de la enzima en homogenizado no se recuperó para ningún grupo, sin embargo las ratas tratadas con la mayor cantidad de espermidina disminuyeron en gran cantidad su actividad esto se debe a la inhibición de la enzima por su producto.

V I I I

C O N C L U S I O N E S

En general, los parámetros bioquímicos de triacilglicéridos, alfa amilasa, actividad de arginasa sérica y proteínas en homogenizado se igualaron entre las ratas control y las ratas tratadas con espermidina (5mg/Kg).

La activación del metabolismo de poliaminas es importante en la iniciación del crecimiento celular de los islotes de Langerhans.

La arginina y espermidina estimulan la liberación de insulina en el páncreas endócrino, esto puede deberse a tres mecanismos:

- a) Regeneración de células Beta.
- b) Acción de arginina y espermidina parecida al calcio.
- c) Interacción con el receptor de membrana para insulina.

La espermidina tiene acción parecida a la insulina en cuanto a que inhibe la lipólisis y estimula el transporte de glucosa al facilitarlo a través de la membrana celular.

La espermidina puede tener un papel de segundo mensajero intracelular.

I X

A P E N D I C E

9.1. TECNICAS.

9.1.1. DETERMINACION DE GLUCOSA EN SUERO SANGUINEO.

Test-Combinación. Glucosa GOD-POD. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania Occidental

9.1.1.1. Fundamento de la prueba.

El peróxido de hidrógeno producido por la oxidación enzimática de glucosa reacciona en presencia de peroxido reductasa (POD) con 4 aminofenazona y el fenol por copulación oxidante se forma 4 (-p-benzoquinona-monoimino)-fenazona + agua. La cantidad de cromógeno formado es proporcional a la concentración de glucosa.

9.1.1.2. Contenido del Reactivo:

Cuando el reactivo es reconstituido de acuerdo con las instrucciones, las concentraciones aproximadas de los ingredientes son:

Amortiguador de fosfato	100mmol/l, pH 7.0
Oxígeno 1-oxidorreductasa (GOD)	8 U/ml.
Peróxido reductasa (PAP)	1.1 U/ml.
4- aminofenazona	0.77mmol/l.
Fenol	11mmol/l.

9.1.1.3. Preparación del reactivo.

Disolver el contenido del frasco que contiene el amortiguador con enzimas con 500 ml ó 1000ml de agua destilada según sea el caso y añadir 10 ó 20 ml del frasco que contiene fenol. Dar vueltas suavemente. No agitar.

9.1.1.4. Almacenamiento del reactivo.

El reactivo no reconstituido debe ser almacenado entre +2 a 8°C y puede ser usado hasta la fecha de expiración indicada en la etiqueta.

El reactivo reconstituido se mantiene estable por 4 semanas a +4°C y 5 días entre 15-25°C en frasco color ámbar.

9.1.1.5. Recolección y almacenamiento de las muestras.

La glucosa se reporta como estable por 24 horas a 25°C; o por siete días a 4°C si se añade un inhibidor de la glicólisis (NaF, KF). Este reactivo es útil en la determinación de glucosa en suero o plasma de pacientes en ayunas, para lo que se recomienda separar los componentes celulares inmediatamente.

9.1.1.6. Material requerido.

Equipo de Reactivo para Glucosa.

Estándar de glucosa de 1mg/ml en solución salina 0.9%

Pipetas de precisión.

Tubos de ensayo.

Celdillas para colorímetro.

Agua destilada o deionizada.

9.1.1.7. Procedimiento.

Longitud de onda: 530 nm.

Temperatura de incubación: 37°C

Temperatura de medición: 25°C

Tiempo de reacción : 10 min.

- a) Llevar el colorímetro a cero con agua destilada.
- b) Colocar en los tubos de reacción 20 mcl de problema, estándar y agua destilada.
- c) Agregar 2 mcl del reactivo a los tubos, mezclar e incubar por 10 min. a 37°C en la oscuridad.

	BLANCO	ESTANDAR	PROBLEMA
AGUA	0.01ml	-	-
ESTANDAR	-	0.01ml	-
PROBLEMA	-	-	0.01ml
REACTIVO	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

- d) Medir el color final en un lapso no mayor de 10 min posteriores a la incubación, frente al blanco del reactivo.

9.1.1.8. Cálculos.

La concentración de glucosa se calcula como sigue:

$$[\text{glucosa}] = 100 \times \frac{\text{Absorbancia problema} - \text{blanco}}{\text{Absorbancia estándar} - \text{blanco}} \quad [\text{mg/dl}]$$

9.1.1.9. Precauciones.

El reactivo no reconstituido de enzimas, contiene azida de sodio como conservador. Se debe evitar por tanto el contacto

con la piel y mucosas. La ingestión de grandes dosis puede provocar vasodilatación.

El reactivo que contiene fenol, es venenoso si está en contacto con la piel o es ingerido. Causa cauterización. En caso de contacto con la piel lavar con polietilenglicol 400.

9.1.2. DETERMINACION DE TRIACILGLICERIDOS EN SUERO SANGUINEO.

Reactivo Triacilglicéridos Color . (Gilford Systems, 132 Artino Street, Oberlin, Ohio, U.S.A.)

9.1.2.1. Fundamento.

El glicerol producido por la hidrólisis enzimática de triacilglicéridos es fosforilado por adenosininitrofosfatasa (ATP) para producir 1-glicerofosfato y ADP en la reacción catalizada por gliceroquinasa (GK). La glicerofosfato-deshidrogenasa (G-1-PDH) cataliza la oxidación de 1-glicero fosfato en presencia de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD+) para producir NADH que es usado para reducir la anilina de cloruro de 2-tetrazolio (iodofenil-p)-3-(nitrofenil-p)-5-fenil (INT) a formazán en la reacción catalizada por diaforasa. El formazán absorbe la luz a 530 nm. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glicerol y por tanto, a la concentración de triacilglicéridos.

9.1.2.2. Contenido del Reactivo.

Cuando el reactivo es reconstituido de acuerdo con las instrucciones , las concentraciones aproximadas de los ingredientes del reactivo son las siguientes:

ATP	1.0mmol/l.
NAD	1.2mmol/l.
INT	1.0mmol/l.
GK (microbiana)	120 U/l.
G-1-PDH (músc. conejo)	3500 U/l.
Diaforasa	450 U/l.
Lipasa (microbiana)	1X10 ⁻⁵ U/l.
Amortiguador (pH 7.7)	

9.1.2.3. Preparación del Reactivo.

Reconstituir los frascos del reactivo para Triacilglicéridos (Color) 6.5, 15.5 ó 50 con 6.5ml, 15.5ml ó 50ml de agua destilada o deionizada respectivamente. Dar vueltas ligeramente para disolver. No agitar.

9.1.2.4. Almacenamiento del Reactivo.

El reactivo no reconstituido debe ser almacenado entre 2-8°C y puede ser usado hasta la fecha de expiración indicada en la etiqueta.

El reactivo reconstituido se mantiene estable por 8 horas a temperatura ambiente (18-25°C) o por 5 días refrigerado (2-8°C) cuando está protegido contra la luz.

9.1.2.5. Recolección y almacenamiento de muestras.

Puede usarse suero o plasma recogido de pacientes en ayunas. Los anticoagulantes tales como EDTA, oxalato o heparina no causan inhibición.

Una hemólisis moderada no afecta significativamente los resultados obtenidos con esta prueba.

No debe usarse citrato de sodio.

Para la obtención de las muestras deben usarse tubos y tapas libres de glicerol.

Los triacilglicéridos se reportan como estables por 3 días a temperatura ambiente. Sin embargo se recomienda almacenamiento refrigerado o congelado de las muestras.

9.1.3. DETERMINACION DE UREA. (37)

9.1.3.1. Fundamento de la prueba.

Para medir el contenido de uréa se utiliza una modificación del método propuesto por Geyer y Dabich.

La uréa forma en solución Ácida de diacetil monoxima en presencia de tiosemicarbazida un complejo colorido que se mide fotométricamente .

9.1.3.2. Contenido.

Reactivo colorido. Extracto acuoso de una solución que contiene 2.4 mM de tiosemicarbazida y 41.1 mM de 2-3 lutanodien monoxima.

Reactivo Ácido. (Se prepara al momento de utilizar).

0.1 ml de cloruro férrico 0.12 M en Ácido fosfórico al 56.7 % , Esta alícuota se lleva a un volumen de 100 ml con Ácido sulfúrico al 20%.

9.1.3.3. Procedimiento.

Longitud de onda: 530nm.

Temperatura de reacción: 92°C

Tiempo de reacción: 25 min.

Temperatura de medición: 25°C.

- a) Llevar el colorímetro a cero con agua destilada.
- b) Colocar en los tubos de reacción 0.2 ml de la muestra problema (previamente tratada), ya sea suero u homogenizado.
- c) Agregar 0.8 ml de agua, 1 ml de monoxima con tiosemicarbazida y 2 ml del reactivo de tricloruro férrico en Ácido sulfúrico.

d) Colocar la mezcla de reacción a 95°C durante 25 minutos.

e) Una vez enfriados los tubos, proceder a leer el % de absorbancia a 530 nm.

f) Al mismo tiempo preparar una curva estándar con urea como sigue:

	mcg UREA	AGUA (ml)	HONOXIMA TIOSEMICARBAZIDA (ml)	CLORURO Fe (ml)
BLANCO	0	1	1	2
1	1.5	0.9	1	2
2	3.0	0.8	1	2
3	4.5	0.7	1	2
4	6.0	0.6	1	2
5	7.5	0.5	1	2

9.1.4. DETERMINACION DE PROTEINAS.

9.1.4.1. Contenido.

- a) *Amortiguador : Carbonato de sodio al 2% , tartrato doble de sodio y potasio 0.02% , en hidróxido de sodio 0.1 N.*
- b) *Solución de sulfato de cobre pentahidratado al 0.5% en agua destilada.*
- c) *Reactivo de Folin-Ciocalteus en agua (1.1 / 1.4).*
- d) *Estándar de albúmina bovina (0.2 mg/ml).*
- e) *Mezcla cuproalcalina (50 volúmenes de la solución amortiguadora con un volumen de la solución de sulfato de cobre pentahidratado). Esta mezcla se deberá preparar al momento de usarse.*

9.1.4.2. Procedimiento.

Longitud de onda: 530nm.

Tiempo de reacción: 30 min.

Temperatura de medición: 20°C.

- a) *Llevar el colorímetro a cero con agua destilada.*
- b) *Colocar en los tubos de reacción 0.2 ml del homogenizado (previamente tratado), o 10 mcl de suero previamente diluido.*
- c) *Completar a 0.5 ml con agua destilada. Agregar 2 ml de la mezcla cuproalcalina , dejar reposar 10 min. y despues agregar 0.2 ml del reactivo diluido de Folin-Ciocalteus.*
- d) *Dejar reposar 20 min.*
- e) *Proceder a leer el % de absorbancia a 530 nm.*

f) Al mismo tiempo preparar una curva estándar con albumina bovina como sigue:

	mcg ALBUMINA	AGUA (ml)	MEZCLA CUPROALCALINA (ml)	REACTIVO FOLIN (ml)
BLANCO	0	0.5	2	0.2
1	20.0	0.4	2	0.2
2	40.0	0.3	2	0.2
3	60.0	0.2	2	0.2
4	80.0	0.1	2	0.2
5	100.0	0.0	2	0.2

9.1.5. DETERMINACION DE PESO SECO.

9.1.5.1. Contenido.

a) 1 g de dicromato de potasio en 50 ml. de Acido sulfúrico concentrado. Calentar a 70°C para disolución. Esta solución se debe preparar al momento de usarse.

b) Estandar de manitol (2 mg/ml).

9.1.5.2. Procedimiento.

Longitud de onda: 660nm.

Tiempo de reacción: 20 min.

Temperatura de reacción: 92°C.

Temperatura de medición: 20°C.

a) Llevar el colorímetro a cero con agua destilada.

b) Colocar en los tubos de reacción 0.1 ml del homogenizado.

c) Completar a 1.0 ml con agua destilada. Agregar 2 ml de la solución oxidante.

d) Hervir durante 20 min.

e) Proceder a leer el % de absorbancia a 660 nm.

f) Al mismo tiempo preparar una curva estándar con manitol como sigue:

	mcg MANITOL (ml)	AGUA (ml) (ml)	SOLUCION OXIDANTE
BLANCO	0	1.0	2
1	400	0.8	2
2	800	0.6	2
3	1200	0.4	2
4	1600	0.2	2
5	2000	0.0	2

B I B L I O G R A F I A

- (1) Pegg, A.E. and Mc Cann, P.P.: "Polyamine metabolism and function". *Am. J. Physiol.* 243:212, 1982.
- (2) Hougaard H., Nielsen, H. and Larsson, L: "Localization and biosynthesis of polyamines in insulin producing cells". *Biochem J.* 238:46, 1986.
- (3) Cochet, C. and Chambaz, E.M.: *Mol Cell. Endocrinol* 30:247-266, 1983.
- (4) Cohen, S.S.: *Nature (London)* 274,209-210, 1978.
- (5) Lockwood, D.M., Lipsky, J.J. Meruk, F. and East, L.E.: "Actions of polyamines on lipid and glucose metabolism on fat cells". *Biochim. Biophys. Res. Com.* 44(3):600-607, 1971.
- (6) Welsh, N., and Sjöholm, A: "Polyamines and insulin production in isolate mouse pancreatic islets". *Biochem, J.* 252:701-707, 1988.
- (7) Gomis, R., Sener A. Malaisse-lagae, F. and Malaisse, W. J. "Transglutamylase Activity in pancreatic islets". *Biochim Biophys Acta* 760:384-388, 1983.
- (8) Hannonen, P., Raina A. and Janne, J.: " Polyamine synthesis in the regenerating rat liver: stimulation of S-adenosylmethionine decarboxylase and spermidine and spermine synthases after partial hepatectomy". *Biochem, Acta.* 273:84, 1972.

- (9) *Rusell, D.H. and Shyder, S.H.: "Amine synthesis in regeneration rat liver: Extremely rapid turnover of ornithine ornithine decarboxylase". Mol. Pharmacol, 5:253, 1969.*
- (10) *Genedami, S., Piccinhi, G. and Bertoli, I.A.: "Putrescine has analgesic activity in rats". Ufe sci. 34:2407, 1984.*
- (11) *Elgavish, A., Wallace, R. W. Pillion, D.J. Meezan, E.: "Polyamines stimulate D-glucose transport in isolated Renal Brush border Membrane vesicles". Biochim Biophys. Acta. 777:1-8, 1984.*
- (12) *Johnson, W.T., Nordlie R.: "Stimulation glucose 6 phosphatase by polyamines is a membrane event". Life Sci. 26(4): 297-307, 1980.*
- (13) *Douds, P.A., Dunham, J., Bitensky, L. and Chayen J.: "Putrescine may be a natural stimulation of Glucose-6-phosphate dehydrogenase". FEBS letters 201(1):105-108, 1986.*
- (14) *Lambert, A.E.: "The regulation of insulin secretion". Rev. Physiol Biochem Pharmacol. 15:98-1976.*
- (15) *Tabor, W.C. and Tabor H.: "Polyamines". Ann Rev. Biochem. 33:749, 1984.*
- (16) *Orci, L. Ravazzola, M. Madsen, O. and Perrelet, A.: "Direct identification of prohormone conversion site insulin secreting cells". Cell. 42(2):671-681, 1985.*
- (17) *Morrisset, J. and Benrezzac, O.: "Polyamines and pancreatic growth induced by caerulein". Life sci*

35(24):2471-2480, 1984.

- (18) Stetan, Y. Grasso, A. Perrelet A. and Orci L.: "A quantitative immunofluorescent study of endocrine cell populations in the developing human pancreas". *Diabetes* 33:293-301, 1983.
- (19) Steiner, D. Rauder, U. and Williams R.: "Severe ketoacidosis in the alloxan diabetes rat". *Endocrinol* 68. 809, 1961.
- (20) Lacy, P.: "Beta cells secretion-from the stand point of a pathobiologist". *Diabetes* 19: 895, 1970.
- (21) Matschinsky, F.M., Landgraf, R.: "Glucoreceptor mechanisms in islets of Langerhans". *Diabetes* 21:555, 1972.
- (22) Orci, L.: "Macro and Micro-domains in the Endocrine Pancreas". *Diabetes*; 31(6):538-565, 1982.
- (23) Orci, L., Ravazzola M. and Perrelet A.: "Proinsulin Associates with Golgi membranes of Pancreatic B cells". *Proceeding of the National Academy Sciences of the United States of America*, 81(21) 6743-6746, 1984.
- (24) Butler, W.H.: "3. Experimental liver injury" In: Macsween R.N.M., Anthony, P.P. and Schew, P.J. *Pathology of the liver*. Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York, 1979:55.
- (25) Gonzalez Angulo A. Vilar Rojas C., Medina R. y Hicks, J.J.: "Efecto citoprotector de enprostil sobre la mucosa gástrica dañada con etanol en rata". *Rev. Gastroenterol, Méx.* 52:147, 1987.

- (26) Elgee, N.J., Williams, R.M., y Col.: "Distribution and degradation studies with insulin-1 (131)". *J. Clin Invest* 33:1252, 1954.
- (27) Kung, J.J., Brooks, S. B (33), Jakway J.P. : "Suppression of in vitro cytotoxic response by macrophages due to induced arginase". *J. Exp. Med.* 146:665-671, 1977.
- (28) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. Farr, A.L. and Randall R.J.: "Protein measurement with the folin-Phenol reagent". *J. Biol. Chem.* 193:265, 1951.
- (29) Bernal, A. Mèndez, J.D. y Rosado, A.: "Determinación rápida de peso seco por colorimetría". *Arch. Invest. Med. (Mèx.)* 12:83, 1981.
- (30) Bachrach, U.: "Functions of naturally occurring polyamines". *Acad Press New York*, 1973.
- (31) Mèndez, J.D., Yañez, R., Wong C. y Hicks J.J.: "Uterine arginase inhibition affect the rat embrionic development". *Contraception.* 33(6):597, 1986.
- (32) Mèndez, J.D. y Hicks, J.J.: "Metabolismo y función de las poliaminas en las células vegetales". *Rev. Soc. Quim. Mèx.* 27(4):169, 1983.
- (33) Pearse, A.G.E. and Taker, J.J.: "Embryology of the diffuse neuroendocrine system and its relationship to the common peptides". *Fd. Proc.* 38:2288, 1979.
- (34) Sanger, F.: "Chemistry of insulin". *Science*, 129:1340, 1959.
- (35) Steiner D.F.: "Insulin today". *Diabetes* 26:322, 1977.

- (36) Floyd, J.C.: "Stimulation of insulin secretion by aminoacids". *J. Clin Invest.* 45:1487, 1966.
- (37) Gewer, J.W., D. Dabich.: "Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates". *Anal. Biochem.* 39:412, 1971.
- (38) Mohan and Bessman, S.: "Insulin inhibition of Glucogenesis by stimulation of protein synthesis". *Biochem. Med.* 26:403-426, 1981.
- (39) Mizunuma, T., Kawanura, S and Kishino: "Effects of injecting excess Arginine on rat Pancreas". *J. Nutric* 114:467-471, 1984.
- (40) Rerup, C.C.: "Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells", *Pharmacol Rev.* 22:485, 1971.
- (41) Turner, R.C. Grayburn, J.A.: "Measurement of insulin delivery rate in man". *J. Clin. Endocrinol.* 33:279, 1971.
- (42) Genuth, S.M.: "Metabolic, clearance of insulin in man". *Diabetes* 21:1003, 1972.
- (43) Pyke, D. A.: "Glucose tolerance and Serum Insulin identical twins of diabetics", *Br. Med. J.* 4:649, 1970.
- (44) Thoms, P., Capito, K. and Hedekov, C. : "An inhibitory role for polyamines in protein kinase C activation and insulin secretion in mouse pancreatic islets". *Biochem. J.* 237: 131-138, 1986.
- (45) Orcl, L. : " The subcellular organization of the Beta-cell in relation to insulin biosynthesis and release."

- Diabetes*. 31: 539-565, 1982.
- (46) Kaihoh, T., Masuda, T.: "The size and number of Langerhans islets correlate with their endocrine function: A morphometry on immunostained serial section of adult human pancreases". *Tohoku. J. Exp. Med.* 149:1-10, 1986.
- (47) Dixit, P.: "Rat pancreatic B-cells in protein deficiency: A study involving morphometric analysis and alloxan effect". *J. Nutr.* 115:375-381, 1985.
- (48) Thomas, A., Diggle, T. and Denton, R.: "Sensitivity of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase to magnesium ions". *Biochem. J.* 238:83-91, 1986.
- (49) Folk, E., Park, H.: "Polyamines as Physiological substrates for Transglutaminases". *J. Biol. Chem.* 255 (8): 3695-3700, 1980.
- (50) Dodds, R.A., Dunham, J. : "Putrescine may be a natural simulator of glucose-6-phosphate dehydrogenase". *FEBS* 201 (1):105-108, 1986.
- (51) Johnson, W., Nordlie, R.: " Stimulation of glucose-6-phosphatase by polyamines is a membrane-mediated event". *Life Sci.* 26: 297-302, 1979.