

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR II

FOSFATIDILINOSITOLES Y GLICOSIL-FOSFATIDILINOSITOLES EN
EL ISLOTE DE LANGERHANS

Almudena Morales Somolinos


Madrid, abril de 1993

Dña. ISABEL VALVERDE ALONSO, Jefe del Servicio de Metabolismo, Nutrición y Hormonas de la Fundación Jiménez Díaz,

CERTIFICA:

Que el trabajo "Fosfatidilinositoles y glicosil-fosfatidilinositoles en el islote de Langerhans" ha sido realizado por Dña. Almudena Morales Somolinos bajo mi dirección, y que reúne las condiciones exigidas para optar al título de Doctor en Farmacia.

En Madrid, 12 de abril de 1993.



Dra. I. Valverde Alonso

*Feliz el hombre que puede buscar
la causa de las cosas...{Virgilio
(70-19 a.C.): Publius Vergilius Maro,
I. l. 490}*

*A mis padres y, muy
especialmente,...*

a Miguel

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Isabel Valverde Alonso su dedicación y esfuerzo en mi formación, y su fundamental dirección en la realización de este trabajo. Así mismo, agradezco a la Dra. María Luisa Villanueva-Peñacarrillo, su inestimable ayuda en la presentación del texto.

A la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz, agradezco la asignación de una beca de tres años, sin la cual mi dedicación a la realización de este trabajo no hubiera sido posible.

A mis compañeros Javier Cámara y Almudena Perea, quiero agradecer su colaboración en la realización de algunos de los experimentos. A la Dra. Cristina Horcajada y a todo el personal del Departamento, agradezco su interés y apoyo.

Por último, pero no por ello menos importante, estoy muy agradecida a todos mis compañeros de laboratorio por la comprensión, ayuda y, sobre todo, amistad que me han brindado durante los tres años.

No puedo olvidarme de mis padres, María y Ciriaco, que depositaron su confianza en mí desde el principio, y que con su esfuerzo y apoyo han contribuido decisivamente en mi formación a lo largo de la vida.

INDICE

1.- INTRODUCCION	001
1.1.- FOSFATIDILINOSITOLES	001
1.1.1.- Ciclo	002
1.1.2.- Estructuras	002
1.1.3.- Acción de la fosfolipasa c sobre los fosfatidilinositoleles	004
1.1.4.- Acción del litio sobre el metabolismo de los fosfatidilinositoleles	006
1.1.5.- Implicación de los fosfatidilinositoleles en la transducción de señales intracelulares: segundos mensajeros	007
1.1.5.1.- Características del receptor de fosfatidilinositoleles	008
1.1.5.2.- Movilización del calcio intracelular: inositol 1,4,5-trifosfato	009
1.1.5.2.1.- Receptor para el inositol 1,4,5-trifosfato	010
1.1.5.2.2.- Especificidad de los substratos	011
1.1.5.3.- Activación de la proteína quinasa: diacilglicerol	012
1.2.- MECANISMO DE SECRECIÓN DE LA INSULINA POR LA GLUCOSA	012
1.3.- METABOLISMO DE LOS FOSFATIDILINOSITOLELES EN EL ISLOTE DE LANGERHANS, Y SU RELACION CON LA SECRECIÓN DE INSULINA.....	015
1.4.- POSIBLE MEDIADOR DE LA ACCIÓN DE LA INSULINA: IPG	021
2.- OBJETIVOS	026
3.1.- MATERIALES	027
3.1.1.- MATERIAL BIOLÓGICO	027
3.1.2.- REACTIVOS	027
3.1.2.1.- Aislamiento de islotes pancreáticos	027

3.1.2.2.- Extracción del contenido lipídico	027
3.1.2.3.- Separación de fases	027
3.1.2.4.- Cromatografía en capa fina (TLC)	027
3.1.2.5.- Cromatografía líquida de alta resolución	027
3.1.2.6.- Autorradiografía	028
3.1.3.- OTROS REACTIVOS	028
3.1.4.- PRODUCTOS RADIATIVOS	029
3.2.- METODOS	030
3.2.1.- ISLOTES PANCREATICOS DE RATA	030
3.2.2.- MARCAJE DEL ISLOTE PANCREATICO CON MIO-[³ H] INOSITOL	030
3.2.3.- EXTRACCION DE LIPIDOS	030
3.2.4.- SEPARACION DE LOS FOSFATIDILINOSITOLES POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC)	031
3.2.5.- AUTORRADIOGRAFIA	031
3.2.6.- CUANTIFICACION DE LOS FOSFATIDILINOSITOLES	032
3.2.7.- SEPARACION DE LOS INOSITOLES FOSFATO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)	032
3.2.8.- MARCAJE DE LOS GLICOSIL-FOSFATIDILINOSITOLES	032
3.2.9.- DETERMINACION DE GLICOSIL-FOSFATIDILINOSITOLES Y SU SEPARACION POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC)	033
4.- RESULTADOS	034
4.1.- ADSORCION DE LOS FOSFATIDILINOSITOLES A DIFERENTES MATERIALES DE TRABAJO	034
4.2.- EXTRACCION DE LOS COMPONENTES DEL CICLO DE LOS FOSFATIDILINOSITOLES: RECUPERACION DE LOS FOSFATIDILINOSITOLES E INOSITOLES FOSFATO	036
4.3.- SEPARACION DE LOS FOSFATIDILINOSITOLES POR FASE MOVIL	038
4.4.- EXTRACCION Y CUANTIFICACION DE LOS FOSFATIDILINOSITOLES: TLCs	041

4.5.- VISUALIZACION DE LOS ^3H -FOSFATIDILINOSITOLES POR AUTORRADIOGRAFIA	044
4.6.- RECUPERACION DE LOS ^3H -FOSFATIDILINOSITOLES DE LAS TLCs	046
4.7.- AISLAMIENTO DE LOS INOSITOLES FOSFATO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION	048
4.8.- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DEL $^3\text{H-IP}_3$	048
4.9.- ESTUDIO DE ESTABILIDAD Y RECUPERACION DEL $^3\text{H-IP}_3$, EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE ISLOTES	052
4.10.- EFECTO DE LA GLUCOSA SOBRE EL METABOLISMO DE LOS FOSFATIDILINOSITOLES	054
4.10.1.- Contenido basal de ^3H -fosfatidilinositole en el islote de Langerhans	055
4.10.2.- Contenido basal de ^3H -inositole fosfato en el islote de Langerhans	055
4.10.3.- Efecto de la glucosa sobre los ^3H -fosfatidil- inositole en el islote de Langerhans	055
4.10.4.- Efecto de la glucosa sobre los ^3H -inositole fosfato en el islote de Langerhans	060
4.11.- EFECTO DEL CALCIO SOBRE EL CICLO DE LOS FOSFATIDILINOSITOLE EN EL ISLOTE DE LANGERHANS	064
4.12.- EFECTO DE LA GLUTAMINA-LEUCINA	068
4.12.1.- Efecto de la glutamina-leucina sobre el metabolismo de los fosfatidilinositole, en el islote de Langerhans	069
4.12.2.- Efecto de la glutamina-leucina sobre la formación de inositole fosfato en el islote de Langerhans	072
4.12.3.- Valores de los inositole fosfato tritiados ($^3\text{H-IP}_3$) liberados en presencia y ausencia de glutamina-leucina, en el islote de Langerhans marcado con mio- ^3H inositol	075
4.12.4.- Porcentajes de los fosfatidilinositole e inositole fosfato, tras incubación con glutamina-leucina, en el islote de Langerhans	077
4.13.- PRESENCIA DE GPIs EN EL ISLOTE DE LANGERHANS Y SU MODULACION POR INSULINA E IGF-1	079

4.13.1.- Presencia de dos GPIs en el islote de Langerhans..	080
4.13.2.- Efecto de la insulina	082
4.13.3.- Efecto del IGF-1	082
4.13.4.- Efecto de la glucosa, sobre la formación de GPIs .	082
5.- DISCUSION	087
6.- CONCLUSIONES	094
7.- BIBLIOGRAFIA	096
8.- ABREVIATURAS	105

1.- INTRODUCCION

1.1.- FOSFATIDILINOSITOLES

El primer trabajo que demostró que las hormonas tienen efectos en el metabolismo de los fosfatidilinositales, fue hecho por Hokin y Hokin (1); estos autores vieron que un gran número de agonistas diferentes podían inducir un aumento en el metabolismo de los fosfatidilinositales de membrana. Estos agonistas incluyen neurotransmisores clásicos como acetilcolina, noradrenalina, histamina, y también moléculas más complejas como los péptidos vasopresina, sustancia P, angiotensina, hormona liberadora de tirotrópina, factor de crecimiento plaquetario y factor de crecimiento epidérmico. En casos donde la farmacología está bien establecida, los cambios en el metabolismo de los fosfatidilinositales son siempre específicos para una clase particular de receptor (2), como son el colinérgico muscarínico, el α_1 adrenérgico, el H_1 histaminérgico o el V_1 de la vasopresina. Una característica destacada de estos receptores es que son multifuncionales en naturaleza, ya que se encuentran implicados en una parte del mecanismo de transducción general para la movilización del calcio, la activación de la proteína quinasa C, la liberación del ácido araquidónico y la activación de la guanilato ciclasa. Para generar esta batería de moléculas señales, estos receptores emplean un mecanismo de transducción basado en la hidrólisis de un fosfatidilinositol de membrana

específico.

1.1.1.- CICLO (Figura 1)

1.1.2.- ESTRUCTURAS

El término fosfatidilinositol ha sido utilizado para describir los tres fosfolípidos aniónicos que contienen mio-inositol en sus cabezas de grupo (2). La forma más abundante es el fosfatidilinositol (PI) que contiene mio-inositol unido a través del hidroxilo de la posición 1. Los otros dos compuestos están formados por la fosforilación secuencial de los grupos hidroxilo de las posiciones 4 y 5 del fosfatidilinositol (3). Las membranas tienen una fosfatidilinositol quinasa, que fosforila específicamente el hidroxilo de la posición 4 para dar el fosfatidilinositol 4-monofosfato (PIP), y una quinasa que fosforila la posición 5 del hidroxilo para dar el fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP₂). La conversión del fosfatidilinositol (PI) a estos dos polifosfatidilinositales (PIP, PIP₂) puede revertir por la acción de dos fosfomonoesterasas, que quitan específicamente los fosfatos de las posiciones 4 y 5. Los fosfatidilinositales constituyen el 2-8 % de los lípidos de la membrana celular en células eucariotas, y son fundamentales para la supervivencia de la célula. En la mayoría de las células, los polifosfatidilinositales representan el 10-20 % de los lípidos que contienen mio-inositol. El fosfatidilinositol 4,5-

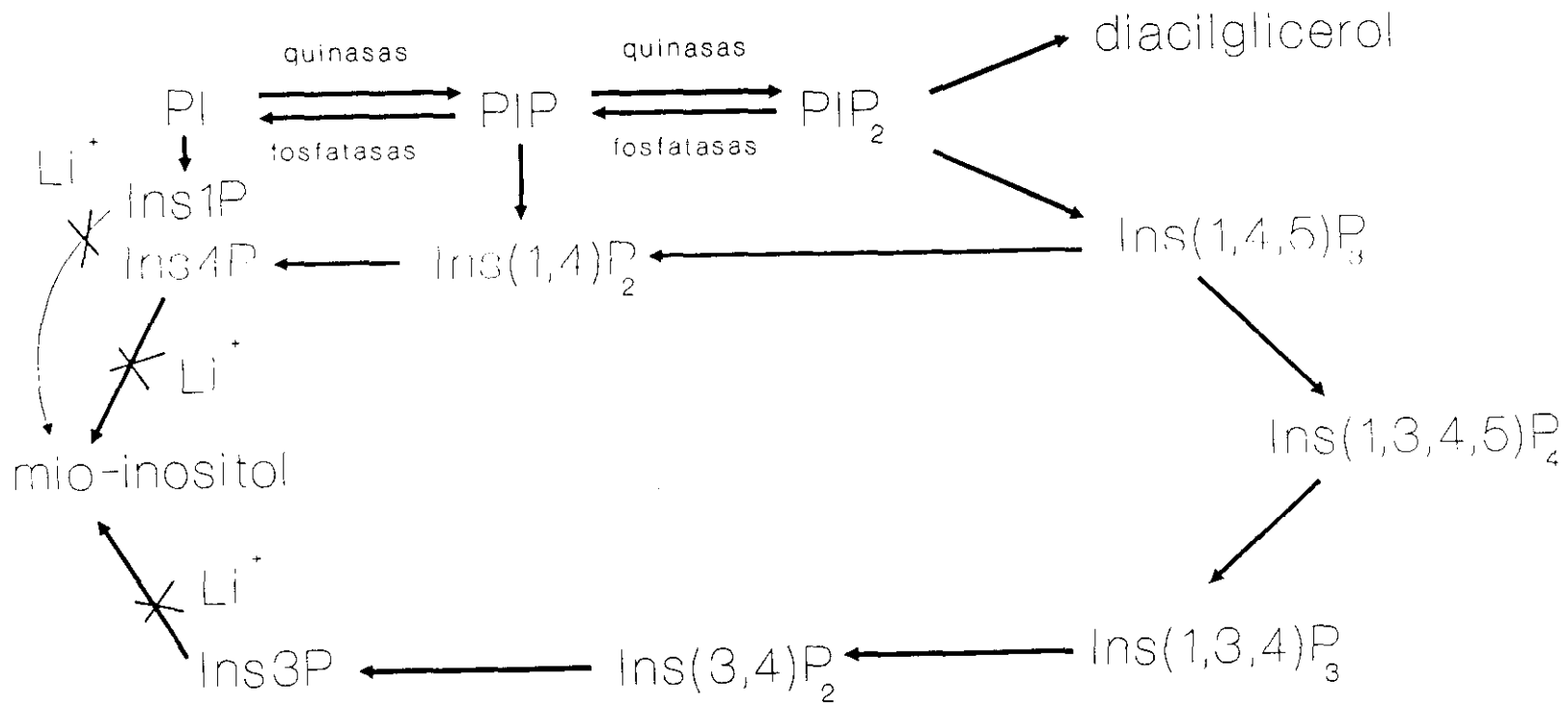


Figura 1. Ciclo general de los fosfatidilinositoles.

normalmente menos frecuente que el fosfatidilinositol 4-monofosfato y, así, el fosfatidilinositol 4,5-difosfato contenido en las células es del 1-10 % del contenido de los fosfatidilinositales.

1.1.3.- ACCION DE LA FOSFOLIPASA C SOBRE LOS FOSFATIDILINOSITALES

Un gran número de datos sugieren que el catabolismo de fosfatidilinositales se acelera como resultado de la unión de ligandos a sus receptores específicos situados en la superficie celular (4,5). Esta hidrólisis ocurre a través de la activación de una enzima fosfodiesterasa específica para los fosfatidilinositales: la fosfolipasa C (PLC). Los productos de la hidrólisis de esta enzima son el 1,2-diacilglicerol y el inositol 1,4,5-trifosfato, los cuales tienen gran importancia en funciones fisiológicas intracelulares como segundos mensajeros, activando la proteína quinasa C (6) y movilizando el calcio del retículo endoplasmático (5).

La fosfolipasa C se encuentra presente en la mayoría de las células de mamíferos (7), así como en plantas y en varios microorganismos. Existen distintas fosfolipasas que han sido purificadas de una gran variedad de tejidos de mamíferos, y varias formas moleculares han sido ya clonadas y secuenciadas (8). La comparación de sus secuencias aminoacídicas y reacciones inmunológicas cruzadas indican que la fosfolipasa C de mamíferos puede ser dividida en cuatro grupos de isoenzimas : PLC- α , PLC- β ,

PLC- Γ y PLC- δ (7), que son polipéptidos simples. La medida de la masa molecular de estas isoenzimas por electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato sódico es: 62-68 KDa la PLC- α , 150-154 KDa la PLC- β , 145-148 KDa la PLC- Γ , y 85-88 KDa la PLC- δ (7). Las cuatro enzimas tienen propiedades catalíticas similares: hidrolizan los tres fosfatidilinositoles PI, PI-4P, y PI-4,5P₂, pero no el PI-3P, PI-3,4-P₂, o PI-3,4,5-P₃ (9), y su actividad catalítica depende de la concentración de calcio. Los cuatro tipos de isoenzimas son bastante diferentes entre sí, no sólo en tamaño molecular sino también en la secuencia aminoacídica. Esta falta de similitud secuencial es consistente con la ausencia de reacciones inmunológicas cruzadas entre las cuatro enzimas.

La fosfolipasa C es una fosfodiesterasa dependiente de calcio, por lo tanto, las concentraciones de calcio determinan el rango de hidrólisis y la preferencia de los substratos. Se sabe que la fosfolipasa C citosólica específica para el fosfatidilinositol (PI) requiere una concentración de calcio del orden mM para una actividad máxima, mientras que la enzima o enzimas de membrana o citosólicas, que hidrolizan los polifosfatidilinositoles (PIP, PIP₂), son activas a concentraciones de calcio del orden de μ M (10). La fosfolipasa C de plaquetas, a concentraciones de calcio 100 μ M, hidroliza 20 veces más rápido el fosfatidilinositol (PI) que el fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP₂); en contraste, a concentraciones de calcio 0,1 μ M, los dos substratos son igualmente hidrolizados, incluso si el fosfatidilinositol (PI) es

14 veces superior al PIP_2 . Aunque el calcio estimula la hidrólisis de polifosfatidilinositales in vitro, la reacción procede incluso en la presencia de EGTA (11).

Los requerimientos de calcio para la hidrólisis del PIP_2 son algo variables. En algunos tejidos, como las glándulas parótidas (12), plaquetas (13), ganglios simpáticos cervicales superiores (14), hepatocitos (15) y fibroblastos humanos (16), la hidrólisis del PIP_2 es independiente de calcio. Por otra parte, en casos tales como sinaptosomas de cerebro (17), neutrófilos (18), islotes pancreáticos (19), páncreas (20), músculo liso del iris (21), la hidrólisis de los polifosfatidilinositales (PIP , PIP_2) es parcialmente dependiente de calcio y, en muchos casos, puede ser activada por ionóforos de calcio.

1.1.4.- ACCION DEL LITIO SOBRE EL METABOLISMO DE LOS FOSFATIDILINOSITALES

El mayor obstáculo para el estudio del metabolismo de los fosfatidilinositales es que estos compuestos se encuentran en los tejidos en cantidades muy pequeñas. Por inhibición de la enzima IP fosfatasa, el litio inhibe la síntesis de los fosfatidilinositales limitando la disponibilidad del mio-inositol para la enzima PI sintasa, y dando lugar a una acumulación de los inositales fosfato, favoreciendo así su cuantificación al aumentar la cantidad de los mismos. Por lo tanto, para favorecer su estudio in vitro, se utiliza el litio.

Allison y Stewart (22) notaron una disminución de los niveles de mio-inositol libre en el cerebro de ratas tratadas con litio. Posteriormente, se vió que los niveles de IP aumentaron (23). El inositol 1-monofosfato es derivado de la síntesis de glucosa y de la hidrólisis de los fosfatidilinositales. La otra fuente de mio-inositol es a través de un transporte activo del fluido extracelular, siendo la entrada por este mecanismo bastante limitada para las células del cerebro y nervios periféricos. Así, el tejido nervioso sería particularmente susceptible a limitaciones en el suplemento del mio-inositol libre por inhibición de la IP fosfatasa, con una disminución en los niveles de fosfatidilinositales. Esta podría muy bien ser la forma de acción antimaniaca del litio (24), ya que el litio puede así inhibir la transmisión sináptica por inhibición del metabolismo de los fosfatidilinositales.

1.1.5.- IMPLICACION DE LOS FOSFATIDILINOSITALES EN LA TRANSDUCCION DE SEÑALES INTRACELULARES: SEGUNDOS MENSAJEROS

Las señales extracelulares son transmitidas a través de la membrana celular, por una variedad de mecanismos en los que intervienen moléculas mensajeras; las hormonas, los factores de crecimiento peptídico, los neurotransmisores, y otros agonistas, se unen a receptores específicos situados en la superficie externa de la célula, y la ocupación de estos receptores inicia la producción de mensajeros activos, incluyendo los bien estudiados AMP_c, GMP_c y, también, las recientemente descubiertas

moléculas mensajeras derivadas de los fosfatidilinositoles. El significado y naturaleza de muchos de estos compuestos aún no se conoce del todo, si bien se conocen tres moléculas mensajeras que son producidas por los fosfatidilinositoles: el ácido araquidónico, el inositol 1,4,5-trifosfato, y el 1,2-diacilglicerol. El ácido araquidónico es oxidado para producir otros mediadores incluidos las prostaglandinas, los leucotrienos y los tromboxanos. El inositol 1,4,5-trifosfato actúa como segundo mensajero para movilizar el calcio del retículo endoplasmático, mientras que el diacilglicerol es un mensajero que actúa como cofactor esencial para la acción de la proteína quinasa C.

Los fosfatidilinositoles son formas de almacenaje de moléculas mensajeras, y son más activamente metabolizados que los otros lípidos. En un gran número de tejidos, el metabolismo de los fosfatidilinositoles está acelerado cuando es estimulado por diversos agonistas. La aceleración del movimiento de los fosfatidilinositoles se debe a la respuesta de las células, que refleja la transducción de señales a través de la membrana plasmática. El movimiento acelerado de los fosfatidilinositoles está unido a procesos celulares que están asociados con la movilización del calcio.

1.1.5.1.- CARACTERISTICAS DEL RECEPTOR DE FOSFATIDILINOSITOLES

La unidad de transducción dentro de la membrana plasmática consta

de tres componentes principales: un receptor que detecta la señal, una proteína G que sirve para acoplar el receptor al tercer componente, y una fosfodiesterasa responsable de la descomposición del lípido precursor.

La cascada de señales dependientes de la hidrólisis de los fosfatidilinositoles comienza por un agente extracelular (hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores) que se une a un receptor de superficie celular. El complejo del ligando con el receptor activa una proteína G situada en la cara interna de la membrana plasmática, como resultado probable de un cambio conformacional inducido por el ligando en el receptor. La proteína G, posiblemente, consistiría en las subunidades α , β . Cuando la proteína G está activada, se produce una transformación de la molécula GTP a GDP, dando lugar al complejo GTP- α que se ha disociado del dímero $\beta\alpha$. El complejo GTP- α estimula a la fosfolipasa C, la cual descompone el PIP₂, liberando dos segundos mensajeros independientes, el diacilglicerol y el inositol 1,4,5-trifosfato.

1.1.5.2.- MOVILIZACION DEL CALCIO INTRACELULAR: INOSITOL 1,4,5-TRIFOSFATO

Sobre la hipótesis, primero de Michell (2), basada en estudios de Fain y Berridge (25) en glándulas salivales de insecto, se enunció que un segundo mensajero generado durante la descomposición de los polifosfatidilinositoles en la membrana

plasmática debía de estar involucrado en la movilización del calcio intracelular. En los últimos 6 años se han recogido evidencias que relacionan la hidrólisis de los polifosfatidilinositoles con la movilización del calcio intracelular a través del inositol 1,4,5-trifosfato. En experimentos in vitro, con agonistas, se ha visto que el inositol 1,4,5-trifosfato se forma rápidamente, con una vida media de aproximadamente 4 segundos, dando lugar al isómero inositol 1,3,4-trifosfato a través de la desfosforilación en la posición 5 del compuesto inositol 1,3,4,5-tetrafosfato (formado por una quinasa que fosforila la posición 3 del inositol 1,4,5-trifosfato). El isómero inositol 1,3,4-trifosfato tiene una vida media mayor, pero carece de capacidad para movilizar el calcio.

1.1.5.2.1- RECEPTOR PARA EL INOSITOL 1,4,5-TRIFOSFATO

La interacción del inositol 1,4,5-trifosfato con el retículo endoplasmático parece incluir lugares de unión específicos. La identificación de éstos en tejidos como las células del hígado, los neutrófilos (26), la glándula pituitaria (27), y los microsomas de corteza adrenal (28), sugieren que el inositol 1,4,5-trifosfato estimula la liberación de calcio del retículo endoplasmático, interaccionando con un receptor. Las membranas mitocondriales parecen carecer de lugares de unión al inositol 1,4,5-trifosfato.

El mecanismo molecular por el cual el inositol 1,4,5-trifosfato

libera calcio del retículo endoplasmático está por determinar; no obstante, hay trabajos en los que se ha sugerido que la unión del inositol 1,4,5-trifosfato al retículo endoplasmático debe conducir a la apertura de canales de calcio (29). La apertura del canal, se calculó, requiere la unión de al menos tres moléculas de inositol 1,4,5-trifosfato.

1.1.5.2.2.- ESPECIFICIDAD DE LOS SUBSTRATOS

La especificidad del inositol 1,4,5-trifosfato por el receptor del retículo endoplasmático, ha sido analizada por prueba de distintos inositoles fosfato. Es de particular interés que el inositol 1,4-difosfato, generado por la hidrólisis del inositol 1,4,5-trifosfato por la enzima inositol 1,4,5-trifosfato 5-fosfatasa, no tenga efecto sobre la movilización de calcio. Hay cuatro inositoles fosfato capaces de producir liberación de calcio, inositoles caracterizados por presentar un par de fosfatos vecinos en las posiciones 4 y 5 del anillo del mioinositol. Estos dos fosfatos parecen ser esenciales para una actividad completa (facilidad para liberar calcio), mientras que el fosfato de la posición 1 parece aumentar la afinidad del inositol 1,4,5-trifosfato por el receptor. Si el fosfato de la posición 1 pasa a la posición 2, se produce una reducción de la afinidad para el receptor, y si se elimina el fosfato, se produce una dramática reducción en la movilización del calcio. La molécula más efectiva probada tiene tres fosfatos, y corresponde a la configuración D-1,4,5-inositol (30).

1.1.5.3.- ACTIVACION DE LA PROTEIN QUINASA C: DIACILGLICEROL

El otro producto de la hidrólisis de los fosfatidilinositoles es el diacilglicerol, que actúa como segundo mensajero activando a la proteína quinasa C encargada de fosforilar proteínas específicas que contribuyen a la respuesta celular final.

Nishizuka y colaboradores demostraron la existencia de una proteína quinasa, la cual requería calcio, fosfolípido (fosfatidilserina), y diacilglicerol para su actividad máxima. A esta proteína se la denominó proteína quinasa C (6).

1.2.- MECANISMO DE SECRECION DE LA INSULINA POR LA GLUCOSA

La secreción de insulina está fundamentalmente regulada por los nutrientes aportados a través de la dieta. La glucosa es el principal nutriente secretagogo, y el único, que a concentraciones fisiológicas y en ausencia de un segundo nutriente (31), es capaz de producir secreción de insulina.

Está ampliamente aceptado que la estimulación de la liberación de insulina por glucosa, requiere un aumento del metabolismo de la glucosa en la célula β pancreática (32). Sin embargo, la naturaleza bioquímica de las señales metabólicas que desencadenan estos procesos aún no han sido establecidas. Algunos de los posibles factores de acoplamiento metabólico incluyen una alteración del potencial fosfato o de los estados energéticos de la célula β , un cambio del potencial redox citosólico, o un

cambio del pH del citosol (31,33). Entre los factores de acoplamiento metabólico implicados en vincular el metabolismo de la glucosa con la secreción de insulina, el mayor apoyo lo ha recibido el aumento del potencial fosfato y los cambios relativos de los nucleótidos de adenina (34, 35).

Se piensa que un aumento del ATP o de la relación ATP/ADP, debido a un aumento del metabolismo de la glucosa, bloquea los canales de potasio, resultando en la despolarización de la célula β y consecuente entrada de calcio y estimulación de la exocitosis de los gránulos de la hormona.

La metabolización de la glucosa es capaz de producir la secreción de insulina, provocando la despolarización de la membrana de la célula β y produciendo como consecuencia de ello, la entrada de calcio extracelular y el aumento del calcio citosólico, con lo que se inicia el proceso de secreción de insulina. Si la secreción de insulina ha de depender únicamente de la concentración de glucosa en el medio extracelular, es necesario que la entrada de glucosa en la célula no sea un factor limitante. Se sabe que las concentraciones extracelulares e intracelulares de glucosa se equilibran rápidamente en la célula β (36).

En relación a la concentración de glucosa en el medio, hay dos factores que permiten a la célula β secretar insulina: la presencia en su membrana de un subtipo especial de transporte facilitado de glucosa, y la metabolización de ésta a través de la

glucoquinasa, isoenzima de la hexoquinasa con K_m alta para la glucosa. La célula β es capaz de fosforilar la glucosa tanto con una hexoquinasa (de baja K_m para la glucosa) como con una glucoquinasa (37). Ya que en la célula β la hexoquinasa se encuentra inhibida por la glucosa 6-fosfato intracelular (38), se cree que la glucoquinasa es la responsable de la fosforilación de la mayor parte de la glucosa de la célula β .

Se ha demostrado que las células β están equipadas con el mismo subtipo de transportador facilitado de glucosa (39) presente en el hígado (GLUT 2). Este transportador tiene una K_m 15-20 mM para la glucosa, lo que proporciona en la célula β el libre paso de la glucosa extracelular al interior.

En la célula β , en estado de reposo, se encontrarían abiertos los canales de potasio sensibles al ATP. Un aumento de la metabolización de la glucosa produciría el cierre de estos canales, despolarizando así la membrana y permitiendo la entrada de calcio a través de los canales dependientes de voltaje. Esto daría lugar a un aumento del calcio citosólico, y abriría los canales de potasio, dando lugar a la repolarización de la membrana, que volvería al estado inicial. De esta forma, en la célula β , la despolarización de la membrana se produciría por la reducción de la permeabilidad para el potasio, a diferencia de la célula nerviosa, donde esta despolarización ocurre por cambios en la permeabilidad para el sodio.

La despolarización provocada por el cierre de los canales de potasio sensibles al ATP, abre un segundo canal en la célula β : el de calcio dependiente de voltaje. El aumento de calcio citosólico se produce principalmente por la entrada extracelular de calcio y no por la movilización del calcio almacenado en el retículo endoplasmático, ya que los antagonistas de los canales de calcio son potentes inhibidores de la secreción de insulina(40).

En la membrana de la célula β hay un segundo tipo de canal de potasio que se activa por calcio a altas concentraciones; su presencia ha sido demostrada en islotes pancreáticos de rata (42); este canal provocaría la repolarización de la membrana. De este modo, se ha propuesto que la acción de estos canales podría explicar el ciclo de despolarización/repolarización durante la actividad eléctrica inducida por la glucosa.

1.3.- METABOLISMO DE LOS FOSFATIDILINOSITOLES EN EL ISLOTE DE LANGERHANS, Y SU RELACION CON LA SECRECION DE INSULINA

En islotes pancreáticos, y en común con una amplia variedad de células y tejidos, se observó un aumento del metabolismo de unos fosfolípidos de membrana durante la estimulación por ciertos tipos de secretagogos (42-45). Tal fenómeno está, en general, limitado a los fosfatidilinositoles y al ácido fosfatídico, y ocurre, predominantemente, en respuesta a nutrientes (42-44), hormonas y neurotransmisores (46). La naturaleza exacta de este aumento del metabolismo de los fosfatidilinositoles en el islote

y, más específicamente, el suceso inicial desencadenado por la estimulación, no ha sido totalmente aclarado, si bien se ha sugerido que la hidrólisis de los fosfatidilinositoles puede ser el primer paso en el proceso de secreción de insulina inducida por glucosa (42-44).

Se sabe que la glucosa, y en mayor grado la carbamilcolina (neurotransmisor agonista del receptor muscarínico), producen una rápida y sostenida activación de la fosfolipasa C en islotes. Los mecanismos de activación de la fosfolipasa C por la glucosa y por la carbamilcolina, son diferentes; en el caso de la glucosa, la activación de la fosfolipasa C es dependiente del metabolismo del azúcar, y la hidrólisis de los fosfatidilinositoles es abolida en presencia de verapamil (bloqueante de los canales de calcio) o en ausencia de cloruro de calcio extracelular, y debe ser atribuible, por lo tanto, a un aumento del ión calcio citosólico (47). Esta interpretación está apoyada por estudios realizados a concentraciones despolarizantes de K^+ , que conllevan a la apertura de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes (48), con lo que aumenta así la concentración citosólica del ión Ca^{2+} libre y se produce la hidrólisis de los fosfatidilinositoles. Se cree que la glucosa ejercería sobre el islote efectos similares a los del K^+ , excepto que el inicio de la despolarización es algo más bajo, y el aumento del calcio, más gradual (48). También se ha observado que la acumulación de inositoles fosfato, estimulada por altas concentraciones de K^+ , es abolida en presencia de EGTA

(49).

En el caso de la carbamilcolina, la activación de la fosfolipasa C no fue abolida en presencia de EGTA (47). Se sabe que la ocupación del receptor muscarínico coincide con una activación directa de la fosfolipasa C, actuando sobre los fosfatidilinositoles. Posiblemente, esta activación está mediada por proteínas reguladoras (proteínas G) dependientes del sistema guanilato ciclasa (50). Por otra parte, se conoce que, en islotes pancreáticos, la ausencia de calcio extracelular produce una inhibición en la producción del isómero inositol 1,3,4-trifosfato y del inositol 1,3,4,5-tetrafosfato (49), debido a que la enzima responsable de la conversión del primer compuesto en el segundo es dependiente de calcio.

Se acepta ampliamente que la hidrólisis del PIP_2 conduce a la producción de dos mensajeros intracelulares: el inositol 1,4,5-trifosfato y el diacilglicerol (51). La glucosa debe estimular la secreción de insulina en islotes pancreáticos por la activación de estas dos vías de sistemas mensajeros por calcio (52, 53).

El mecanismo por el cual la glucosa produce la secreción de insulina, no se conoce completamente, aunque se cree que la glucosa ha de metabolizarse previamente para desencadenar el proceso (31). En base a esta teoría, se ha visto que la glucosa y el α -cetoisocaproato estimulan la secreción de insulina y la hidrólisis de los polifosfatidilinositoles en islotes

pancreáticos (54, 42). La secreción de insulina inducida por glucosa, y la hidrólisis de los polifosfatidilinositoles, era inhibida por manoheptulosa; sin embargo, en el caso del α -cetoisocaproato, estas inhibiciones no se producían. El α -cetoisocaproato no entra en la vía glucolítica, es metabolizado a acetil coenzima A, pasando con la glucosa por una vía común (ciclo del ácido cítrico) dentro de la mitocondria. Así, la manoheptulosa, un inhibidor de la glucoquinasa, no bloquea el metabolismo del α -cetoisocaproato y, por lo tanto, no inhibe la hidrólisis de los polifosfatidilinositoles en islotes. Estos hallazgos sugieren que la hidrólisis de los polifosfatidilinositoles inducida por glucosa en islotes está relacionada con algún metabolito de la glucosa (55).

También se sabe que la galactosa y el mio-inositol no estimulan la secreción de insulina (46) ni el metabolismo de los fosfatidilinositoles. Estos hallazgos son respaldados por trabajos, por los que se ha visto que los carbohidratos que no producen secreción de insulina no son capaces de alterar el metabolismo de los fosfatidilinositoles en el islote (44).

Concentraciones de litio, que producen aumentos en la acumulación de inositoles fosfato en islotes (56) y en otro tejidos, inhiben la liberación de insulina, particularmente su segunda fase, en respuesta a la estimulación con glucosa. Se cree que la explicación podría ser que el litio inhibe el paso de inositol monofosfato a mio-inositol, con lo que se inhibe la resíntesis de

PI. Ello conduciría a una disminución en la producción de los segundos mensajeros, diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato, que llevaría a atenuar la secreción de insulina.

Por otra parte, se ha visto que la oxitocina, hormona responsable de la mayoría de los efectos fisiológicos sobre el útero y la glándula mamaria, potencia la liberación de insulina inducida por glucosa en islotes normales de ratón (57). Este efecto parece incluir la estimulación del metabolismo de los fosfatidilinositoles, con su consecuencia sobre la movilización del calcio y la activación de la proteína quinasa C.

Los efectos de la oxitocina sobre el páncreas endocrino se asemejan a los de la vasopresina, la cual se ha visto recientemente que amplifica la liberación de insulina por estimulación del ciclo de los fosfatidilinositoles en la célula β (57).

La estimulación de la formación del AMP_c , con la consecuente activación de la proteína quinasa A y la estimulación del metabolismo de los fosfatidilinositoles, y resultante movilización del calcio intracelular por el inositol 1,4,5-trifosfato y activación de la proteína quinasa C por el diacilglicerol, son dos importantes mecanismos mediante los cuales las hormonas y los neurotransmisores aumentan la liberación de insulina (58).

El ATP y su análogo estable, el α,β -metileno ATP, estimulan la

hidrólisis de los fosfatidilinositoles (59), cuya reacción, presumiblemente, es catalizada por la PLC. Así, el ATP aumenta la producción de [³H]inositoles del islote. La magnitud de tal respuesta no es muy distinta a la provocada por la carbamilcolina. Esto sugiere que los receptores purinérgicos involucrados en la respuesta a ATP no son idénticos a los receptores muscarínicos del islote. El ATP exógeno afecta a la liberación de insulina, principalmente a través de la hidrólisis de los fosfatidilinositoles.

En otro tipo de estudios realizados en islotes, se ha observado un fenómeno de insensibilización de la célula β -pancreática por diversos compuestos. Asimismo, exposiciones prolongadas (2 horas) de islotes a concentraciones de glucosamina 5-10 mM, resulta en un debilitamiento dosis-dependiente de su respuesta de secreción de insulina e hidrólisis de los fosfatidilinositoles inducido por glucosa 10 mM (60). Ocurre lo mismo cuando los islotes son expuestos a una amplia variedad de compuestos, incluyendo altas concentraciones de glucosa (13,75 mM) (61), colecistoquinina (61), forskolina (62), tolbutamina (63), e interleuquina-1 (64); en estos casos, se ha observado en los islotes una incapacidad de aumento de la hidrólisis de los fosfatidilinositoles, cuando estos islotes son posteriormente estimulados por una amplia variedad de compuestos.

1.4.- POSIBLE MEDIADOR DE LA ACCION DE LA INSULINA: EL IPG

Desde que en 1972 Quatrecasas (65) purificara el receptor de insulina, se han dedicado grandes esfuerzos al descubrimiento de los mecanismos de acción de la insulina sobre sus células diana. A mediados de la última década surgió la idea de la existencia de un segundo mensajero para la insulina, al igual que los nucleótidos cíclicos e inositoles fosfato lo son en otros sistemas. Los estudios iniciales sobre este segundo mensajero se centraron en buscar sustancias capaces de regular enzimas metabólicos de forma similar a la insulina. En 1986 se propuso que estas sustancias de posible actividad mediadora de la insulina podían ser inositol-glicanos producidos por la hidrólisis de un glicolípido de membrana (66). Tras varios trabajos, se llegó a la generación del mediador por la acción de una fosfolipasa C específica del fosfatidilinositol (PI). Este hecho fue de gran importancia, ya que demuestra, por primera vez, la existencia de un precursor para estos mediadores y de un mecanismo de generación del mediador por la insulina. Este precursor fue marcado metabólicamente con glucosamina y galactosa tritiadas en la línea de monocitos BC₃H₁, confirmando su sensibilidad a la insulina y a la fosfolipasa C sensible al fosfatidilinositol (PI) (67). Resultados similares fueron obtenidos por Mato y colaboradores (68) en células H35 de hepatoma de rata, ofreciendo por primera vez datos sobre la composición química del mediador, y proponiendo que la estructura

de éste consistía en un inositol unido covalentemente a una cadena oligosacarídica (69). Este compuesto se produciría a partir de un glicolípido de membrana, tras la estimulación, posiblemente, de una fosfolipasa C por la unión de la insulina con su receptor. De la especificidad de la PI-PLC empleada se deduce que el glicolípido debe ser un glicosil-fosfatidilinositol (GPI). La insulina o la PI-PLC romperían este GPI para rendir diacilglicerol y un mediador hidrosoluble (66).

Este modelo implicaba la presencia de fósforo en el mediador, el derivado del enlace fosfodiéster entre la parte del diacilglicerol y el inositol del precursor GPI. Este extremo fue confirmado por marcaje del precursor GPI con ^{32}P (68). Posteriormente, se aportaron evidencias de la presencia de fósforos adicionales en la cadena oligosacarídica. En su conjunto, los trabajos mencionados aportaron datos para el modelo estructural representado en la **figura 2**. El primer azúcar que se une al inositol sería una glucosamina con un grupo amino libre, como se deduce de la sensibilidad al ácido nitroso del GPI de células de hepatoma H35 marcado con glucosamina y ácido palmítico (69). En este último caso, se originaba un lípido que coemigraba en TLC con un estándar de fosfatidilinositol (PI). El ácido nitroso ataca el grupo amino libre de la glucosamina, rompiendo la cadena oligosacarídica en que se encuentra la glucosamina, originando la 2,5 anhidromanosa (70).

La presencia de galactosa fue determinada directamente por

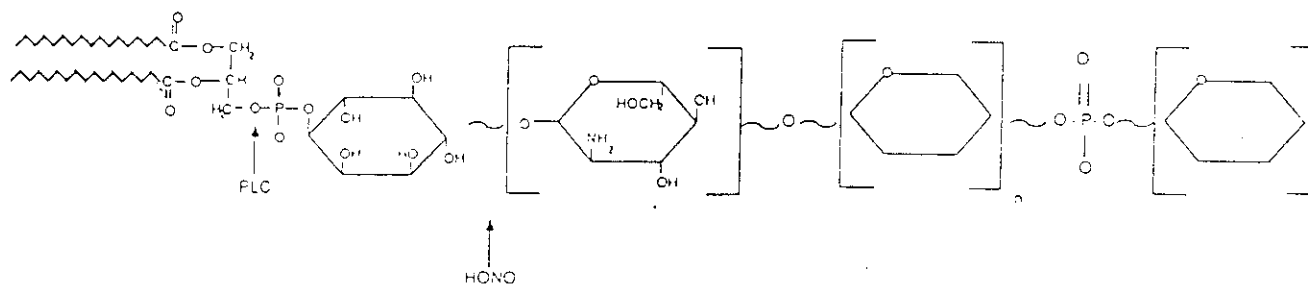


Figura 2. Estructura propuesta del glicosil-fosfatidilinositol (GPI) sensible a la insulina. Por la acción de la PLC se originaría la parte polar (inositol-fosfoglicano), posible mediador de la acción de la insulina, que estaría formado por inositol, glucosamina, y 3-4 galactosas con 2-3 grupos fosfato.

cromatografía de gases en muestras procedentes de hígado de rata y células H35. Por su contenido en inositol, azúcares y fosfato, se ha denominado a este compuesto con actividad mediadora de la insulina, inositol-fosfoglicano (IPG). Hasta el momento no se conoce la estructura química exacta del IPG, ni hay motivos para suponer que los GPI, sensible a la insulina, sean idénticos entre sí en distintos tipos celulares.

En varios tejidos expuestos a la insulina, el IPG parece ser generado en la cara externa de la membrana plasmática (71) y, aparentemente, luego se internaliza en la célula a través de un proceso mediado por un transportador (72).

En islotes pancreáticos, el IPG inhibe la liberación de insulina inducida por glucosa (73). Los efectos del IPG sobre la liberación de insulina estimulada por diferentes secretagogos en islotes aislados, permite proponer que el IPG interfiere en una fase distal de la secuencia secretora de la insulina, posiblemente a nivel de las proteínas quinasas involucradas en los procesos mecánicos que conducen a la exocitosis de los gránulos secretorios (74).

Además de este efecto del IPG sobre la secreción de insulina, se ha observado que el IPG induce una inhibición de la síntesis de proinsulina (75), y es improbable que esta inhibición sea debida al deterioro del reconocimiento de la glucosa por la célula beta pancreática; de hecho, para que la glucosa sea identificada como un estímulo para la biosíntesis de proinsulina y secreción de

insulina, es necesaria la integridad de los procesos oxidativos, que no se ven afectados por el IPG, en el islote pancreático.

2.- OBJETIVOS

- Estudiar el efecto de la glucosa sobre la síntesis de los PIs, en función del tiempo.
- Estudiar el efecto de la glucosa sobre la formación de los IPs, en función del tiempo.
- Estudiar la modulación del GPI, precursor del IPG en el mecanismo de secreción de insulina.

3.1.- MATERIALES

3.1.1.- MATERIAL BIOLÓGICO

- Páncreas de ratas hembras, raza Wistar, de 200-250 g de peso.

3.1.2.- REACTIVOS

3.1.2.1.- AISLAMIENTO DE ISLOTES PANCREÁTICOS

- Enzima "colagenasa P " de Clostridium histolyticum Clostridiopeptidase A, EC 3.4.24.3). Boehringer Mannheim.

3.1.2.2.- EXTRACCIÓN DEL CONTENIDO LIPÍDICO

- Cloroformo (Scharlau)
- Metanol (Scharlau)
- Ácido clorhídrico al 37% (Panreac)

3.1.2.3.- SEPARACIÓN DE FASES

- Cloroformo (Scharlau)
- Cloruro potásico (Merck)

3.1.2.4.- CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

- Placas: gel de sílice Cf 060, 20cm x 20cm (Scharlau)
- Fase móvil: cloroformo (Scharlau)
metanol (Scharlau)
hidróxido amónico (Panreac)
- Cámara de cromatografía, 23cm x 23cm x 8cm (Camag)

3.1.2.5.- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

- El aparato consta de: dos bombas responsables de producir el flujo, modelo 510 (Waters), controlador

automático de gradiente (Waters) y un inyector para muestras (Waters).

- Columna Ultrasil AX 10 (25cm x 4,6mm) de intercambio aniónico (Beckman).
- Fase móvil: fosfato amónico (Merck)
 ácido fosfórico (Merck)
- Líquido de centelleo: Ultima Gold (Packard)

3.1.2.6.- AUTORRADIOGRAFIA

- Películas de rayos X: X-omat, 18cm x 24cm (Kodak)
- Cámaras de exposición de películas (Kodak)
- Amplificador de la señal para ^3H : EN³HANCE (Dupont)

3.1.3.- OTROS REACTIVOS

- Cloruro de litio (Scharlau)
- L-glutamina (Sigma)
- L-leucina (Sigma)
- D-glucosa (Scharlau)
- Meso mio-inositol (Sigma)
- EGTA (Sigma)
- Cloruro cálcico (Merck)
- Cloruro sódico (Panreac)
- Cloruro potásico (Merck)
- Sulfato magnésico hidratado con siete moléculas de agua (Panreac)
- Fosfato disódico hidratado con dos moléculas de agua (Merck)
- Fosfato monopotásico (Merck)
- Bicarbonato sódico (Merck)

- Cloruro magnésico hidratado con seis moléculas de agua (Merck)
- Cloruro cálcico hidratado con dos moléculas de agua (Merck)

3.1.4.- PRODUCTOS RADIATIVOS

- mio-[³H] inositol (Amersham)
- mio-[2-³H] inositol 1-monofosfato (Amersham)
- mio-[2-³H] inositol 1,4-difosfato (Amersham)
- D-mio-[2-³H] inositol 1,4,5-trifosfato (Amersham)
- Fosfatidil [2-³H] inositol 4-monofosfato (Amersham)
- Fosfatidil [2-³H] 4,5-difosfato (Amersham)
- Fosfatidil [2-³H] inositol (Amersham)

3.2.- METODOS

3.2.1.- ISLOTES PANCREATICOS DE RATA

Los islotes de Langerhans fueron aislados de ratas hembras, raza Wistar, de 200-250 g de peso, por la técnica enzimática de la colagenasa (76), utilizando como medio fisiológico la solución Hanks, la cual consta de las siguientes sales: 13,7 mM NaCl, 5,36 mM KCl, 0,82 mM MgSO₄.7H₂O, 0,34 mM Na₂HPO₄.2H₂O, 0,44 mM KH₂PO₄, 1,26 mM CaCl₂, 4,17 mM NaHCO₃, pH 7,4.

3.2.2.- MARCAJE DEL ISLOTE PANCREATICO CON MIO-[³H]INOSITOL

Islotes, en grupos de 40 a 50, fueron incubados con mio-[³H]inositol (actividad específica, 118,5 Ci/mmol) durante 2 horas, en un medio formado por las soluciones I, II, III y agua, en la proporción 1:1:1:1, siendo la composición de las soluciones: solución I (115 mM NaCl), solución II (240 mM NaHCO₃, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂.6H₂O), y solución III (1 mM CaCl₂.2H₂O), pH 7,4, conteniendo albúmina bovina (0,5 %) y 1 mM ó 2,8 mM glucosa. A continuación, y con objeto de eliminar el mio-[³H]inositol no incorporado a la célula, se hicieron tres lavados con el mismo medio conteniendo 1 mM mio-inositol no radiactivo.

3.2.3.- EXTRACCION DE LIPIDOS

Una vez finalizado el proceso de estimulación de los islotes pan-

creáticos en las condiciones del estudio, se procedió a extraer los lípidos con 1 ml de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/12 \text{ N HCl}$ (1:2:0,0125) durante 20 horas a -20°C ; después, se procedió a la separación en dos fases, acuosa y orgánica. Para ello, 1 ml de la mezcla anterior se sonicó dos veces 20 segundos y, a continuación, se añadieron $300 \mu\text{l}$ de CHCl_3 y $300 \mu\text{l}$ $0,1 \text{ M}$ de KCl , con lo que se forma una fase acuosa en la parte superior y otra orgánica en la inferior. La porción acuosa se recogió y conservó para posterior análisis de los IPs (IP , IP_2 , IP_3) mediante cromatografía líquida de alta resolución. La fase orgánica se sometió a cromatografía en capa fina, para la separación de los distintos fosfatidilinosítoles (PI , PIP , PIP_2).

3.2.4.- SEPARACION DE LOS FOSFATIDILINOSITOLES POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC)

La fase orgánica se secó en corriente de N_2 , y fue posteriormente redisuelta en $30 \mu\text{l}$ de la mezcla $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1), de los cuales, $25 \mu\text{l}$ fueron aplicados en una placa de gel de sílice a la vez que los patrones PI , PIP y PIP_2 . La placa se introdujo en una cubeta, y la cromatografía se desarrolló en 130 minutos, aproximadamente, con $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ en la proporción 45:45:4:10, como fase móvil.

3.2.5.- AUTORRADIOGRAFIA

Una vez desarrollada la cromatografía en capa fina, se elimina de

la placa la fase móvil por secado durante 20 minutos; después, el gel se rocía con un amplificador de señal para ^3H (EN 3 HANCE), y se introduce con la película en la cámara de exposición durante una semana a -70°C . Al cabo de este tiempo, se procede al revelado de la película.

3.2.6.- CUANTIFICACION DE LOS FOSFATIDILINOSITOLES

Una vez localizadas por autorradiografía las zonas de migración de los fosfatidilinositales (PI, PIP, PIP $_2$) en el gel de sílice, éstos se rasparon de la placa y se dejaron durante una hora con 1 ml de metanol, para su extracción; el contenido radiactivo de los fosfatidilinositales extraídos fue estimado en un contador β , utilizando 5 ml de Ultima Gold como líquido de centelleo.

3.2.7.- SEPARACION DE LOS INOSITOLES FOSFATO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

Se llevó a cabo con una columna de intercambio aniónico, utilizando un gradiente lineal de fosfato amónico 0-0,6 M, pH 3,8 (ajustado con ácido fosforico), flujo 1 ml/min, según el método descrito por Dean y col.(77). En los eluidos, de 1 ml, se midió el contenido de radiactividad β , utilizando 5 ml de Ultima Gold como líquido de centelleo.

3.2.8.- MARCAJE DE LOS GLICOSIL-FOSFATIDILINOSITOLES

Grupos de 100 islotes, fueron incubados con mio-[^3H]inositol

(actividad específica 100 Ci/mmol), durante 2 horas a 37°C, en un medio formado por las soluciones I, II, III y agua, en la proporción 1:1:1:1, cuya composición se encuentra detallada en el punto 3.2.2 de este apartado, pH 7,4, conteniendo albúmina bovina (0,5 %) y 1 mM glucosa. A continuación, y con objeto de eliminar el mio-inositol no incorporado a la célula, se hicieron 3 lavados con el mismo medio conteniendo glucosa 1 mM y sin mio-inositol no radiactivo.

3.2.9.- DETERMINACION DE GLICOSIL-FOSFATIDILINOSITOLES Y SU SEPARACION POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC)

El material TCA-precipitable de los islotes (ver protocolo del punto 4.13) se solubilizó con 1 ml de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/12 \text{ N HCl}$ (1:2:0,0125), al que se añadieron 300 μl de CHCl_3 y 300 μl KCl 0,1 M, para la formación de dos fases; la fase orgánica se secó en corriente de N_2 , y fue posteriormente redisoluelta en 50 μl de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1), de los cuales, 45 μl fueron aplicados a una placa de gel de sílice a la vez que los patrones radiactivos PI, PIP y PIP_2 . La placa se introdujo en una cubeta, y la cromatografía se desarrolló dos veces en 230 minutos, aproximadamente, en solvente ácido $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COCH}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$ (50:20:10:10:5). El origen de la placa se extrajo con 2 ml de CH_3OH , y el extracto seco, reconstituido en 50 μl de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1), se aplicó a una placa de gel de sílice, y la cromatografía se desarrolló en 130 minutos, aproximadamente, en solvente básico, $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4/\text{H}_2\text{O}$ (45:45:4:10), como fase móvil.

4.- RESULTADOS

4.1.- ADSORCION DE LOS ^3H -FOSFATIDILINOSITOLES A DIFERENTES MATERIALES DE TRABAJO (Tabla 1)

Protocolo

En un principio, comprobamos la posible adsorción inespecífica de los fosfatidilinositoleles a los distintos materiales de los elementos que se iban a utilizar en el desarrollo del estudio. Para ello, se añadieron cantidades conocidas de los patrones ^3H -PI y ^3H -PIP a tubos Eppendorf (polietileno) y a tubos de vidrio siliconizados, y se mantuvieron durante 30 minutos a 4°C . Para la dispensación de esas cantidades se utilizaron puntas de pipeta de polipropileno; posteriormente, el contenido de los tubos fue transferido a viales del contador β , mediante capilares de vidrio de las pipetas SMI. Los tubos fueron lavados con la mezcla $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2/1), y ésta se transfirió a su correspondiente vial para la determinación de radiación β . En las puntas de plástico, en los capilares de vidrio, y en los tubos vacíos, se determinó el contenido en radiación β adherida.

Resultados

El mayor porcentaje de ^3H -PI, adherido a los materiales estudiados, fue detectado en el tubo de vidrio síliconizado ($10,2 \pm 0,2 \%$), y, el menor, en el tubo Eppendorf ($0,6 \pm 0,1 \%$). En el capilar de vidrio ($2,5 \pm 0,5 \%$), el porcentaje adherido fue la mitad que en la punta de plástico ($5,4 \pm 0,1 \%$). Para el ^3H -PIP,

Tabla 1. Porcentajes de los patrones $^3\text{H-PI}$, $^3\text{H-PIP}$ y $^3\text{H-PIP}_2$ adheridos a los materiales de trabajo (Media \pm SEM).

	PUNTA PLASTICO (polipropileno) n= 6	CAPILAR (vidrio) n= 6	TUBO EPPENDORF (polietileno) n= 6	TUBO VIDRIO (siliconizado) n= 6
$^3\text{H-PI}$ (%)	5,4 \pm 0,1	2,5 \pm 0,5	0,6 \pm 0,1	10,2 \pm 0,2
$^3\text{H-PIP}$ + $^3\text{H-PIP}_2$ (%)	7,4 \pm 2,4	2,6 \pm 1,1	5,2 \pm 0,8	36,7 \pm 1,5

en el tubo de vidrio siliconizado, la adsorción, al igual que para el ^3H -PI, fue mayor ($36,7 \pm 1,5 \%$) que al tubo Eppendorf ($5,2 \pm 0,8 \%$), y menor al capilar de vidrio ($2,6 \pm 1,1 \%$) que a la punta de plástico ($7,4 \pm 2,4 \%$).

4.2.- EXTRACCION DE LOS COMPONENTES DEL CICLO DE LOS FOSFATIDIL- INOSITOLES: RECUPERACION DE LOS FOSFATIDILINOSITOLES E INO- SITOLES FOSFATO TRITIADOS (Tabla 2)

Protocolo

Para el aislamiento de los fosfatidilinositoles e inositoles fosfato radiactivos, se probaron tres métodos de extracción:

A) En tubos con 100 islotes, se añadió 1 ml de la mezcla extractiva $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/12 \text{ N HCl}$ (1:2:0,015) y cantidades conocidas de los patrones radiactivos PI, PIP, PIP₂ e IP₃. Seguidamente, para la formación de la fase acuosa y orgánica, se les añadió 300 μl de CHCl_3 y 300 μl de 0,1 M KCl. Una vez formadas las dos fases, éstas se separaron y se midió su contenido en radiactividad β .

B) Se procedió de la misma forma que el caso anterior, pero utilizando la mezcla extractiva $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/12 \text{ N HCl}$ (1:2:0,0125).

C) En este caso, la mezcla extractiva fue $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/12 \text{ N HCl}$ (2:1:0,01) y, para la formación de las dos fases, se añadieron sólo 300 μl de 0,1 M KCl.

Resultados

Se pudo observar que, con el método de extracción A, la recuperación de los fosfatidilinositoles radiactivos en la fase

Tabla 2. Porcentajes de recuperación de los fosfatidilinositoles e inositoles fosfato en la fase orgánica y acuosa, respectivamente (Media \pm SEM, n= 3).

MEZCLA EXTRACTIVA	³ H-PI	³ H-PIP + ³ H-PIP ₂	³ H-IP ₃	EXTRACTO (%)	FASE ORGANICA (%)	FASE ACUOSA (%)
A	+	+	-	100,0	94,5 \pm 5,4	5,5 \pm 0,2
A	-	-	+	100,0	2,5 \pm 0,1	97,5 \pm 3,2
B	+	+	-	100,0	97,3 \pm 1,1	2,7 \pm 0,1
B	+	+	-	100,0	0	100,0 \pm 2,5
C	-	-	+	100,0	84,1 \pm 2,5	15,9 \pm 1,0

A: CHCl₃/CH₃OH/HCl 12 N (1:2:0,015)

B: CHCl₃/CH₃OH/HCl 12 N (1:2:0,0125)

C: CHCl₃/CH₃OH/HCl 12 N (2:1:0,01)

orgánica, fue alta (95 %), detectándose en la fase acuosa el 5 % residual. Con este método, obtuvimos también buenos resultados para la separación de la fase acuosa, donde el patrón $^3\text{H-IP}_3$ tuvo una recuperación del 98 %, detectándose en la fase orgánica el resto. En el caso del método de extracción B, la recuperación de los fosfatidilinositoles patrones en la fase orgánica fue del 97 %, detectándose el 3 % restante en la fase acuosa. La recuperación del patrón $^3\text{H-IP}_3$ en la fase acuosa fue del 100 %, no detectándose radiactividad en la fase orgánica. En el método de extracción C, la recuperación de los fosfatidilinositoles fue del 84 %, detectándose el 16 % restante en la fase acuosa.

A la vista de los resultados, decidimos utilizar el método de extracción B en el estudio.

4.3.- SEPARACION DE LOS ^3H -FOSFATIDILINOSITOLES POR FASE MOVIL (Figura 3)

Protocolo

Con el fin de cuantificar los fosfatidilinositoles radiactivos por cromatografía en capa fina (TLC), se hizo un estudio con diferentes fases móviles para determinar el procedimiento de separación más idóneo de los mismos. Para ello, se aplicaron cantidades conocidas de los patrones radiactivos, PI, PIP y PIP₂, en placas de gel de sílice. Las cromatografías se desarrollaron utilizando tres fases móviles diferentes: A) CHCl₃/CH₃OH/NH₄/H₂O (45:45:4:10), B) CH₃-CH₂-CH₂-CH₃OH/CH₃-COOH/H₂O (75:10:25), y C)

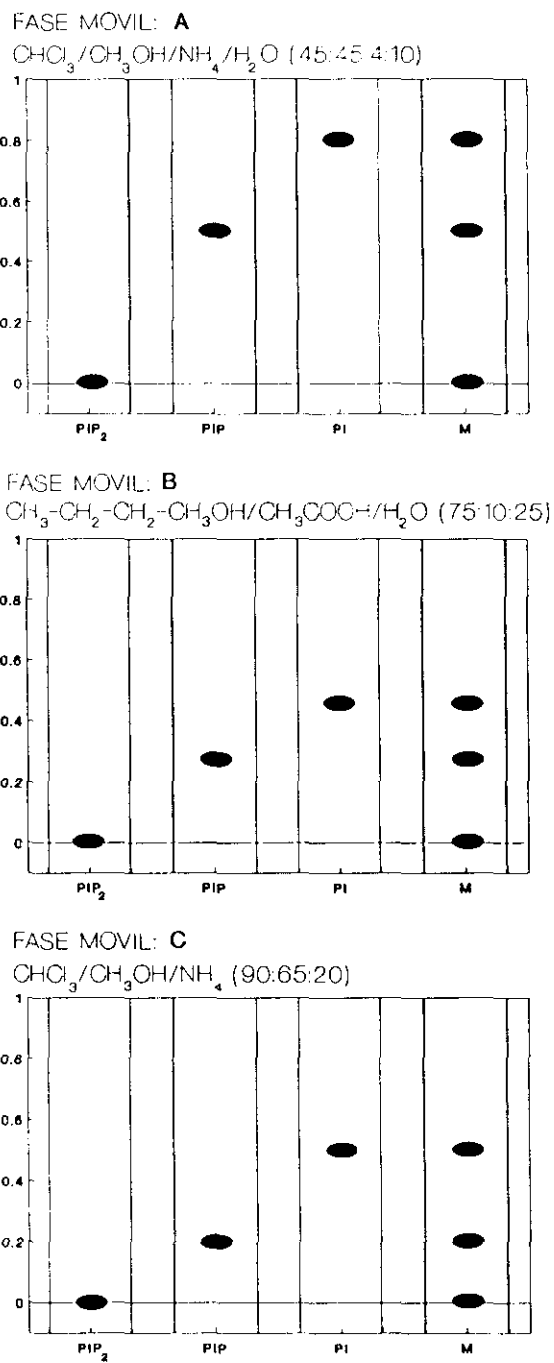


Figura 3. Separación, con distintas fases móviles, de los ^3H -fosfatidilinositoles, por cromatografía en capa fina.

CHCl₃/CH₃OH/NH₄ (90:65:20), y se dieron por finalizadas cuando el frente de la fase móvil alcanzó una distancia de 2 cm por debajo del borde superior de la placa, lo cual ocurrió en, aproximadamente, 130 minutos. Para analizar la resolución de los tres métodos, se realizó una autorradiografía.

Resultados

En la **figura 3** está representada la separación de los fosfatidilinositoles radiactivos por cromatografía de capa fina con cada una de las tres fases móviles. Como puede observarse, el patrón ³H-PIP₂ permaneció en el lugar de aplicación, en los tres casos. El ³H-PIP presentó un R_f muy similar con la fase móvil **B** (0,27) y con la **C** (0,2); sin embargo, con la fase móvil **A**, el R_f fue prácticamente el doble (0,5) del de las fases **B** y **C**. El R_f del ³H-PI, al igual que el del ³H-PIP, fue muy similar con las fases **B** (0,45) y **C** (0,5); en cambio, con la **A**, el R_f fue más alto (0,8).

Cuando se aplicaron los tres patrones a la vez, pudimos observar que, con la fase móvil **A**, los patrones ³H-PIP₂ y ³H-PIP se separaban mejor entre ellos que con la **B** y **C**. Por el contrario, con las fases móviles **A** y **C**, la distancia entre el ³H-PIP y el ³H-PI fueron las mismas, mientras que con la **B**, éstas fueron menores. Con la fase móvil **A**, la cromatografía se resolvió en una mayor distancia entre los tres patrones, en comparación con las otras dos fases móviles. En consecuencia, decidimos resolver las cromatografías TLC de nuestro estudio con la fase móvil **A**.

4.4.- EXTRACCION Y CUANTIFICACION DE LOS ^3H -FOSFATIDILINOSITOLES: TLCs (Tabla 3)

Protocolo

La separación de los fosfatidilinositoles (fase orgánica) se realizó por cromatografía en capa fina (TLC), utilizando la mezcla $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4/\text{H}_2\text{O}$ (45:45:4:10) como fase móvil. Se cuantificó la recuperación de cantidades conocidas de los patrones ^3H -PI, ^3H -PIP y ^3H -PIP₂ de dos maneras distintas: A) en un vial (contador β) se añadió una raspadura del gel de sílice (2 cm x 1,5 cm), la cual se puso en contacto con los patrones radiactivos de referencia, durante 1 hora, B) se aplicaron, previamente, los patrones ^3H -PI, ^3H -PIP y ^3H -PIP₂ al gel de una placa y, a continuación, se raspó el área. En todos los casos, la cuantificación de los patrones radiactivos se hizo directamente y, también, con extracción previa por tratamiento de la muestra con 2 ml de metanol durante 2 horas. Para la medida del contenido radiactivo, se utilizaron distintos tipos de líquido de centelleo, con el fin de determinar cual pudiera ser el más adecuado (tabla 3).

Resultados

Observamos que, cuando se añade por separado el patrón ^3H -PI y una raspadura del gel de sílice, los porcentajes de recuperación del patrón ^3H -PI, sin extracción con metanol, y determinada su radiactividad por los líquidos de centelleo Optiphase Hisafe II (93 %), Cocktail 11 (100 %) y Cocktail 22 (81 %), son altos. En

Tabla 3. Efecto de la extracción con metanol sobre los porcentajes de recuperación de los patrones $^3\text{H-PI}$, $^3\text{H-PIP}$ y $^3\text{H-PIP}_2$ del gel de sílice: cuantificación mediante diferentes líquidos de centelleo (Media \pm SEM).

PATRON	GEL, 1 h	TLC	METANOL 1 ml, 2 h	AQUASOL n= 3	OPTIPHASE HISAFE II n= 1	COCKTAIL 11 n= 1	COCKTAIL 22 n= 1
$^3\text{H-PI}$							
+	-	-	-	100,0	100,0	100,0	100,0
+	+	-	-	43,3 \pm 1,2	93,3 \pm 2,6	100,0	80,8
+	-	+	-	36,3 \pm 1,5	85,3 \pm 0,9	25,7	37,4
+	-	-	-	100,0	100,0	100,0	100,0
+	+	-	+	94,0 \pm 4,9	91,7 \pm 0,7	85,6	100,0
+	-	+	+	85,7 \pm 3,5	87,0 \pm 1,0	83,3	100,0
$^3\text{H-PIP} + ^3\text{H-PIP}_2$							
+	-	-	-	100,0	100,0	100,0	100,0
+	+	-	-	46,3 \pm 2,8	72,3 \pm 3,8	100,0	73,1
+	-	+	-	45,3 \pm 4,4	63,0 \pm 2,1	100,0	100,0
+	-	-	+	100,0	100,0	100,0	100,0
+	+	-	+	80,3 \pm 5,9	55,7 \pm 4,3	100,0	100,0
+	-	+	+	46,7 \pm 7,1	65,0 \pm 8,5	100,0	100,0

cambio, con el líquido de centelleo Aquasol, la recuperación es sólo de un 43 %; sin embargo, el porcentaje de recuperación aumenta al doble (94 %) cuando se añade previamente metanol. Se observó que, con la extracción previa de los patrones con metanol, la eficiencia en la cuantificación es la misma con los tres líquidos de centelleo estudiados. En detalle, cuando el patrón $^3\text{H-PI}$ es aplicado a la placa (gel de sílice), y posteriormente la zona es raspada para determinar su radiactividad, si no se añade metanol, los porcentajes de recuperación del $^3\text{H-PI}$ con los líquidos de centelleo Aquasol (36 %), Cocktail 11 (26 %) y Cocktail 22 (37 %) son bajos en todos los casos excepto en el del Optiphase Hisafe II (85 %). Por el contrario, con metanol, los porcentajes de recuperación del $^3\text{H-PI}$ con los líquidos de centelleo Aquasol (86 %), Cocktail 11 (83 %) y Cocktail 22 (100 %), aumentan, y con Optiphase Hisafe II, se mantiene (87 %).

Cuando se añadió por separado una mezcla de los patrones $^3\text{H-PIP}$ y $^3\text{H-PIP}_2$, y una raspadura del gel de sílice en el mismo vial, los porcentajes de radiactividad medidos con los líquidos de centelleo Optiphase Hisafe II (72 %), Cocktail 22 (73 %) y Cocktail 11 (100 %), fueron altos; sólo en el caso del Aquasol, la radiactividad recuperada fue baja (46 %). En cambio, cuando se añade metanol, la radiactividad determinada con el Optiphase Hisafe II, disminuye (63 %), mientras que la del Cocktail 11 (100 %), se mantiene en su valor máximo, y la del Cocktail 22,

aumenta a un 100 %. Con Aquasol, el porcentaje de radiactividad detectada fue el doble.

Cuando aplicamos previamente la mezcla de los patrones, ^3H -PIP y ^3H -PIP₂, al gel de sílice y la zona se raspó, la radiactividad, sin añadir metanol, medida con Cocktail 11 y Cocktail 22, fue 100 %; con Aquasol, fue baja (45 %) y, con Optiphase Hisafe II, fue un poco más alta (63 %). Estos valores, cuando se añadió metanol, se mantuvieron para los cuatro líquidos de centelleo estudiados.

De este estudio, concluimos que el metanol facilita la extracción de la radiactividad del gel de sílice y mejora la cuantificación de los fosfatidilinositoles. El líquido de centelleo elegido para la determinación de la radiación β , fue Optiphase Hisafe II.

4.5.- VISUALIZACION DE LOS ^3H -FOSFATIDILINOSITOLES POR AUTORADIOGRAFIA (Figura 4)

Los extractos orgánicos correspondientes a las muestras obtenidas a los tiempos de incubación 0, 15, 30, 60 y 300 segundos, con glucosa 0,5 mM, fueron resueltos por cromatografía en capa fina en el medio básico $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4/\text{H}_2\text{O}$ (45:45:4:10). En la autorradiografía (figura 4), se observó que cada muestra se resolvía en 4 bandas, de las cuales, 3 fueron identificadas con los patrones fosfatidilinositoles radiactivos (PIP₂, PIP, PI); sobre la cuarta banda, pensamos que corresponde al GPI, precursor del posible mediador de la insulina IPG.

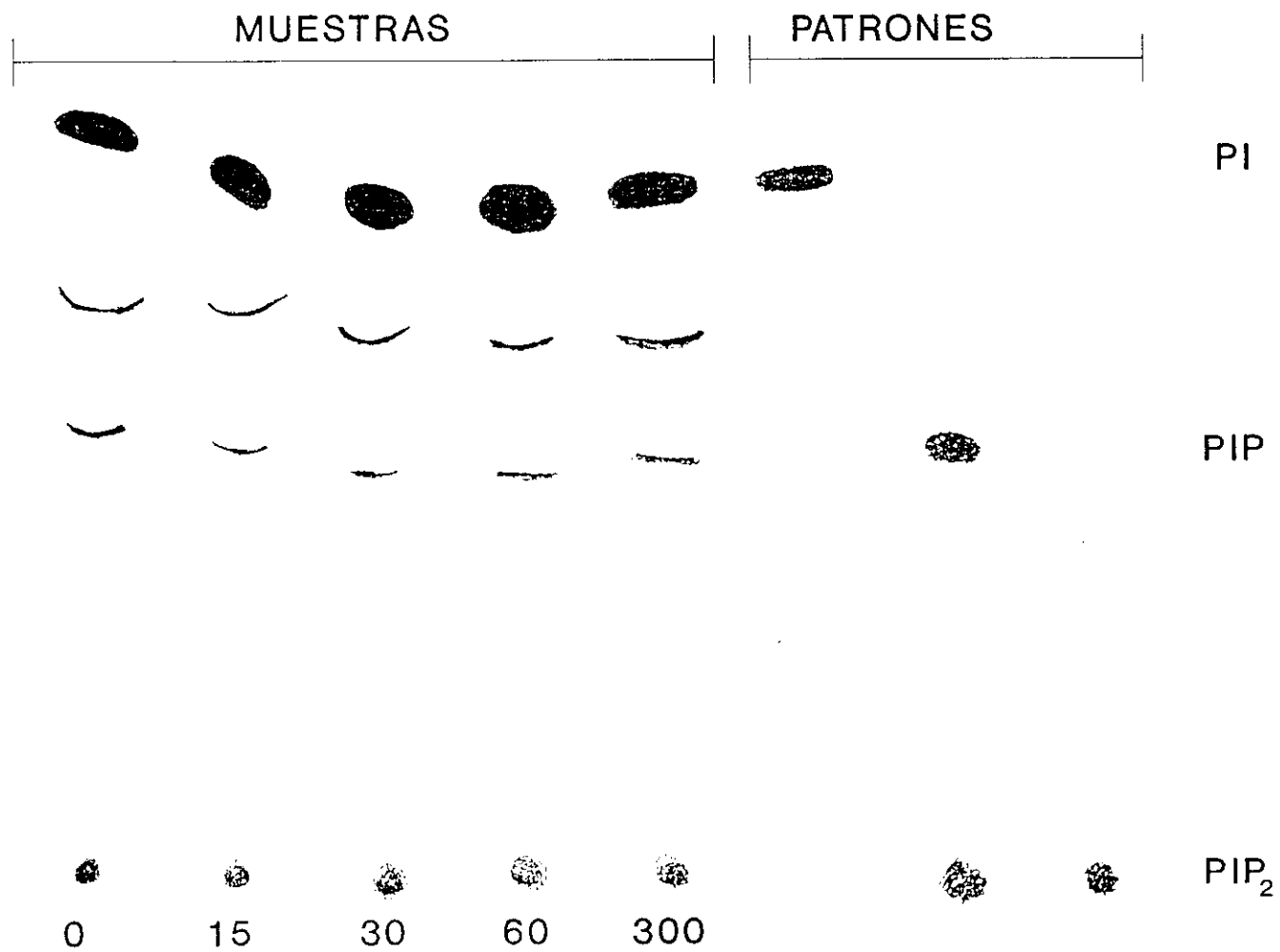


Figura 4. Autorradiografía de una TLC de extractos orgánicos de islotes previamente marcados con mio-³H]inositol, y tras distintos tiempos de incubación (0, 15, 30, 60 y 300 segundos) con glucosa 0,5 mM, y de patrones radiactivos.

4.6.- RECUPERACION DE LOS ^3H -FOSFATIDILINOSITOLES DE LAS TLCs (Tabla 4)

Protocolo

Una vez elegido el método de separación más adecuado, las mejores condiciones para la extracción de los fosfatidilinositoles del gel de sílice, y seleccionado ya el líquido de centelleo idóneo (Optiphase Hisafe II), pasamos a estudiar la recuperación de los fosfatidilinositoles tras la TLC. Para ello, cantidades conocidas de los fosfatidilinositoles patrones ^3H -PI, ^3H -PIP y ^3H -PIP₂, se sometieron a cromatografía en capa fina, en medio básico $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4/\text{H}_2\text{O}$ (45:45:4:10). Dado que en nuestro trabajo queríamos localizar los distintos compuestos radiactivos por autorradiografía y posterior impresión en película X-Omat durante 7 días a -70°C , se cuantificó el contenido de los fosfatidilinositoles patrones en sus bandas correspondientes de placas de TLC y de otras, extraídos con 1 ml de metanol durante 1 hora.

Resultados

En la **tabla 4** están recogidos los siguientes resultados: los valores de los patrones radiactivos PI, PIP y PIP₂, obtenidos por conteo directo del extracto correspondiente de la fracción del gel, no fueron distintos en las placas sometidas o no a autorradiografía. Se observó que la recuperación del PI era el doble de la del PIP y PIP₂, siendo estas dos últimas, prácticamente iguales entre sí. Las recuperaciones obtenidas en

Tabla 4. Cuantificación por autorradiografía de los fosfatidilinositoles tritiados en las TLCs, (porcentajes sobre el total aplicado, Media \pm SEM).

	$^3\text{H-PI}$ n= 12	$^3\text{H-PIP}$ n=12	$^3\text{H-PIP}_2$ n= 12
Con autorradiografía	87,8 \pm 8,4	35,3 \pm 6,0	32,8 \pm 0,3
Sin autorradiografía	94,8 \pm 3,4	36,7 \pm 4,2	37,7 \pm 4,2

este estudio previo fueron tomadas en cuenta para el cálculo final de los fosfatidilinosítoles radiactivos de las muestras.

4.7.- AISLAMIENTO DE LOS ^3H -INOSITOLES FOSFATO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (Figura 5 y tabla 5)

Se estudiaron los lugares de elución de los patrones inosítoles fosfato, ^3H -IP, ^3H -IP₂ e ^3H -IP₃, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), según el método descrito en el apartado de materiales y métodos. Se observó que el patrón IP aparecía en el minuto 4-5, el IP₂, en el 14-15, y el IP₃, en el 22-23. Una vez calculada la recuperación de cada patrón, se observó que ésta era diferente para cada uno de ellos (tabla 5), por lo tanto, esto se tuvo siempre en cuenta en las cuantificaciones.

4.8.- ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL ^3H -IP₃ (Tabla 6)

Protocolo

En tubos con 20 islotes, se añadieron 10 μl de cloruro de litio (10 mM), 0,012 μCi de mio-[2- ^3H] inositol 1,4,5-trifosfato (actividad específica, 1,0 Ci/mmol) y 1 ml de la mezcla extractiva $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/12\text{ N HCl}$ (1:2:0,0125). Posteriormente, para la formación de las fases acuosa y orgánica, se añadieron 300 μl de CHCl_3 y 300 μl de 0,1 M KCl; como control, se siguió todo el proceso en ausencia de islotes. La fase acuosa de cada tubo se estudió por HPLC, bien el día del experimento (día 0), o tras distintos periodos de conservación a -20°C (1, 2, 5, 14 y 15

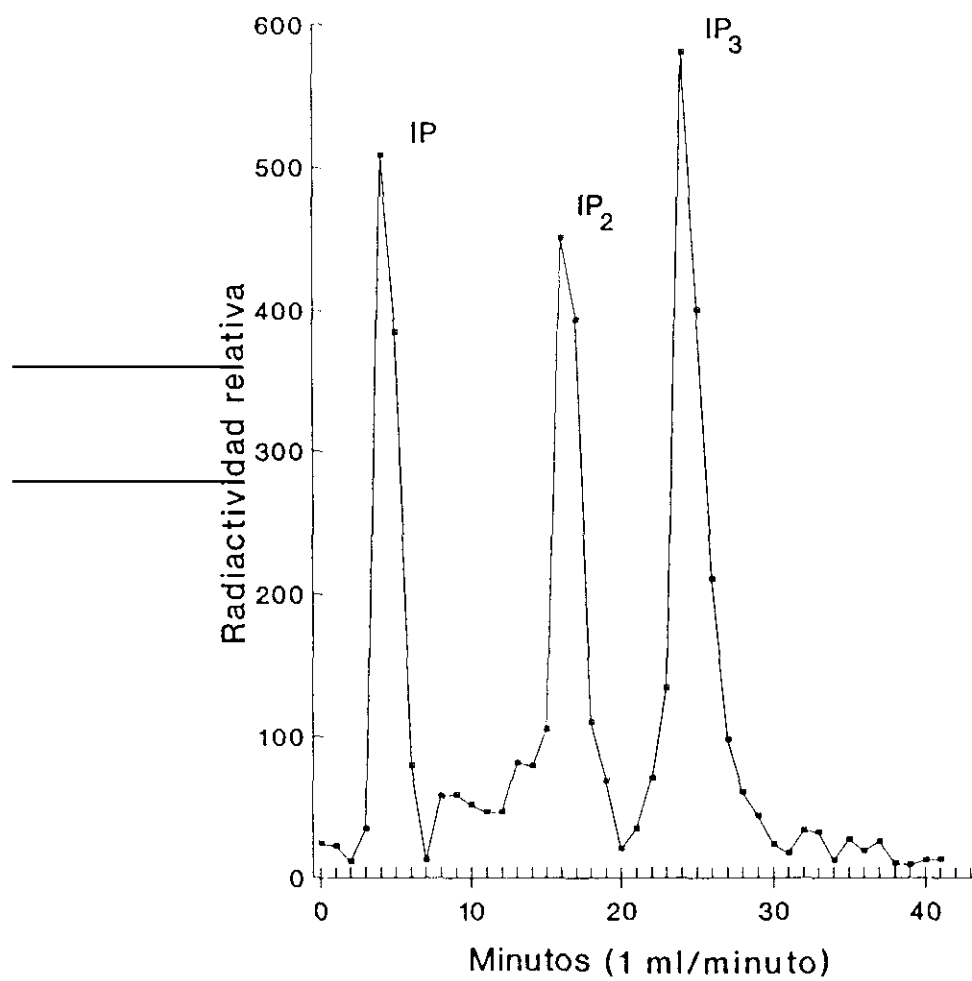


Figura 5. Separación de los patrones de inositoles fosfato radiactivos, por cromatografía líquida de alta resolución.

Tabla 5. Recuperación de los patrones de inositoles fosfato radiactivos, separados por HPLC.

	DPM CARGADAS	% RECUPERADO
³ H-IP n= 1	22896	67
³ H-IP ₂ n= 1	23412	74
³ H-IP ₃ n= 6	13496 ± 788	32 ± 2

Tabla 6. Estabilidad del $^3\text{H-IP}_3$ en presencia de islotes, a -20°C (porcentajes de radiactividad total).

DIAS	ISLOTES	$^3\text{H-IP}_3$	$^3\text{H-IP}_2$	$^3\text{H-IP}$
0	-	65,1	13,0	4,1
	+	67,0	12,2	5,0
1	-	64,3	12,4	8,0
	+	68,0	12,1	7,3
2	-	71,0	9,0	4,0
	+	70,0	8,0	4,0
5	-	71,0	8,0	6,0
	+	63,3	16,0	8,2
14	-	71,0	9,1	5,0
	+	72,0	11,3	7,0
15	-	72,0	10,0	6,2
	+	69,0	10,4	7,0

días).

Resultados

Pudimos observar que el patrón radiactivo $^3\text{H-IP}_3$, tanto en presencia como en ausencia de islotes, presentaba ya un cierto grado de degradación el día 0, el cual no aumentó a lo largo de los 15 días consecutivos. Los porcentajes de $^3\text{H-IP}_2$ e $^3\text{H-IP}$ contaminantes, tampoco sufrieron una modificación importante a lo largo de los 15 días de conservación de las muestras a -20°C .

4.9.- ESTUDIO DE ESTABILIDAD Y RECUPERACION DEL $^3\text{H-IP}_3$, EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE ISLOTES (Tabla 7)

Protocolo

Se incubaron grupos de 20 islotes en $100\ \mu\text{l}$ de un medio de bicarbonato (pH 7,4), conteniendo sales, albúmina bovina (0,5 %) y $1\ \text{mM}$ glucosa, durante 2 horas a 37°C . Seguidamente, sin retirar el medio, se añadieron $510\ \mu\text{l}$ de un medio que contenía $2,2 \times 10^{-2}\ \mu\text{Ci}$ de mio-[2- ^3H]inositol 1,4,5-trifosfato ($1\ \text{Ci}/\text{mmol}$), y se incubó durante 30 minutos a 37°C . Se siguió el mismo protocolo, en ausencia de islotes durante 30 minutos a 37°C .

Resultados

Con islotes se observa una pequeña degradación del patrón $^3\text{H-IP}_3$, frente a cuando el patrón radiactivo fue incubado en ausencia de islotes. Lo mismo ocurrió con los patrones $^3\text{H-IP}$ e $^3\text{H-IP}_2$.

Tabla 7. Porcentajes de recuperación de $^3\text{H-IP}_3$ tras su incubación durante 30 minutos en presencia y ausencia de islotes de Langerhans (% del total).

	$^3\text{H-IP}$ (%)	$^3\text{H-IP}_2$ (%)	$^3\text{H-IP}_3$ (%)
SIN ISLOTES	5,0	5,0	90,0
CON ISLOTES	18,2	14,2	67,6

4.10.- EFECTO DE LA GLUCOSA SOBRE EL METABOLISMO DE LOS FOSFATIDILINOSITOLES

Ha sido documentado que muchos sistemas celulares son capaces de responder a una estimulación extracelular através de un aumento del metabolismo de los fosfatidilinositoles. Agonistas tales como nutrientes, neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento, producen la hidrólisis de los fosfatidilinositoles, originando los segundos mensajeros, 1,2-diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato. En islotes pancreáticos de rata, la glucosa y otros nutrientes tienen efecto estimulador sobre la hidrólisis de los fosfatidilinositoles y la formación de los inositoles fosfato.

Protocolo

En este estudio, incubamos grupos de 40-50 islotes con 3 μCi de mio- $[\text{}^3\text{H}]$ inositol (100 Ci/mmol) en 48 μl ($6,25 \times 10^{-4}$ mM) de un medio de bicarbonato (pH 7,4), conteniendo sales, albúmina bovina (0,5 %) y 1 mM glucosa, durante 2 horas a 37°C; a continuación, se lavaron con medio no radiactivo con 1 mM mio-inositol. Tras una preincubación de 20 minutos a 37°C en 500 μl de medio con LiCl (20 mM), los islotes se incubaron en 1 ml de medio con glucosa a alta (16,7 mM) o baja (0,5 mM) concentración, durante 0, 15, 30, 60 y 300 segundos. Después, se añadió a los islotes 1 ml $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/12 \text{ N HCl}$ (1:2:0,0125) como mezcla extractiva, y 300 μl de CHCl_3 y 300 μl de 0,1 M KCl, para la formación de las fases acuosa y orgánica.

La separación de los inositoles fosfato por cromatografía líquida

de alta resolución (HPLC), y la de los fosfatidilinositoles, por cromatografía en capa fina (TLC), se realizó como se describe en el apartado de materiales y métodos.

4.10.1.- CONTENIDO BASAL DE LOS ³H-FOSFATIDILINOSITOLES EN EL ISLOTE DE LANGERHANS (Tabla 8)

Tras el periodo de marcaje e incubación con LiCl (tiempo 0 de incubación), se midieron las cantidades de fosfatidilinositoles y se determinaron sus porcentajes con respecto al total. Se observó que la cantidad de PI, respecto al total de fosfatidilinositoles, fue del $86,9 \pm 11,1 \%$; en el caso del PIP, éste fue $2,3 \pm 0,4 \%$ y, finalmente, para el PIP₂, el porcentaje fue de $10,8 \pm 2,4 \%$.

4.10.2.- CONTENIDO BASAL DE LOS ³H-INOSITOLES FOSFATO EN EL ISLOTE DE LANGERHANS (Tabla 9)

Los valores de IP e IP₂ detectados fueron similares entre sí, y cada uno representó alrededor de un 50% del total. En el caso del IP₃, su posible presencia fue indetectable.

4.10.3.- EFECTO DE LA GLUCOSA SOBRE LOS ³H-FOSFATIDILINOSITOLES EN EL ISLOTE DE LANGERHANS (Tabla 10 y Figura 6)

Los valores de ³H-PIs totales (tabla 10), determinados en la fase orgánica, apenas sufren cambios hasta los 60 segundos con glucosa 16,7 mM, y se produce un incremento a los 5 minutos. A los 30 segundos y 5 minutos, los valores de ³H-PIs totales obtenidos con

Tabla 8. Valores de los fosfatidilinositoles (PIs) radiactivos, en el islote de Langerhans (Media \pm SEM, n= 7).

³ H-PIs	amoles/islote	% del total
³ H-PI	2218 \pm 284	86,9 \pm 11,1
³ H-PIP	59 \pm 11	2,3 \pm 0,4
³ H-PIP ₂	274 \pm 62	10,8 \pm 2,4
Total	2551 \pm 292	100,0 \pm 11,4

Tabla 9. Valores basales de los inositoles fosfato radiactivos en el islote de Langerhans (Media \pm SEM, n= 7).

³ H-IPs	amoles/islote	% del total
³ H-IP	1142 \pm 203	55,8 \pm 9,9
³ H-IP ₂	905 \pm 235	44,2 \pm 11,5
³ H-IP ₃	ND	----
Total	2047 \pm 311	100,0 \pm 15,2

ND: no detectable.

Tabla 10. Valores de los ³H-PIs totales en el islote de Langerhans incubados a baja y alta concentración de glucosa (fmoles/islote, Media ± SEM).

TIEMPO (segundos)	0	15	30	60	300
GLUCOSA 0,5 mM n= 5	2,5 ± 0,3	2,1 ± 0,4	2,9 ± 0,7	1,6 ± 0,3	1,4 ± 0,2
GLUCOSA 16,7 Mm n= 5	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,3	2,2 ± 0,2	2,3 ± 0,3	2,6 ± 0,4

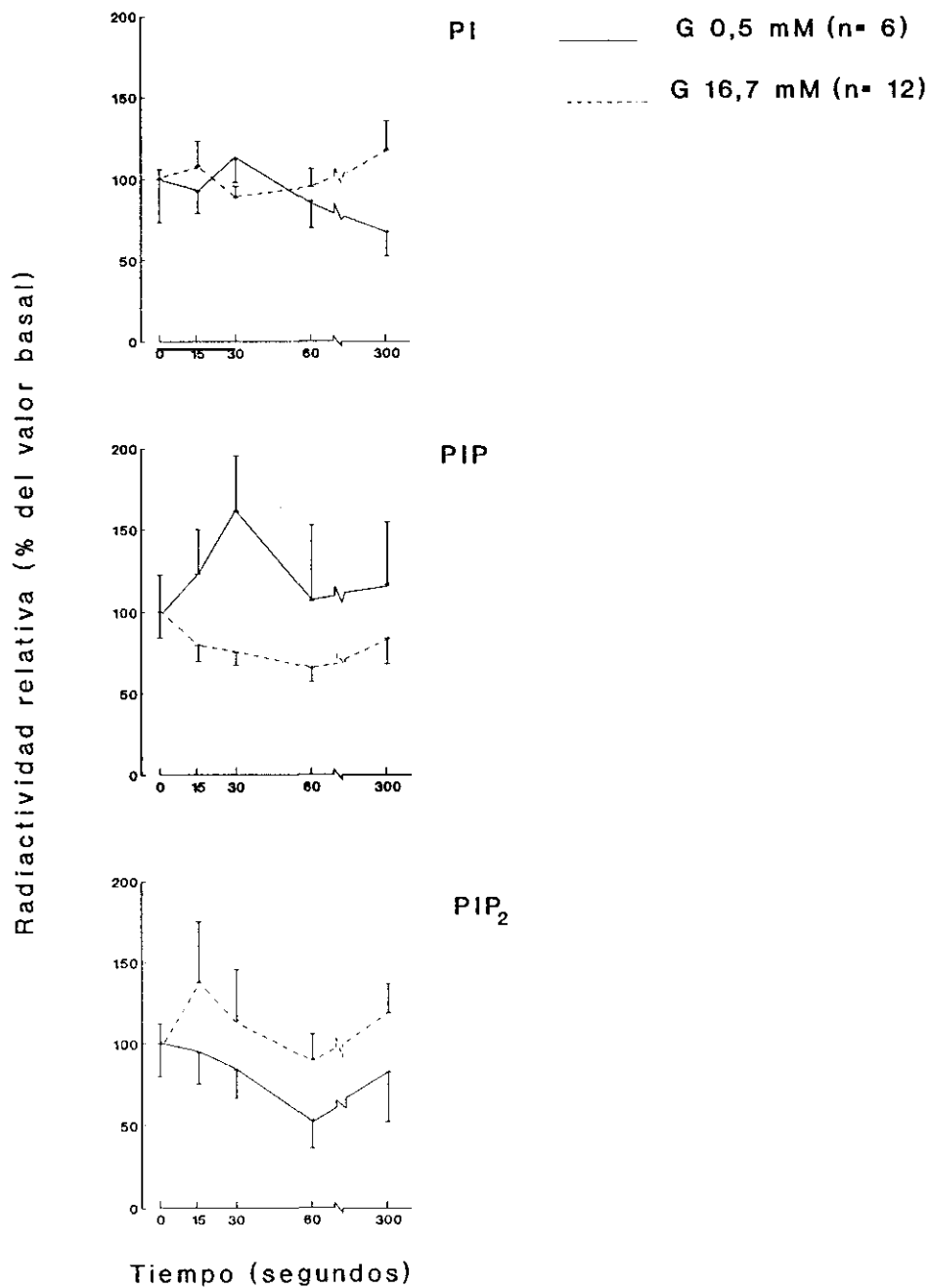


Figura 6. Valores de fosfatidilinositoles radiactivos (PI, PIP, PIP₂) originados a concentración alta (16,7 mM) o baja (0,5 mM) de glucosa, durante 0, 15, 30, 60 y 300 segundos de incubación.

glucosa 0,5 mM, son significativamente más bajos que con glucosa 16,7 mM: $1,6 \pm 0,3$ fmoles/islote y $2,3 \pm 0,3$ fmoles/islote, respectivamente, $p < 0,001$, y, $1,4 \pm 0,2$ y $2,6 \pm 0,4$, respectivamente, $p < 0,001$.

En la **figura 6**, se estudió la cinética de concentración de los distintos fosfatidilinositoles radiactivos (PI, PIP y PIP₂), inducida por glucosa 16,7 mM y 0,5 mM a lo largo de 5 minutos de incubación. Con glucosa 0,5 mM, observamos un pequeño descenso del PI a los 15 segundos, al que siguió un aumento de su valor a los 30, para descender por debajo de su valor basal (tiempo 0) a los 60 segundos y 5 minutos. Con glucosa 16,7 mM, el PI aumentó a los 15 segundos; a los 30 segundos, se observó un descenso por debajo de la basal, al que siguió un ligero aumento a los 60 segundos y 5 minutos.

En relación al PIP, se observó un aumento a los 15 segundos, mantenido hasta los 30, después de lo cual, disminuyó hasta casi el valor inicial a los 60, para detectarse un ligero aumento a los 5 minutos. Con glucosa 16,7 mM, se detectó una ligera depresión de los valores de PIP, que se mantuvo durante los primeros 60 segundos, donde a los 30 y 60 los valores fueron significativamente más bajos del basal: $75,1 \pm 7,8$ % y $100,0 \pm 15,5$ %, respectivamente, $p < 0,001$, y, $65,7 \pm 8,7$ % y $100,0 \pm 15,5$ %, respectivamente, $p < 0,001$; en el minuto 5, se detectó un aumento hasta cerca del valor basal. La diferencia entre los valores de PIP obtenidos a los 30 segundos en presencia de glucosa

16,7 mM, fueron significativamente más bajos que con glucosa 0,5 mM: $75,1 \pm 7,8 \%$ y $161,5 \pm 34,2 \%$, respectivamente, $p < 0,01$.

En el caso del PIP_2 , con glucosa 0,5 mM, se observó un descenso paulatino desde el tiempo cero hasta los 60 segundos, siendo este valor significativamente más bajo del basal: $53,1 \pm 16,5 \%$ y $100,0 \pm 19,7 \%$, respectivamente, $p < 0,02$, seguido de un aumento hasta los 5 minutos; con glucosa 16,7 mM, se produjo un aumento a los 15 segundos, para descender hasta el valor basal, a los 60 segundos, y aumentar de nuevo a los 5 minutos.

4.10.4.- EFECTO DE LA GLUCOSA SOBRE LOS ^3H -INOSITOLES FOSFATO EN EL ISLOTE DE LANGERHANS (Tabla 11 y Figura 7)

Los ^3H -IPs totales (tabla 11) determinados en la fase acuosa, sufren un aumento a los 30 segundos en presencia de glucosa 16,7 mM, descendiendo a los 60 segundos para volver a incrementarse a los 5 minutos. Con glucosa 0,5 mM, todos los valores de ^3H -IPs totales son significativamente más bajos que los obtenidos en presencia de glucosa 16,7 mM, $p < 0,001$.

En la figura 7, se observa que con glucosa 0,5 mM, el IP sufrió un descenso continuado desde el segundo 0 hasta el 60, en el islote de Langerhans, y a los 30, el valor fue significativamente más bajo del basal: $63,4 \pm 4,0 \%$ y $100,0 \pm 0,0 \%$, respectivamente, $p < 0,001$, y también a los 60 el valor fue significativamente más bajo del basal: $34,4 \pm 1,1 \%$ y $100,0 \pm 0,0 \%$, respectivamente, $p < 0,001$; en el minuto 5, se observó un

Tabla 11. Valores de los ³H-IPs totales en el islote de Langerhans incubados a baja y alta concentración de glucosa (fmoles/islote, Media ± SEM).

TIEMPO (segundos)	0	15	30	60	300
GLUCOSA 0,5 mM n= 5	1,73 ± 0,3	1,59 ± 0,3	1,42 ± 0,3	0,89 ± 0,2	1,00 ± 0,2
GLUCOSA 16,7 mM n= 5	1,74 ± 0,3	2,00 ± 0,2	2,59 ± 0,4	1,88 ± 0,3	2,24 ± 0,4

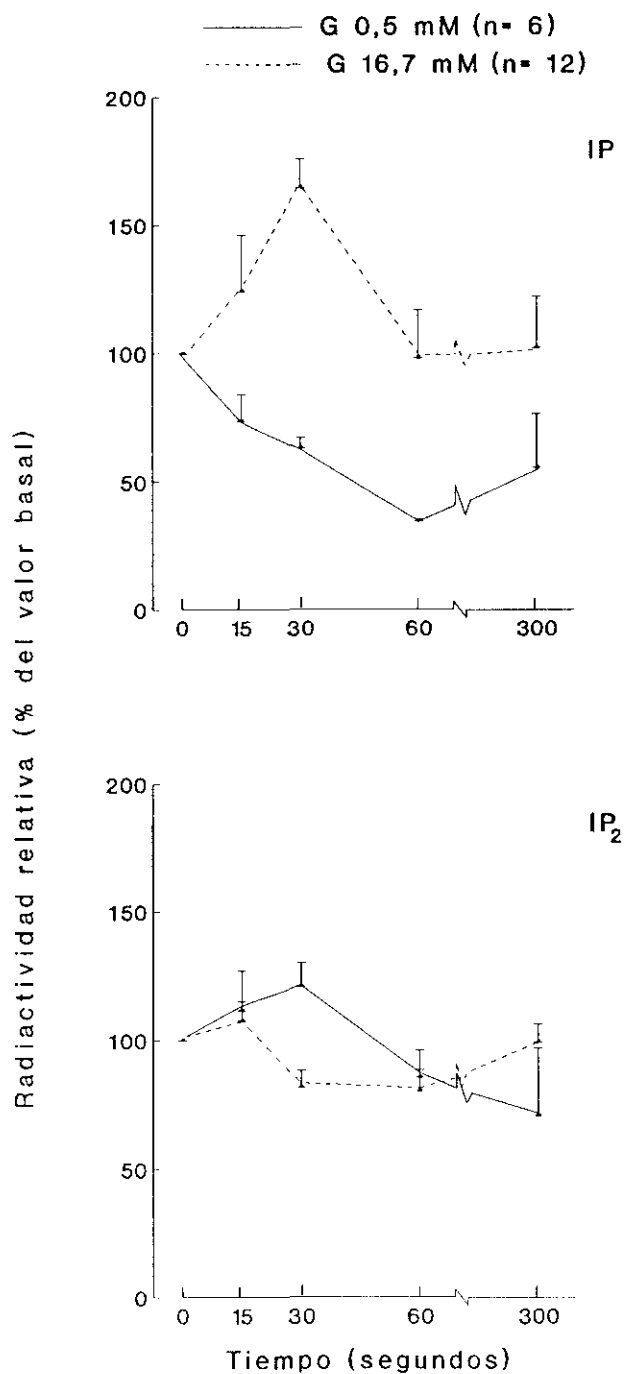


Figura 7. Valores de inositoles fosfato radiactivos (IP, IP₂), originados a alta (16,7 mM) y baja (0,5 mM) concentración de glucosa, a los 0, 15, 30, 60 y 300 segundos de incubación.

ligero aumento. Con glucosa 16,7 mM, se detectó un aumento en el segundo 15 que continuó hasta el 30, donde este valor fue significativamente más elevado (casi el doble) del basal: $164,7 \pm 11,2 \%$ y $100,0 \pm 0,0 \%$, respectivamente, $p < 0,001$; a los 60 segundos, se observó un descenso hasta el valor basal, que se mantuvo hasta los 5 minutos. A los 30 y 60 segundos, los valores de IP en presencia de glucosa 16,7 mM fueron significativamente más altos que los obtenidos con glucosa 0,5 mM: $164,7 \pm 11,2 \%$ y $63,4 \pm 4,0 \%$, respectivamente, $p < 0,001$, y, $98,3 \pm 18,6 \%$ y $34,4 \pm 1,1 \%$, respectivamente, $p < 0,02$.

En cuanto al IP₂, la glucosa 0,5 mM indujo un ligero aumento de los valores a los 15 segundos, que se mantuvo a los 30 segundos, y que después comenzó a descender a los 60, siendo este valor significativamente más bajo del basal: $85,6 \pm 2,8 \%$ y $100,0 \pm 0,0 \%$, respectivamente, $p < 0,001$, siguiendo su descenso hasta los 5 minutos. Con glucosa 16,7 mM, el IP₂ bajó a los 30 segundos, donde su valor fue significativamente más bajo del basal: $81,5 \pm 6,8\%$ y $100,0 \pm 0,0\%$, respectivamente $p < 0,02$, siguió bajando a los 60, y se recuperó a los 5 minutos. A los 30 segundos, el valor del IP₂ obtenido con glucosa 16,7 mM fue significativamente más bajo que con glucosa 0,5 mM: $81,5 \pm 6,8 \%$ y $121,1 \pm 9,2 \%$, respectivamente, $p < 0,02$.

4.11.- EFECTO DEL CALCIO SOBRE EL CICLO DE LOS FOSFATIDILINOSI- TOLES EN EL ISLOTE DE LANGERHANS

Existe un gran número de datos que sugieren que la ruptura de los fosfatidilinositales es el resultado de la unión de hormonas, neurotransmisores o cualquier otro agente que afecta la función de la célula a sus receptores específicos de membrana. Esta ruptura se produce a través de una fosfodiesterasa, denominada fosfolipasa C (PLC), específica para los fosfatidilinositales, y da lugar a productos hidrolíticos, 1,2-diacilglicerol, y una mezcla de inositales fosfato (IP , IP_2 e IP_3) que tienen gran importancia en funciones fisiológicas intracelulares, como la de activar la proteína quinasa C y la de movilizar el calcio. Ha sido propuesto que el paso inicial de la unión ligando-receptor, es la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP_2), pero no del fosfatidilinositol (PI). Se sabe que para la actividad máxima de la fosfolipasa C, específica para el fosfatidilinositol (actividad citosólica), se requiere la presencia de concentraciones de calcio del orden mM, mientras que la fosfolipasa C (actividad citosólica y de membrana) específica de polifosfatidilinositales (PIP , PIP_2), requiere concentraciones más bajas de calcio. Todavía no ha sido clarificado si la ruptura de los fosfatidilinositales es catalizada por una o varias enzimas.

Protocolo

En este estudio, se incubaron grupos de 40-50 islotes en las mismas condiciones de marcaje que en el apartado 4.10.. Para

eliminar el exceso de mio-[³H]inositol, los islotes fueron lavados 3 veces, las dos primeras, con 3 ml de medio conteniendo calcio y 1 mM mio-inositol. En este experimento no se realizó preincubación con LiCl. Seguidamente, los islotes se incubaron con 500 μ l de medio libre de calcio y con glucosa a alta (20 mM) y baja (2,8 mM) concentración, durante 0, 15, 30 y 60 segundos; se añadió entonces 1 ml de CHCl₃/CH₃OH/12 N HCl (1:2:0,0125), como mezcla extractiva, y 300 μ l de CHCl₃ y 300 μ l de 0,1 M KCl, para la formación de las fases acuosa y orgánica. La separación de los fosfatidilinositoles e inositoles fosfato se realizó como se describe en el apartado de materiales y métodos.

Resultados (Tabla 12 y figura 8)

En la tabla 12 se observa que el valor basal de ³H-PI, obtenido de islotes de Langerhans preincubados con glucosa 2,8 mM, fue considerablemente superior ($94,9 \pm 10,7\%$) a los valores basales de ³H-PIP ($1,7 \pm 0,3\%$) y ³H-PIP₂ ($3,4 \pm 1,0\%$), siendo este último el doble del valor del PIP.

De la figura 8 observamos que el ³H-PI, con glucosa 2,8 mM, bajó a los 15 segundos, aumentando a los 30 y 60 segundos. Con glucosa 20 mM, el ³H-PI bajó a los 15 segundos tras lo cual, se observó un aumento a los 30 segundos de casi el doble del valor de los 15, y un descenso a los 60 segundos.

En el caso del ³H-PIP, con glucosa 2,8 mM, se observó un pequeño aumento a los 15 segundos, una disminución a los 30 segundos y

Tabla 12. Valores basales de los fosfatidilinositoles radiactivos en el islote de Langerhans preincubado con glucosa 2,8 mM (Media \pm SEM, n= 15).

$^3\text{H-PI}_n$	amoles/islote	% del total
$^3\text{H-PI}$	10741 \pm 1210	94,9 \pm 10,7
$^3\text{H-PIP}$	190 \pm 33	1,7 \pm 0,3
$^3\text{H-PIP}_2$	383 \pm 118	3,4 \pm 1,0
Total	11314 \pm 1216	100,0 \pm 10,8

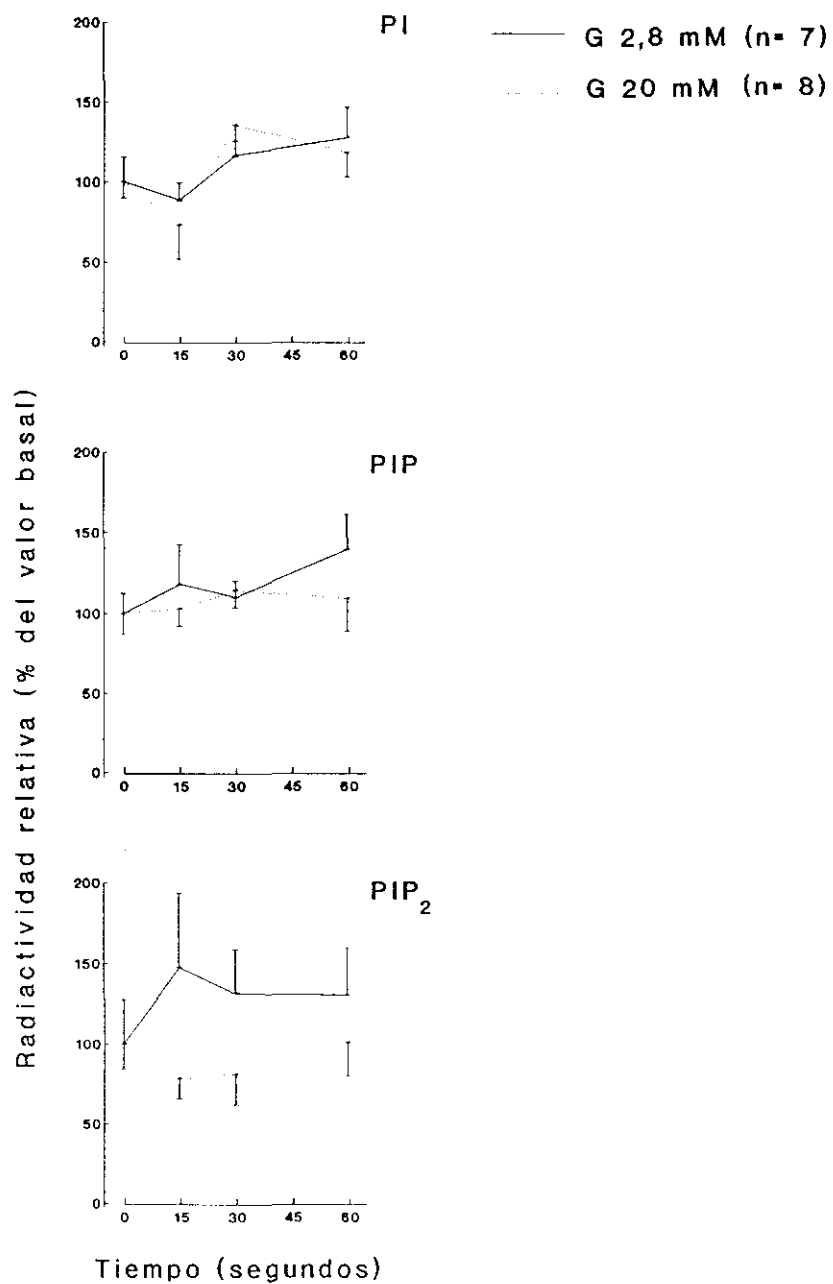


Figura 8. Valores de fosfatidilinositoles radiactivos del islote de Langerhans incubado con glucosa 20 mM y 2,8 mM, en ausencia de calcio, durante 0, 15, 30 y 60 segundos.

nuevo aumento a los 60 segundos. Con glucosa 20 mM, el ^3H -PIP apenas presentó variación a los 15 segundos, aumentó un poco a los 30 segundos para bajar de nuevo a los 60 segundos.

Con glucosa 2,8 mM, se observó un aumento de la concentración del ^3H -PIP₂ a los 15 segundos, para bajar a los 30 segundos a la mitad del valor a los 15, y hasta los 60 segundos se mantuvo sin apenas sufrir variación con respecto a los 30 segundos. En comparación con glucosa 20 mM, se vió una pequeña bajada a los 15 segundos, para subir ligeramente a los 30 y 60 segundos hasta un valor próximo al basal.

4.12.- EFECTO DE LA GLUTAMINA-LEUCINA

Se sabe que la glucosa, la leucina, la leucina en combinación con glutamina, y el monometil succinato, aumentan la formación de los inositoles fosfato (IP, IP₂, IP₃) en islotes pancreáticos, por lo tanto, el metabolismo mitocondrial es probablemente esencial para la liberación de insulina inducida por glucosa, y el metabolismo del succinato y leucina (con o sin glutamina) implica, exclusivamente, la respiración mitocondrial. Estos hechos sugieren que el metabolismo mitocondrial genera condiciones o factores que son transmitidos al citosol para aumentar la formación del inositol 1,4,5-trifosfato, y así movilizar calcio y liberar insulina.

Protocolo

Islotes, en grupos de 35-50, se marcaron con 3 μCi de mio- $[\text{}^3\text{H}]$ inositol (100 Ci/mmol) en 48 μl ($6,5 \times 10^4$ mM) de un medio de bicarbonato (pH 7,4), conteniendo sales, albúmina bovina (0,5%) y 1 mM glucosa, durante 2 y 3 horas a 37°C. Seguidamente, se lavaron con medio no radiactivo conteniendo 1 mM mio-inositol, 20 mM LiCl y sin glucosa. A continuación, los islotes se incubaron en 500 μl de medio en ausencia y presencia de glutamina (10 mM) y leucina (10 mM), a 37°C durante 30 minutos. A los islotes se les añadió 1 ml $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/12 \text{ N HCl}$ (1:2:0,0125), como mezcla extractiva. El proceso de separación de las fases acuosa y orgánica, y el de la separación de los fosfatidilinositoles e inositoles fosfato, se realizaron como se describe en el apartado de materiales y métodos.

4.12.1.- EFECTO DE LA GLUTAMINA-LEUCINA SOBRE EL METABOLISMO DE LOS FOSFATIDILINOSITOLES, EN EL ISLOTE DE LANGERHANS (Tabla 13)

En los resultados recogidos en tabla 13, podemos observar que, cuando los islotes son incubados durante 3 horas con mio- $[\text{}^3\text{H}]$ inositol, los valores de los fosfatidilinositoles radiactivos (PI, PIP y PIP_2) son considerablemente más elevados que los obtenidos en la incubación de 2 horas.

Cuando los islotes fueron preincubados durante 2 horas con mio- $[\text{}^3\text{H}]$ inositol, y posteriormente incubados en presencia de glutamina-leucina, el valor de $^3\text{H-PI}$ fue más bajo (1835 ± 290

Tabla 13. Valores de los fosfatidilinositoles radiactivos en el islote de Langerhans incubado en presencia y ausencia de glutamina-leucina (Media \pm SEM).

N	GLUTAMINA 10 mM LEUCINA 10 mM	TIEMPO minutos	³ H-PI amoles/islote	³ H-PIP amoles/islote	³ H-PIP ₂ amoles/islote
MARCAJE 2 horas					
6	----	0	2613 \pm 203	120 \pm 11	333 \pm 47
6	----	30	2966 \pm 542	38 \pm 12	364 \pm 85
6	+	30	1835 \pm 290	50 \pm 9	210 \pm 114
MARCAJE 3 horas					
6	----	0	14771 \pm 1045	202 \pm 46	208 \pm 25
6	----	30	11927 \pm 1961	59 \pm 12	112 \pm 20
6	+	30	10920 \pm 1145	38 \pm 14	79 \pm 32

amoles/islote) que el obtenido en ausencia de glutamina-leucina (2966 ± 542 amoles/islote), e incluso inferior al valor basal (2613 ± 203 amoles/islote).

El valor basal de $^3\text{H-PIP}$ en los islotes fue significativamente más alto que el obtenido tras incubación de los mismos en ausencia de glutamina-leucina: 120 ± 11 amoles/islote y 38 ± 12 amoles/islote, respectivamente, $p < 0,001$. También, el valor basal de $^3\text{H-PIP}$ fue significativamente más alto del obtenido tras la incubación de los islotes durante 30 minutos en presencia de glutamina-leucina: 120 ± 11 amoles/islote y 50 ± 9 amoles/islote, respectivamente, $p < 0,001$.

En el caso del $^3\text{H-PIP}_2$, el valor basal (333 ± 47 amoles/islote) fue más bajo que el obtenido tras incubación en ausencia de glutamina-leucina (364 ± 85 amoles/islote), y este valor, a su vez, fue más alto que el obtenido en presencia de glutamina-leucina (210 ± 114 amoles/islote).

Cuando la incubación con mio- ^3H inositol fue de 3 horas, el valor basal de $^3\text{H-PI}$ (14771 ± 1045 amoles/islote) fue más elevado que el obtenido tras la incubación de 30 minutos en ausencia de glutamina-leucina (11927 ± 1961 amoles/islote), y, a su vez, el valor basal de $^3\text{H-PI}$ fue significativamente más alto que el obtenido en presencia de glutamina-leucina: 14771 ± 1045 amoles/islote y 10920 ± 1145 amoles/islote, respectivamente, $p < 0,02$.

El valor de $^3\text{H-PIP}$ basal fue significativamente más alto del obtenido tras incubación de 30 minutos en ausencia de glutamina-leucina: 202 ± 46 amoles/islote y 59 ± 12 amoles/islote, respectivamente, $p < 0,01$, y, también, fue significativamente más alto que el valor de $^3\text{H-PIP}$ obtenido en presencia de glutamina-leucina (38 ± 14 amoles/islote, $p < 0,001$).

El valor de $^3\text{H-PIP}_2$ basal fue significativamente más alto que el obtenido tras incubación en ausencia de glutamina-leucina (30 minutos): 208 ± 25 amoles/islote y 112 ± 20 amoles/islote, respectivamente, $p < 0,01$, y, también, fue significativamente más alto del valor obtenido en presencia de glutamina-leucina: 79 ± 32 amoles/islote, $p < 0,01$.

4.12.2.- EFECTO DE LA GLUTAMINA-LEUCINA SOBRE LA FORMACION DE INOSITOLES FOSFATO EN EL ISLOTE DE LANGERHANS (Tabla 14)

En el marcaje de islotes durante 2 horas con mio- ^3H inositol, el valor de $^3\text{H-IP}$ obtenido cuando los islotes fueron incubados 30 minutos en ausencia de glutamina-leucina (2628 ± 516 amoles/islote), fue mayor al obtenido en presencia de glutamina-leucina (2150 ± 392 amoles/islote). El valor basal de $^3\text{H-IP}$ fue significativamente superior al obtenido en presencia de glutamina-leucina: 3593 amoles/islote, $p < 0,01$.

El valor de $^3\text{H-IP}_2$, tras una incubación de 30 minutos con glutamina-leucina (476 ± 112 amoles/islote), fue más alto que cuando los islotes fueron incubados en ausencia de glutamina-

Tabla 14. Valores de los inositoles fosfato radiactivos en el islote de Langerhans incubado en presencia y ausencia de glutamina-leucina (Media \pm SEM).

N	GLUTAMINA (10 mM) LEUCINA (10 mM)	TIEMPO minutos	³ H-IP amoles/islote	³ H-IP ₂ amoles/islote	³ H-IP ₃ amoles/islote
MARCAJE 2 horas					
1	----	0	3593	135	----
6	----	30	2628 \pm 516	386 \pm 20	----
6	+	30	2150 \pm 392	476 \pm 112	9 \pm 0
MARCAJE 3 horas					
4	----	0	6010 \pm 385	116 \pm 1	----
6	----	30	3227 \pm 709	176 \pm 26	----
6	+	30	3030 \pm 201	352 \pm 35	----

leucina (386 ± 20 amoles/islote). El valor basal de $^3\text{H-IP}_2$ fue significativamente más bajo que el obtenido en la ausencia de glutamina-leucina: 135 amoles/islote y 386 ± 20 amoles/islote, respectivamente, $p < 0,001$. También el valor basal de $^3\text{H-IP}_2$ fue significativamente más bajo que tras la incubación de 30 minutos en presencia de glutamina-leucina: 135 amoles/islote y 476 ± 112 amoles/islote, respectivamente, $p < 0,02$.

Cuando el marcaje con mio- ^3H inositol fue de 3 horas, el valor basal de $^3\text{H-IP}$ fue significativamente más alto que cuando los islotes fueron incubados 30 minutos en ausencia de glutamina-leucina: 6010 ± 385 amoles/islote y 3227 ± 709 amoles/islote, respectivamente, $p < 0,01$, y, también, éste fue significativamente más alto del valor de $^3\text{H-IP}$ obtenido a los 30 minutos de incubación en presencia de glutamina-leucina: 3030 ± 201 , $p < 0,001$.

El valor basal de $^3\text{H-IP}_2$ obtenido en los islotes fue significativamente menor después de 30 minutos de incubación en presencia de glutamina-leucina: 116 ± 1 amoles/islote y 352 ± 35 amoles/islote, respectivamente, $p < 0,001$. Tras 30 minutos de incubación en ausencia de glutamina-leucina, el valor de $^3\text{H-IP}_2$ fue significativamente menor al obtenido en presencia de glutamina-leucina: 176 ± 26 amoles/islote, $p < 0,001$.

4.12.3.- VALORES DE LOS INOSITOLES FOSFATO TRITIADOS ($^3\text{H-IP}_3$) LIBERADOS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE GLUTAMINA-LEUCINA, EN EL ISLOTE DE LANGERHANS MARCADO CON MIO- ^3H INOSITOL (Tabla 15)

En el medio correspondiente a la incubación de islotes pancreáticos, incubados durante 30 minutos en presencia y ausencia de glutamina-leucina, se determinó el contenido de $^3\text{H-IP}_3$ por cromatografía líquida de alta resolución.

El valor del $^3\text{H-IP}$ liberado tras la incubación en presencia de glutamina-leucina fue significativamente más bajo que el obtenido en ausencia de los mismos aminoácidos: 504 ± 84 amoles/islote y 966 ± 85 amoles/islote, respectivamente, $p < 0,001$. Igualmente, el valor del $^3\text{H-IP}$ obtenido tras incubación en presencia de glutamina-leucina, fue significativamente más alto que el valor basal: 504 ± 84 amoles/islote y 23 ± 4 amoles/islote, respectivamente, $p < 0,001$, y el valor obtenido en ausencia de glutamina-leucina, fue también significativamente más alto que el basal: 966 ± 85 amoles/islote, $p < 0,001$.

En el caso del $^3\text{H-IP}_2$, el valor obtenido en presencia de glutamina-leucina (52 ± 5 amoles/islote) fue más bajo que el obtenido en ausencia de glutamina-leucina (77 ± 11 amoles/islote). Sin embargo, el de $^3\text{H-IP}_2$ basal (107 ± 30 amoles/islote) fue más alto que el obtenido en ausencia de glutamina-leucina.

El $^3\text{H-IP}_3$ fue detectable en el medio de incubación aunque en

Tabla 15. Valores de inositoles fosfato radiactivos, en el medio de incubación del islote de Langerhans, en presencia y ausencia de glutamina-leucina durante 30 minutos, y determinados por cromatografía líquida de alta resolución, HPLC (Media \pm SEM, n= 6).

	$^3\text{H-IP}$ amoles/islote	$^3\text{H-IP}_2$ amoles/islote	$^3\text{H-IP}_3$ amoles/islote
CON GLUTAMINA-LEUCINA	504 \pm 84	52 \pm 5	16
SIN GLUTAMINA-LEUCINA	966 \pm 85	77 \pm 11	14
SIN INCUBAR	23 \pm 4	107 \pm 30	----

pequeña cantidad, y los valores del mismo, no sufrieron modificación tras la incubación en ausencia y presencia de glutamina-leucina. El $^3\text{H-IP}_3$ en condiciones basales fue indetectable.

4.12.4.- PORCENTAJES DE LOS FOSFATIDILINOSITOLES E INOSITOLES FOSFATO RADIATIVOS, TRAS INCUBACION CON GLUTAMINA-LEUCINA, EN EL ISLOTE DE LANGERHANS (Tablas 16 y 17)

En la **tabla 16** observamos que el porcentaje de $^3\text{H-PI}$ ($97,1 \pm 16,4$ %) obtenido en ausencia de glutamina-leucina (incubación 30 minutos) respecto al valor basal, fue más del doble del de $^3\text{H-PIP}$ ($30,5 \pm 1,3$ %), y ligeramente más alto del de $^3\text{H-PIP}_2$ ($81,6 \pm 27,8$ %). En cuanto a los inositoles fosfato (**tabla 17**), el porcentaje de $^3\text{H-IP}$ ($63,4 \pm 9,7$ %), obtenido en las condiciones anteriores, fue considerablemente inferior al de $^3\text{H-IP}_2$ ($218,8 \pm 67,1$ %).

Tras la incubación de 30 minutos en presencia de glutamina-leucina (**tabla 16**), el porcentaje de $^3\text{H-PI}$ ($72,1 \pm 1,9$ %) respecto al valor basal, fue más del doble del de $^3\text{H-PIP}$ ($30,3 \pm 11,5$ %) y un poco más elevado del $^3\text{H-PIP}_2$ ($50,6 \pm 12,6$ %). Con respecto a los inositoles fosfato (**tabla 17**), el porcentaje de $^3\text{H-IP}$ ($35,1 \pm 4,7$ %) fue muy inferior al del IP_2 ($328,0 \pm 38,4$).

En la **tabla 16**, el porcentaje de $^3\text{H-PI}$ obtenido en presencia de glutamina-leucina, respecto a la incubación en ausencia de glutamina-leucina fue menor ($76,8 \pm 14,9$ %) que el de $^3\text{H-PIP}$ ($98,0$

Tabla 16. Porcentajes de los fosfatidilinositoles radiactivos en islotes de Langerhans, incubados en presencia y ausencia de glutamina-leucina (Media \pm SEM, n= 2).

	$^3\text{H-PI}$ (%)	$^3\text{H-PIP}$ (%)	$^3\text{H-PIP}_2$ (%)
A	97,1 \pm 16,4	30,5 \pm 1,3	81,6 \pm 27,8
B	72,1 \pm 1,9	30,3 \pm 11,5	50,6 \pm 12,6
C	76,8 \pm 14,9	98,0 \pm 33,6	64,1 \pm 6,4

Tabla 17. Porcentajes de los inositoles fosfato radiactivos en islotes de Langerhans, incubados en presencia y ausencia de glutamina-leucina (Media \pm SEM, n= 2).

	$^3\text{H-IP}$	$^3\text{H-IP}_2$
A	63,4 \pm 9,7	218,8 \pm 67,1
B	35,1 \pm 4,7	328,0 \pm 38,4
C	87,9 \pm 6,1	161,7 \pm 38,4

A: Incubación de 30 minutos en ausencia de glutamina-leucina, respecto a la basal.

B: Incubación de 30 minutos en presencia de glutamina-leucina respecto a la basal.

C: Incubación 30 minutos en presencia de glutamina-leucina, respecto a incubación 30 minutos en ausencia de glutamina-leucina.

$\pm 33,6 \%$), y más elevado del $^3\text{H-PIP}_2$ ($64,1 \pm 6,4 \%$). En estas mismas condiciones (tabla 17), el porcentaje para el $^3\text{H-IP}$ ($87,9 \pm 6,1 \%$) fue prácticamente la mitad del $^3\text{H-IP}_2$ ($161,7 \pm 38,4 \%$).

4.13.- PRESENCIA DE GPIs EN EL ISLOTE DE LANGERHANS Y SU MODULACION POR INSULINA E IGF-1

Las moléculas del tipo glicosil-fosfatidilinositol, denominadas GPIs, tienen importantes funciones celulares. Entre ellas destaca su posible participación como segundos mensajeros de la acción hormonal, así como servir de anclaje en las membranas para proteínas con diversas acciones biológicas.

Tanto la insulina, como el IGF-1, y otras hormonas y factores de crecimiento, son capaces de inducir, en sus moléculas diana, la hidrólisis de los GPIs, liberando su parte polar, un inositol fosfoglicano, denominado IPG. En uno de los modelos descritos, el GPI hepático estaría compuesto por una parte lipídica y por una estructura polar, o IPG, formada por inositol, glucosamina y 3-4 galactosas con 2-3 grupos fosfato.

El IPG, aislado del hígado de rata, inhibe la secreción de insulina y la conversión de proinsulina en insulina. En células pancreáticas tumorales de la línea RINm5F se han caracterizado parcialmente dos posibles GPIs.

Protocolo

En este estudio, incubamos grupos de 100 islotes con 7,7 μ Ci de mio-[³H]inositol (100 Ci/mmol) en 100 μ l de un medio de bicarbonato (pH 7,4), conteniendo sales, albúmina bovina (0,5 %) y 1 mM glucosa, durante 2 horas a 37°C. Tras una preincubación con glucosa 16,7 mM durante 20 minutos a 37°C en 500 μ l del medio bicarbonatado, se realizó una incubación durante 0, 15, 30, ó 300 segundos, a 37°C, en 1 ml del mismo medio bicarbonatado, en ausencia y presencia de insulina (20 nM) o IGF-1 (20 nM). La reacción se interrumpió con 1 ml de 10 % TCA.

La determinación de GPIs se realizó como se describe en el punto 3.2.9 del apartado de materiales y métodos.

Las bandas, previamente identificadas por autorradiografía, se extrajeron por raspado, y su radiactividad se determinó en un contador β .

4.13.1.- PRESENCIA DE DOS GPIs EN EL ISLOTE DE LANGERHANS (Figura 9)

La incubación de los islotes pancreáticos durante 2 horas en presencia de inositol radiactivo, permitió marcar diferentes lípidos. En el sistema de purificación de los GPIs, se realizó una primera cromatografía en solventes ácidos que separó el fosfatidilinositol (PI) del resto de los lípidos. El origen del carril en el que se aplicó el extracto orgánico de los islotes, se desarrolló en una segunda cromatografía con solvente básico,

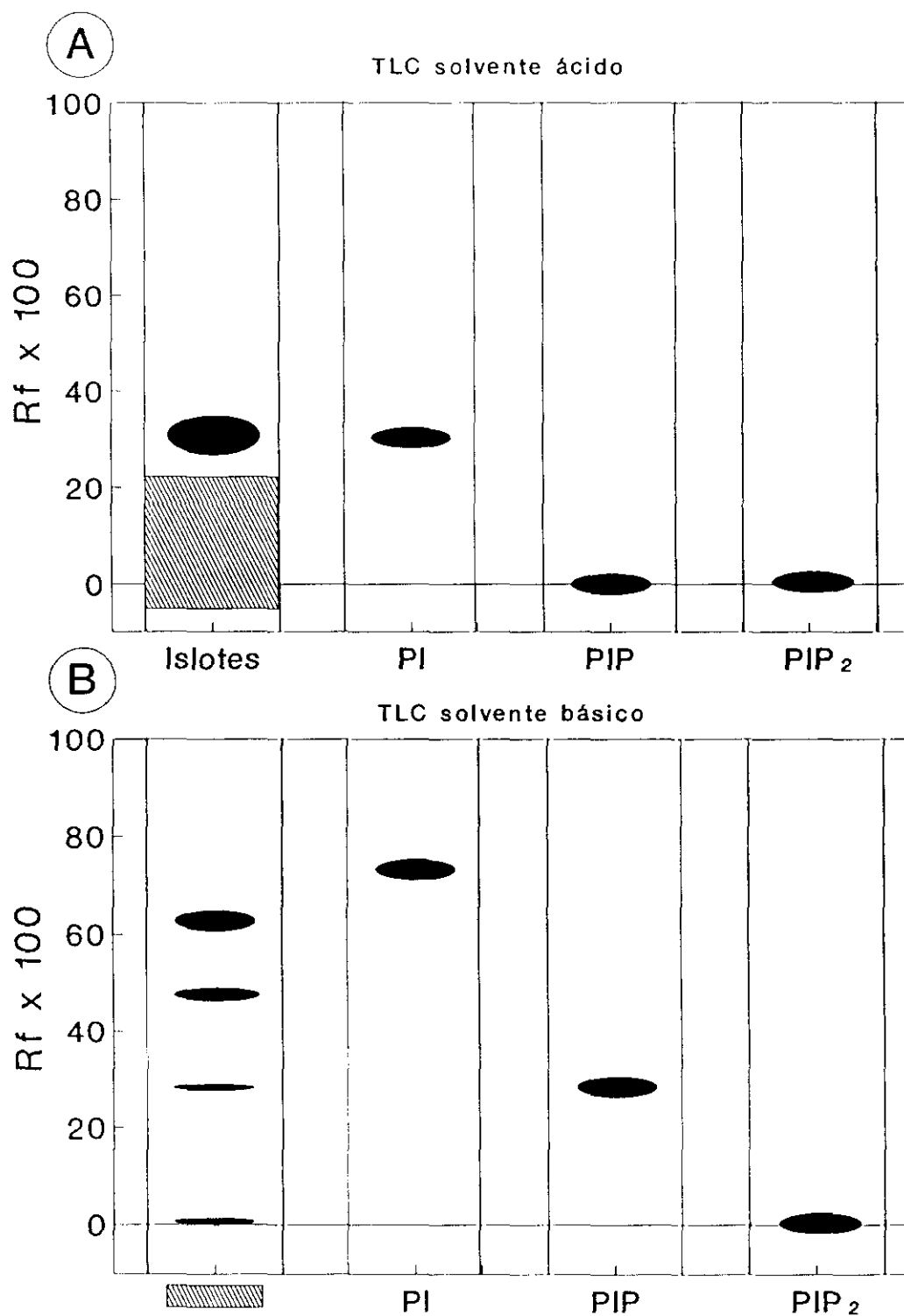


Figura 9. Esquema de separación por cromatografía en capa fina (TLC) de los lípidos que contienen mio-inositol tritiado.

con lo que se diferenciaron dos bandas distintas a las del PI, PIP o PIP₂, y que identificamos como bandas I (R_f 0,64) y II (R_f 0,49).

4.13.2.- EFECTO DE LA INSULINA (Figura 10)

En la figura 10 se observa el efecto que tiene, sobre los niveles de GPIs, la insulina 20 nM añadida a islotes previamente marcados con inositol y preincubados en un medio con glucosa 16,7 mM durante 20 minutos. Respecto al control, la insulina indujo un descenso en los niveles de GPIs, tanto en la banda I como en la banda II. En los islotes control, la banda II aumentó a los 30 segundos.

4.13.3.- EFECTO DEL IGF-1 (Figura 11)

El IGF-1, 20 nM, produjo un descenso más acusado que la insulina en los niveles de GPIs, tanto en la banda I como en la banda II; ya a los 15 segundos se alcanzaron niveles que permanecieron disminuidos durante todo el tiempo de incubación (5 minutos).

4.13.4.- EFECTO DE LA GLUCOSA SOBRE LA FORMACION DE GPIs (Tabla 18)

En esta tabla 18 se muestra el efecto de la de glucosa sobre los niveles de GPIs, tras 2 minutos de incubación. En presencia de glucosa 2,8 mM, tanto la banda I como la II aumentaron ligeramente, y ambas bandas disminuyeron en un 40-70 % en

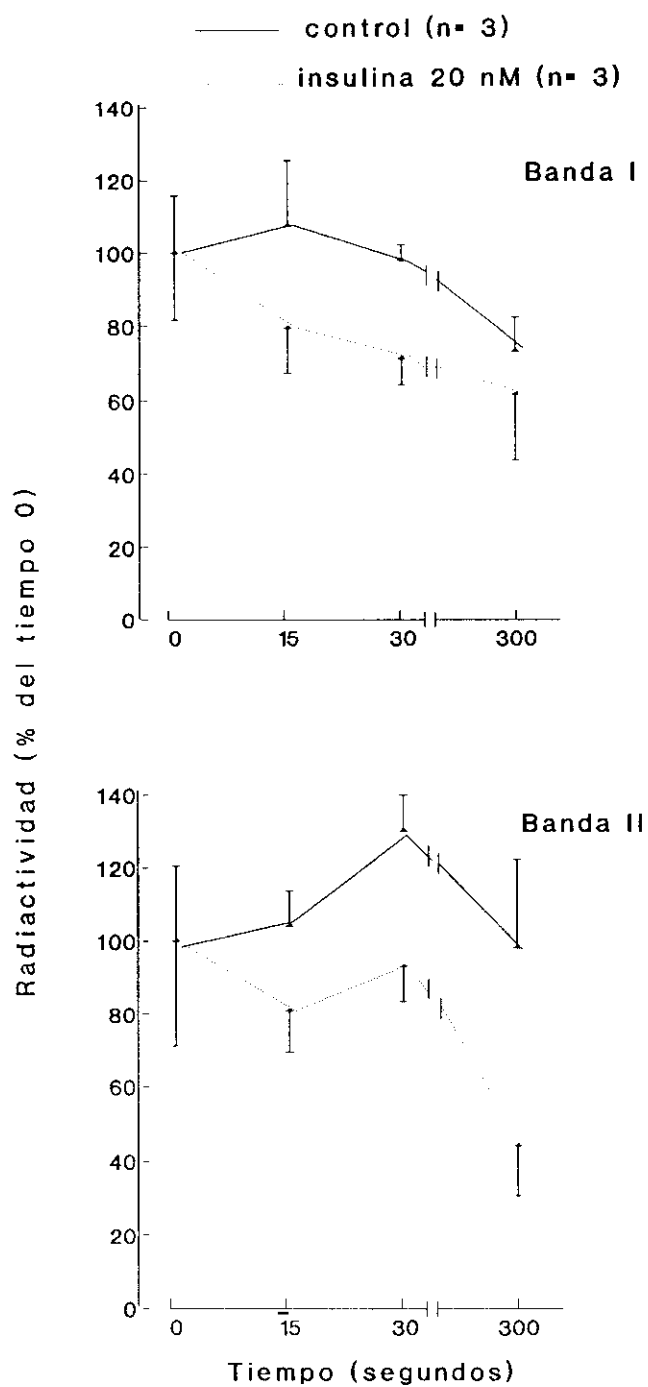


Figura 10. Valores de GPIs tritiados (bandas I y II), a los 0, 15, 30 y 300 segundos de incubación con 20 nM insulina.

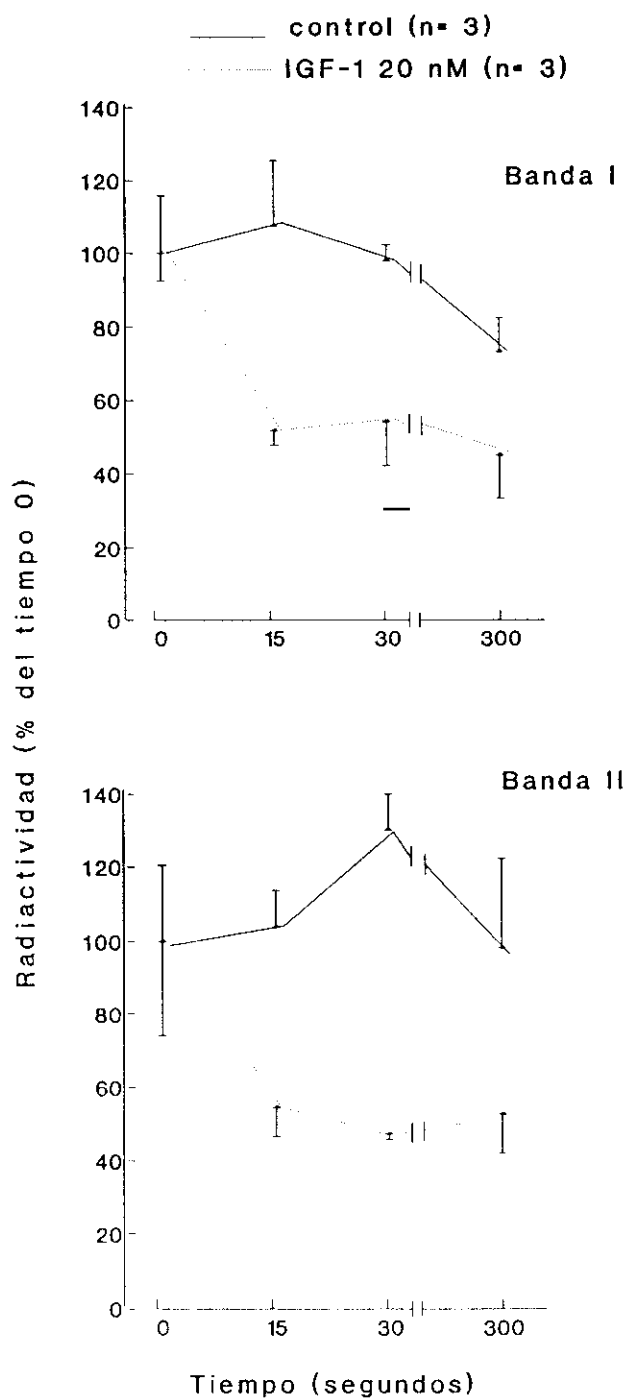


Figura 11. Valores de GPIs tritiados (bandas I y II), a los 0, 15, 30 y 300 segundos de incubación con 20 nM IGF-1.

Tabla 18. Niveles de GPIs tritiados en islotes pancreáticos incubados 2 minutos en presencia de glucosa 2,8 mM y 16,7 mM, respecto al control tiempo 0 ($100,0 \pm 8,8\%$). Media \pm SEM, n= 3.

GLUCOSA	BANDA I	BANDA II
2,8 mM	116,8 \pm 24,7	127,7 \pm 41,1
16,7 mM	77,8 \pm 23,5	60,1 \pm 18,2

presencia de glucosa 16,7 mM.

Estos datos sugieren que la propia insulina, liberada por el islote en presencia de glucosa 16,7 mM, puede inducir una disminución en los niveles de GPIs.

5.- DISCUSION

El fenómeno de adsorción de diversas sustancias al material de laboratorio, vidrio o plástico, es conocido, y depende de la concentración de la sustancia y de las características del medio en que está disuelta (78, 79).

En este trabajo, se trató, inicialmente, de conocer el material idóneo para evitar pérdidas por adhesión al material correspondiente de los fosfatidilinositoles, durante el trasvase de las muestras, y se observó que tanto el $^3\text{H-PI}$ como los polifosfatidilinositoles ($^3\text{H-PIP}$ y $^3\text{H-PIP}_2$), se adhieren más al tubo de vidrio siliconizado que al tubo Eppendorf de polietileno, mientras que los capilares de vidrio retenían un porcentaje menor de los fosfatidilinositoles radiactivos que las puntas dispensadoras de polipropileno. Consecuentemente, el material de trabajo se limitó a tubos Eppendorf y a pipetas dispensadoras con capilares de vidrio (SMI).

En la puesta a punto del método para cuantificar los fosfatidilinositoles e inositoles fosfato radiactivos, se controló la recuperación de los mismos, utilizando patrones radiactivos a lo largo de todo el proceso. Para la extracción de ambos, se eligieron las condiciones óptimas que proporcionaran cerca de un 100 % de recuperación. La recuperación final de los fosfatidilinositoles dependería también del método de su aislamiento de las placas de cromatografía y del líquido de

centelleo utilizado para la medida de la radiactividad, observándose la necesidad de su extracción del gel de sílice con metanol durante dos horas, y del uso del líquido de centelleo Cocktail 22, para obtener el 100 % de recuperación de la radiactividad correspondiente a los patrones que, simulando una autorradiografía, se habían puesto previamente en contacto con el gel de sílice, durante una hora.

De todas formas, la recuperación tras la TLC, utilizando la fase móvil que mejor los separa entre sí, y en las condiciones de aislamiento y contaje idóneas según la cromatografía simulada, fue inferior al 100 % para los tres tipos de PIs: alrededor del 90 % para el ^3H -PI, y del 35 % para los polifosfatidilinosítoles. Estos resultados, que no dependían de que la placa de gel fuera sometida a los pasos necesarios para la autorradiografía (tratamiento con un amplificador de la señal, y siete días de exposición a -70°C), fueron tomadas en cuenta para el cálculo final de los fosfatidilinosítoles radiactivos endógenos. En algunos trabajos (81) estudian solamente la recuperación del ^3H -PI, y asumen que la de los polifosfatidilinosítoles es la misma, con lo cual podrían estar infravalorando las concentraciones de los polifosfatidilinosítoles.

El sistema de HPLC utilizado para determinar los ^3H -IPs fue efectivo para aislar los tres patrones utilizados, ^3H -IP, ^3H -IP₂ e ^3H -IP₃; sin embargo, la recuperación de cada uno de ellos no fue total, siendo el ^3H -IP₃ el menos recuperado (32%). Como

consecuencia, tuvo que tenerse en cuenta la recuperación de cada uno de ellos para la cuantificación de los mismos en las muestras.

Los valores obtenidos de los distintos fosfatidilinositoles radiactivos en los islotes de Langerhans, tras dos horas de incubación con mio-[^3H]inositol en presencia de concentración baja de glucosa (1 mM) y posterior incubación (20 minutos) en presencia de LiCl (20 mM), que impide la resíntesis de los mismos por inhibición del paso de ^3H -IP a mio-[^3H]inositol, confirman la mayor abundancia del ^3H -PI sobre los polifosfatidilinositoles radiactivos (80, 81).

En cuanto a los valores de los ^3H -IPs obtenidos en estas condiciones, se observa una mayor proporción de ^3H -IP que de ^3H -IP₂. El ^3H -IP₃ no se detecta. En trabajos previos (81, 82, 55, 57), el porcentaje del ^3H -IP₃ es siempre muy pequeño en relación con el ^3H -IP y el ^3H -IP₂, siendo siempre mayoritario el ^3H -IP.

La posterior incubación de estos islotes a concentraciones alta y baja de glucosa, produce modificaciones inmediatas de los polifosfatidilinositoles, con una tendencia a aumentar la concentración relativa del ^3H -PIP₂ sobre la del ^3H -PIP en los primeros 30 segundos de exposición a alta concentración glucosa (16,7 mM), observándose el fenómeno contrario a concentración baja de glucosa. El aumento relativo del ^3H -PIP₂ a los 15 y 30 segundos de la estimulación de la célula β por concentración alta

de glucosa es indicativo de una activación de los procesos de fosforilación que convierten el $^3\text{H-PI}$ en $^3\text{H-PIP}$ y a éste en $^3\text{H-PIP}_2$, lo cual podría no detectarse en toda su magnitud debido a la hidrólisis de los $^3\text{H-PIs}$ y a la formación de $^3\text{H-IPs}$. De hecho, en la valoración de los $^3\text{H-IPs}$ totales, se detecta un aumento significativo ya a los 15 segundos, alcanzando su máximo valor a los 30 segundos.

En el estudio de los distintos $^3\text{H-IPs}$ formados, se observa, fundamentalmente, un aumento del $^3\text{H-IP}$ debido al hecho de que el $^3\text{H-IP}_3$ no se recupera en cantidades apreciable y, por tanto, no se observan variaciones de este compuesto. En trabajos previos (55, 81, 56), se detectó un pequeño aumento del $^3\text{H-IP}_3$ en respuesta a la glucosa.

Dado que la respuesta descrita para la glutamina-leucina (84) era más potente, realizamos unos experimentos en presencia de estos aminoácidos. Como resultado, no observamos un mayor incremento del $^3\text{H-IP}_3$.

En ausencia de calcio extracelular, la hidrólisis del fosfatidilinositol está impedida debido a que la fosfolipasa C específica del PI requiere unas concentraciones de Ca^{2+} del orden mM (85). Sin embargo, en presencia de glucosa 2,8 mM, se produce un descenso del $^3\text{H-PI}$ a los 15 segundos acompañado de un aumento del $^3\text{H-PIP}$, y este aumento es incluso más marcado que el del $^3\text{H-PIP}_2$, sugiriendo ello, por tanto, que el paso de $^3\text{H-PI}$ a $^3\text{H-PIP}$

y de éste a $^3\text{H-PIP}_2$, por acción de las quinasas, no está inhibido en ausencia de calcio extracelular (86).

La presencia de altas concentraciones de glucosa, en estas condiciones, no parece impedir la hidrólisis del $^3\text{H-PIP}_2$ a expensas de la activación de la fosfolipasa C específica de los polifosfatidilinositoles, que sólo requiere pequeñas concentraciones de calcio (85) que pudieran estar, todavía, presentes en la célula. En estos experimentos no se determinó el contenido de $^3\text{H-IPs}$, si bien Blachier y Malaisse (87), en un estudio hecho con islotes incubados en las mismas condiciones que las nuestras, encuentran, a alta concentración de glucosa, un ligero aumento de los $^3\text{H-IPs}$.

En contraste con estos resultados, hay otros trabajos (49, 19, 52) que documentan que la ausencia de Ca^{2+} extracelular, bien por quelantes como el EGTA, o por bloqueantes de los canales de Ca^{2+} , como el verapamil, produce una inhibición de la hidrólisis de los fosfatidilinositoles estimulada por glucosa. Así mismo, también se ha documentado que el metabolismo de los inositoles fosfato es independiente de Ca^{2+} (49), exceptuando el paso de inositol 1,4,5-trifosfato a inositol 1,3,4,5-tetrafosfato, por ser la quinasa responsable de esta reacción dependiente de Ca^{2+} (49).

Sin embargo, esta dependencia del Ca^{2+} para que la glucosa ejerza su acción de hidrólisis sobre los fosfatidilinositoles, no es compartida por el agonista muscarínico acetilcolina, el cual es

capaz de hidrolizar los fosfatidilinositoles en ausencia de Ca^{2+} extracelular (47). Este hecho es coherente con las observaciones en membranas plasmáticas de células β , donde se ha observado que la ocupación del receptor muscarínico coincide con una activación directa de la fosfolipasa C (50).

Es de resaltar el hecho de que en condiciones de falta de calcio extracelular, la secreción de insulina inducida por glucosa está inhibida (40). El que la hidrólisis de los ^3H -PIs no vaya acompañada de un aumento de la secreción de insulina, puede producirse en otras situaciones (88). La relación entre la hidrólisis de los fosfatidilinositoles con la secreción de insulina no está totalmente aclarada; se cree que los productos hidrolíticos diacilglicerol, activando la proteína quinasa C y el inositol 1,4,5-trifosfato, movilizándolo el calcio del retículo endoplasmático, contribuirían al proceso de secreción de insulina (81). También en este mismo trabajo, y respaldando la teoría anterior, se ha observado que, de los tres inositoles fosfato (^3H -IP, ^3H -IP₂ e ^3H -IP₃), sólo el ^3H -IP₃ es capaz de inducir secreción de insulina.

La disminución de los niveles del glicosilfosfatidilinositol radiactivo son indicativos de la hidrólisis de estos compuestos que dan lugar al inositolfosfoglicano, propuesto como segundo mensajero de la acción de la insulina (66). La estructura molecular de este posible mensajero no es del todo conocida, si bien se apunta que, en hígado, y en otros tejidos, el inositol

que lo constituye está en su forma chiro (68). De todas formas, en células del islote de rata, que en su 90 % corresponden a células β productoras de insulina, al incubarlas con mio-[^3H]inositol, se marcan dos GPIs, como lo hacen la galactosa y la glucosamina (67, 68), azúcares considerados constituyentes de la molécula del precursor del IPG mensajero.

Al exponer estos islotes, previamente incubados con mio-[^3H]inositol, a insulina 20 mM, se observó una disminución de los dos posibles GPIs, evidente ya a los 30 segundos. Cuando los islotes previamente incubados con el inositol marcado se exponen a una concentración alta de glucosa (16,7 mM), los GPIs radiactivos disminuyen alrededor del 50 % de su valor basal a los 5 minutos, momento en que la secreción de insulina al medio está ya aumentada. Estos hallazgos, unidos a trabajos previos que documentan que el IPG inhibe la secreción y síntesis de insulina en islotes aislados de rata (73, 75), corroboran la tesis de que la insulina inhibe su propia secreción (89), y que este efecto directo estaría mediado por el IPG, producto de la hidrólisis de los GPIs presentes en las células del islote.

No está claro, sin embargo, la presencia de receptores de insulina en la célula β , aunque ésta bien podría actuar a través de receptores para el IGF-1 (90). De hecho, la incubación de estos islotes con IGF-1 a una concentración de 20 mM, produce una disminución también inmediata, y tal vez más llamativa, de los niveles de GPIs radiactivos.

6.- CONCLUSIONES

- La glucosa induce un cambio inmediato en la síntesis "de novo" de los polifosfatidilinosítoles (PIP y PIP₂), produciendo un aumento relativo del PIP₂ y un aumento de los IPs totales.
- A concentraciones basales de glucosa, la ausencia de Ca²⁺ extracelular no inhibe la fosforilación del PI, y aumenta la concentración relativa del ³H-PIP y del ³H-PIP₂. A concentraciones altas de glucosa, la hidrólisis del ³H-PIP₂ no parece tampoco estar abolida.
- La producción de ³H-IPs no siempre está relacionada con la secreción de insulina.
- La insulina en el medio de incubación ejerce un efecto directo sobre la hidrólisis de los GPIs del islote pancreático, similares al precursor del IPG propuesto como mediador de la acción de la insulina.
- La presencia de alta concentración de glucosa en el medio de incubación tiene el mismo efecto anterior, producido, sin duda, por la insulina secretada.
- Aún es tema de controversia la presencia de receptores específicos de insulina en la célula β, sin embargo, su

facultad de generar el mediador podría estar mediada por receptores específicos para el IGF-1; de hecho, el IGF-1 es más potente que la insulina en la hidrólisis de los GPIs.

- Puesto que se conoce que el IPG inhibe la secreción y síntesis de insulina, estos hallazgos explicarían la acción inhibitoria directa de la insulina sobre su propia secreción.

7.- BIBLIOGRAFIA

1. Hokin, M. R., and Hokin, L.E.: Enzyme secretion and the incorporation of ^{32}P into phospholipids of pancreas slices. *J. Biol. Chem.* 203: 967-977, 1953.
2. Michell, R.H.: Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta* 415: 81-147, 1975.
3. Hawthorne, J.N., and Pickard, M.R.: Phospholipids in synaptic function. *J. Neurochem.* 32: 5-14, 1979.
4. Hokin, L.E.: Receptors and phosphoinositide-generated second messengers. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 205-235, 1985.
5. Berridge, M. J., and Irvine, R. F.: Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312: 315-321, 1984.
6. Nishizuka, Y.: The role of protein Kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308: 693-698, 1984.
7. Rhee, S.G., Suh, P.G., Ryu, S.H., and Lee, S.Y.: Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science* 244: 546-550, 1989.
8. Stahl, M.L., Ferez, C.R., Kelleher, K.L., Driz, R.W., and Knopf, J.L.: Sequence similarity of phospholipase C with the non-catalytic region of src. *Nature* 332: 269-272, 1988.
9. Lips, D.L., Majerus, P.W., Gorga, F.R., Young, A.T., and Benjamin, T.L.: Phosphatidylinositol 3-phosphate is present in normal and transformed fibroblasts and is resistant to hydrolysis by bovine brain phospholipase C II. *J. Biol. Chem.* 264: 8759-8763, 1989.
10. Irvine, R.F., Letcher, A.J., and Dawson, R.M.C.: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase and phosphomonoesterase activities of rat brain. *Biochem. J.* 218: 177-185, 1984.
11. Wilson, D.B., Bross, T.E., Hofmann, S. L., and Majerus, P. W.: Hydrolysis of polyphosphoinositides by purified sheep seminal vesicle phospholipase C enzymes. *J. Biol. Chem.* 259: 11718-11724, 1984.
12. Weiss, S.J., Mckinney, J.S., and Putney, J. W.: Regulation of phosphatidate synthesis by secretagogues in parotid

- acinar cells. *Biochem. J.* 204: 587-592, 1982.
13. Billah, M.M., and Lapetina, E. G.: Degradation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in insensitive to Ca^{2+} mobilization in stimulated platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109: 217-222, 1982.
 14. Bone, E.A., Fretten, P., Palmer, S., Kirk, C.J., and Michell, R. H.: Rapid accumulation of inositol phosphates in isolated rat superior cervical sympathetic ganglia exposed to V_1 -vasopressin and muscarinic cholinergic stimuli. *Biochem. J.* 221: 803-811, 1984.
 15. Creba, J.A., Downes, C.P., Hawkins, P.T., Brewster, G., Michell, R.H., and Kirk, C. J.: Rapid breakdown of phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in rat hepatocytes stimulated by vasopressin and other Ca^{2+} -mobilizing hormones. *Biochem. J.* 212: 733-747, 1983.
 16. Vicentini., and Villereal, M.: Serum, bradykinin, and vasopressin stimulate release of inositol phosphates from human fibroblasts. *Biochem. Phys. Res. Commun.* 123: 663-670, 1984.
 17. Fisher, S.K., and Agranoff, B. W.: Enhancement of the muscarinic synaptosomal phospholipid labelling effect by the ionophore A23187. *J. Neurochem.* 37: 968-977, 1981.
 18. Cockcroft, S., Bennet, J.P., and Gomperts, B. D.: The dependence on Ca^{2+} of phosphatidylinositol breakdown and enzyme secretion in rabbit neutrophils stimulated by formyl-methionyl-leucylphenylalanine or ionomycin. *Biochem. J.* 200: 501-508, 1981.
 19. Axen, K. V., Schubart, U. K., Blake, A. B., and Fleischer, N.: Role of Ca^{2+} in secretagogue-stimulated breakdown of phosphatidylinositol in rat pancreatic islets. *J. Clin. Invest.* 72: 13-21, 1983.
 20. Farese, R.V., Larson, R.E., and Sabis, M. A.: Effects of Ca^{2+} ionophore A23187 and Ca^{2+} deficiency on pancreatic phospholipids and amylase release in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 633: 479-484, 1980.
 21. Allan, D., and Michell, R. H.: Phosphatidylinositol cleavage in lymphocytes. *Biochem. J.* 142: 599-604, 1974.
 22. Allison, J.H., and Stewart, M.A.: Reduced brain inositol in lithium-treated rats. *Nature New Biol.* 233: 267-268, 1971.

23. Allison, J.H., Blisner, M.E., Holland, W.H., Hipps, P.P., and Sherman, W.R.: Increased brain myo-inositol 1-phosphate in lithium-treated rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71: 664-670, 1976.
24. Rana, R. S., and Hokin, L. E.: Role of phosphoinositides in transmembrane signaling. *Physiol. Rev.* 70: 115-164, 1990.
25. Fain, J.N., and Berridge, M. J.: Relationship between hormonal activation of phosphatidylinositol hydrolysis, fluid secretion and calcium flux in the blowfly salivary glands. *Biochem. J.* 178: 45-58, 1979.
26. Spat, A., Bradford, P.G., Mckinney, J.S., Rubin, R.P., and Putney, J. W.: A saturable receptor for ^{32}P -inositol 1,4,5-trisphosphate in hepatocytes and neutrophils. *Nature* 319: 514-516, 1986.
27. Guillematte, G., Balla, T., Baukal, A.J., and Catt, K. J.: Inositol 1,4,5-trisphosphate binds to a specific receptor and releases microsomal calcium in the anterior pituitary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8195-8199, 1987.
28. Baukal, A.J., Guillemette, G., Rubin, R., Spat, A., and K.J. Catt: Binding sites for inositol trisphosphate in the bovine adrenal cortex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133: 532-538, 1985.
29. Joseph, S. K., Williams, R. J., Corkey, B. E., Matschinsky, F. M., and Williamson, J. R.: The effect of inositol trisphosphate on Ca^{2+} fluxes in insulin-secreting tumor cells. *J. Biol. Chem.* 259: 12952-12955, 1984.
30. Irvine, R.F., Letcher, A.J., Lander, D.J., and Downes, C.P.: Inositol trisphosphates in carbachol-stimulated rat parotid glands. *Biochem. J.* 223: 237-243, 1984.
31. Malaisse, W. J., Sener, S., Herchuelz, S., and Hutton, J. C.: Insulin release: the fuel hypothesis. *Metabolism* 28: 373-386, 1979.
32. Ghosh, A., Ronner, P., Cheong, E., Khalid, P., and Matschinsky, F. M.: The role for ATP and free ADP in metabolic coupling during fuel-stimulated insulin release from islet β -cells in the isolated perfused rat pancreas. *J. Biol. Chem.* 266: 22887-22892, 1991.
33. Ashcroft, S. J. H., and Christie, M. R.: Effects of glucose on the cytosolic ratio of reduced/oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in rat islets of Langerhans. *Biochem. J.* 184: 697-700, 1979.

34. Cook, D. L., and Hales, C. N.: Intracellular ATP directly locks K^+ channels in pancreatic β -cells. *Nature* 311: 271-273, 1984.
35. Cook D. L., Statin, L. S., Ashford, M. L. J., and Hales, C. N.: ATP-sensitive K^+ channels in pancreatic β -cells. *Diabetes* 37: 495-498, 1988.
36. Hellman, B., Shelin, J., and Taljedal, I-B.: Evidence for mediate transport of glucose in mammalian pancreatic β -cells. *Biochim. Biophys. Acta* 241: 147-154, 1971.
37. Sener, A., Leclercq-Meyer, V., Giroix, M-H., Malaisse, W.J., and Hellerstrom, C.: Opposite effects of D-glucose and a nonmetabolized analogue of L-leucine on respiration and secretion in insulin-producing tumoral cells (RINm5F). *Diabetes* 36: 187-192, 1987.
38. Giroix, M-H., Sener, A., Pipeleers, G., and Malaisse, W. J.: Hexose metabolism in pancreatic islets. *Biochem. J.* 223: 447-453, 1984.
39. Thorens, B., Sarkar, H. K., Kaback, H. R., and Lodish, H. F.: Cloning and function expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney and pancreatic islets. *Cell* 55: 281-290, 1988.
40. Malaisse, W. J.: Calcium entry and activation of endocrine cells. *Ann. New York Acad. Sci.* 522: 284-295, 1988.
41. Cook, D. L., Ikeuchi, M., and Fujimoto, W. Y.: Lowering of pH_i inhibits Ca^{2+} -activated K^+ channels in pancreatic β -cells. *Nature* 311: 269-271, 1984.
42. Fex, G. and Lernmark, A.: Effects of insulin secretagogues on phospholipid metabolism in pancreatic β -cells. *Biochim. Biophys. Acta* 388: 1-4, 1975.
43. Clements, R. S., Evans, M. H., and Pace, C. S.: Substrate requirements for the phosphoinositide response in rat pancreatic islets. *Biochim. Biophys. Acta* 674: 1-9, 1981.
44. Carpinelli, A. R., and Malaisse, W. J.: The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. *Diabetologia* 19: 458-464, 1980.
45. Malaisse, W. J., Carpinelli, A. R., and Sener, A.: Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Timing of early metabolic, ionic, and secretory events. *Metabolism* 30: 527-532, 1981.

46. Best, L. and Malaisse, W. J.: Phosphatidylinositol and phosphatidic acid metabolism in rat pancreatic islets in response to neurotransmitter and hormonal stimuli. *Biochim. Biophys. Acta* 750: 157-163, 1983.
47. Mathias, P. C. F., Best, L., and Malaisse, W. J.: Stimulation by glucose and carbamylcholine of phospholipase C in pancreatic islets. *Cell Biochem. and function* 3: 173-177, 1985.
48. Wollheim, C. B., and Pozzan, T.: Correlation between cytosolic free Ca^{2+} and insulin release in an insulin-secreting cell line. *J. Biol. Chem.* 259: 2262-2267, 1984.
49. Biden, T. J., Riesch, B. P., Schlegel, W., and Wollheim, C. B.: Ca^{2+} -mediated generation of inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate in pancreatic islets. *J. Biol.Chem.* 262: 3567-3571, 1987.
50. Hughes, A. R., and Putney Jr., J. W.: Inositol phosphate formation and its relationship to calcium signaling. *Environmental Health Perspectives* 84: 141-147, 1990.
51. Biden, T. J., Prugue, M. L., and Davison, G. M.: Evidence for phosphatidylinositol hydrolysis in pancreatic islets stimulated with carbamylcholine. *Biochem. J.* 285: 541-549, 1992.
52. Laychock, S. G.: Identification and metabolism of polyphosphoinositides in isolated islets of Langerhans. *Biochem. J.* 216: 101-106, 1983.
53. Zawalich W., Takuwa, N., Takuwa, Y., Díaz, V. A., and Rasmussen, H.: Interactions of cholecystokinin and glucose in rat pancreatic islets. *Diabetes* 36: 426-433, 1987.
54. Best, L. and Malaisse, W. J.: Stimulation of phosphoinositide breakdown in rat pancreatic islets by glucose and carbamylcholine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116: 9-16, 1983.
55. Yamaguchi, T., Kanatsuka, A., Makino, H., Ohsawa, H., and Yoshida, S.: Dual mechanism involved in the hydrolysis of polyphosphoinositides in rat pancreatic islets. *Endocrinology* 124: 1870-1874, 1989.
56. Best, L., and Malaisse, W. J.: Nutrient and hormone-neurotransmitter stimuli induce hydrolysis of polyphosphoinositides in rat pancreatic islets. *Endocrinology* 115: 1814-1820, 1984.

57. Gao, Z. Y., Drews, G., and Henquin, J. C.: Mechanism of the stimulation of insulin release by oxytocin in normal mouse islets. *Biochem. J.* 276: 169-174, 1991.
58. Zhang, A., Gao, Z. Y., Gilon, P., Nenquin, M., Drews, G., and Henquin, J. C.: Vanadate stimulation of insulin release in normal mouse islets. *J. Biol. Chem.* 266: 21649-21656, 1991.
59. Blachier, F., and Malaisse, W. J.: Effect of exogenous ATP upon inositol phosphate production, cationic fluxes and insulin release in pancreatic islets cells. *Biochim. Biophys. Acta* 970: 222-229, 1988.
60. Zawalich, W. S., and Zawalich, K. C.: Glucosamine-induced desensitization of β -cell responses: possible involvement of impaired information flow in the phosphoinositide cycle. *Endocrinology* 130: 3135-3142.
61. Zawalich, W. S., Zawalich, K. C., and Rasmussen, H.: The conditions under which rat islets are labelled with [3 H]inositol alter the subsequent responses of these to a high glucose concentration. *Biochem. J.* 259: 743-749, 1989.
62. Zawalich, W. S., and Wawalich, K. C.: Forskolin-induced desensitization of pancreatic β -cell insulin secretory responsiveness: possible involvement of impaired information flow in the inositol-lipid cycle. *Endocrinology* 126: 2307-2312, 1990.
63. Zawalich, W. S.: Phosphoinositide hydrolysis and insulin secretion in response to glucose stimulation are impaired in isolated rat islets by prolonged exposure to the sulfonylurea tolbutamide. *Endocrinology* 125: 281-286, 1989.
64. Zawalich, W. S., Zawalich, K. C., and Rasmussen, H.: Interleukin- 1α exerts glucose -dependent stimulatory and inhibitory effects on islet cell phosphoinositide hydrolysis and insulin secretion. *Endocrinology* 124: 2350-2357, 1989.
65. Cuatrecasas, P.: Isolation of the insulin receptor of liver and fat-cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 318-322, 1972.
66. Saltiel, A.R. and Cuatrecasas, P.: Insulin stimulates the generation from hepatic plasma membranes of modulators derived from an inositol glycolipid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5793-5797, 1986.
67. Saltiel, A.R., Fox, J.A., Sherline, P., and Cuatrecasas, P.: Insulin-stimulated hydrolysis of a novel glycolipid

- generates modulators of cAMP phosphodiesterase. *Science* 233: 967-972, 1986.
68. Mato, J.M., Kelly, K.K., Abler, A., Jarett, L., Corkey, B.E., Cashel, J.A., and Zopf, D.: Partial structure of an insulin-sensitive glycopospholipid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146: 764-770, 1987.
 69. Mato, J. M., Kelly, K. L., Abler, A, and Jarett, L.: Identification of a novel insulin-sensitive glycopospholipid from H35 hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 262: 2131-2137, 1987.
 70. Ferguson, M. A. J.: cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 285-320, 1988.
 71. Alvarez, J. F., Varela, I., Ruíz-Albusac, J. M., and Mato, J. M.: Localisation of the insulin-sensitive phosphatidylinositol glycan at the outer surface of the cell membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152: 1455-1462, 1988.
 72. Saltiel, A. R., and Sorbara-Cazan, L. R.: Inositol glycan mimics the action of insulin on glucose utilization in rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149: 1084-1092, 1987.
 73. Malaisse, W. J., Albor, A., Blachier, F., Valverde, I., Sener, A., and Mato, J. M.: Effect of a phospho-oligosacharidic putative insulin messenger on insulin release in rats. *Diabetologia* 32: 295-299, 1989.
 74. Villalba, M., Kelly, K. L., and Mato, J. M.: Inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by the polar head group of an insulin-sensitive glycopospholipid. *Biochim. Biophys. Acta* 968: 60-76, 1988.
 75. Cámara, J., Albor, A., Mato, J. M., Malaisse, W. J., and Valverde, I.: Inhibition of proinsulin biosynthesis and conversion by a putative insulin mediator. *Biochem. Int.* 18: 865-869, 1989.
 76. Lacy, P. E., and Kostianovsky, M.: Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16: 33-39, 1967.
 77. Dean. N. M., and Moyer, J. D.: Separation of multiple isomers of inositol phosphates formed in GH₃. *Biochem. J.* 242: 361-366, 1987.

78. Weisenfeld, S., Podolsky, S., Goldsmith, L., and Ziff, L.: Adsorption of insulin to infusion bottles and tubing. *Diabetes* 17: 766-771, 1968.
79. Trapote, M. A., Villanueva-Peñacarrillo, M. L., y Valverde, I.: Estudio de pérdidas por adsorción al contenedor de diversos péptidos en distintas soluciones. XXIV Congreso nacional de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas, Madrid 26-29 de Septiembre, 1990.
80. Clements, R. S. Jr., and Rhoten, W. B.: Phosphoinositide metabolism and insulin secretion from isolated rat pancreatic islets. *J. Clin. Invest.* 57: 684-691, 1976.
81. Cheng, P., Yasuda, H., Katori, T., and Oka, H.: Phosphoinositides turnover and insulin secretion in pancreatic islets. *Endocrinol. Japon* 37: 189-202, 1987.
82. Blachier, F., Segura, M. C., and Malaisse, W. J.: Unresponsiveness of phospholipase C to the regulatory proteins N_2 and N_1 in pancreatic islets. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 55: 335-355, 1987.
83. Turk, J., Wolf, B. A., Lefkowitz, J. B., Stump, W. T., and McDaniel, M. L.: Glucose-induced phospholipid hydrolysis in isolated pancreatic islets: quantitative effects on the phospholipid content of arachidonate and other fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 879: 399-409, 1986.
84. MacDonald, M. J., Fahien, L. A., Mertz, R. J., and Rana, R. S.: Effect of esters of succinic acid and other citric cycle intermediates on insulin release and inositol phosphate formation by pancreatic islets. *Arch. Biochem. Biophys.* 269: 400-406, 1989.
85. Banno, Y., Nakashima, S., and Nozawa, Y.: Partial purification of phosphoinositide phospholipase C from human platelet cytosol; characterization of its three forms. *Biochem. Phys. Res. Commun.* 136: 713-727, 1986.
86. Rana, R. S., and MacDonald M. J.: Phosphatidylinositol kinase in rat pancreatic islets: subcellular distribution and sensitivity to calcium. *Horm. Metabol. Res.* 18: 659-662, 1986.
87. Blachier, F., and Malaisse, W. J.: Stimulation by D-glucose of the synthesis of polyphosphoinositides in pancreatic islets. *Biochimie* 72: 849-854, 1990.

88. Metz, S. A.: The pancreatic islet as Rubik's cube. *Diabetes* 40: 1565-1573, 1991.
89. Villanueva-Peñacarrillo, M. L., Delgado, E., García-Gayá, M., and Valverde, I.: Inhibitory effect of insulin upon C-peptide secretion in isolated human pancreatic islets. *Diab. Nutr. Metab.* 6: 19-23, 1993.
90. Malaisse, W. J.: Metabolic factors influencing synthesis and secretion of pancreatic islet hormones. *The Endocrine Pancreas*: 73-92.

8.- ABREVIATURAS

PI: Fosfatidilinositol

PIP: Fosfatidilinositol-monofosfato

PIP₂: Fosfatidilinositol-difosfato

IP: Inositol-monofosfato

IP₂: Inositol-difosfato

IP₃: Inositol-trifosfato

PLC: Fosfolipasa C

GPI: Glicosil-fosfatidilinositol

IPG: Inositol-fosfoglicano

³H-IPs: Inositoles fosfato tritiados

³H-PIs: Fosfatidilinositoles tritiados