

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



* 5 3 0 9 6 0 7 2 4 7 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**INTERACCIÓN ENTRE GLICOLISIS Y METABOLISMO
OXIDATIVO EN EL MECANISMO DE SECRECIÓN DE
INSULINA INDUCIDA POR GLUCOSA EN ISLOTES DE
LANGERHANS.**

TESIS PRESENTADA POR ELENA GINÉ DOMÍNGUEZ PARA OPTAR AL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS.

MAYO 1996

LA AUTORA

Elena Giné Domínguez

Vº Bº EL DIRECTOR

Dr. Jorge Tamarit Rodríguez.



ARCHIVO

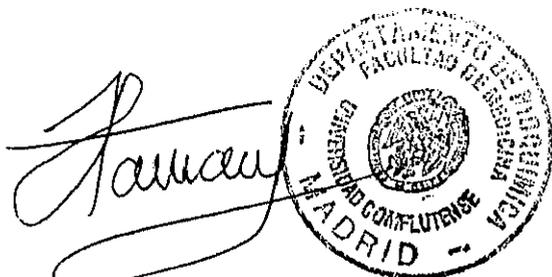
JORGE TAMARÍT RODRÍGUEZ, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA:

Que el trabajo "Interacción entre glicolisis y metabolismo oxidativo en el mecanismo de secreción de insulina inducida por glucosa en los islotes de Langerhans" ha sido realizado por Dña. Elena Giné Domínguez bajo mi dirección, y que reúne las condiciones exigidas para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas.

En Madrid, 16 Mayo 1996.

Director de la Tesis

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Tamarit', is written over a circular official stamp. The stamp contains the text 'DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLÓGICA MOLECULAR', 'FACULTAD DE MEDICINA', 'UNIVERSIDAD COMPLUTENSE', and 'MADRID' around a central emblem.

Dr. Jorge Tamarit Rodríguez

A Mario y a mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer sinceramente al Dr. Jorge Tamarit Rodríguez su confianza y su apoyo sin los cuales este trabajo no hubiera podido realizarse. También quisiera agradecerle la posibilidad que me ha dado de acceder al campo de la investigación.

A Oscar por ser un buen amigo durante estos largos años. A todos mis compañeros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina, por su amistad, conversación y los ejemplos de compañerismo.

A mis padres, sin cuyo apoyo jamás habría comenzado esta aventura, a Jaime, M^a Carmen, Miguel y Andrés por sus defectos y virtudes y a todos mis cuñados por la parte que les toca.

A Mario por su lógico cariño, su paciencia en mis impacencias, por su compañía en los momentos buenos y su incondicional apoyo en los malos.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| Regulación de la secreción de insulina producida por glucosa | 2 |
| a. Hipótesis del glucorreceptor | 3 |
| b. Hipótesis metabólica | 4 |
| Metabolismo de la glucosa en los islotes pancreáticos | 5 |
| Metabolismo de la glucosa en la glicolisis | 5 |
| Transporte de glucosa | 6 |
| Fosforilación de la glucosa | 7 |
| Canalización de las hexosas fosfato | 11 |
| Conversión de las triosas fosfato en piruvato | 13 |
| lanzadera del glicerol-3 fosfato | 15 |
| lanzadera malato/aspartato | 15 |
| El destino del piruvato | 16 |
| Destino mitocondrial del piruvato | 17 |
| Lanzadera piruvato/malato | 18 |
| | |
| OBJETIVOS | 20 |
| | |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 21 |
| Aislamiento de islotes de Langerhans | 21 |
| Sistema de perfusión | 22 |
| Estudios metabólicos | 24 |
| A. Utilización de glucosa. | 24 |
| B. Fosforilación de glucosa. | 25 |
| C. Oxidación de D-[U- ¹⁴ C]glucosa | 27 |
| D. Vía pentosas fosfato | 29 |
| E. Oxidación de otros sustratos: | 30 |
| E.1. D-[U- ¹⁴ C]gliceraldehido | 30 |
| E.2. L-[U- ¹⁴ C]glutamina | 30 |
| E.3. [2- ¹⁴ C]piruvato | 30 |
| E.4. L-[U- ¹⁴ C]leucina | 31 |
| E.5. L-[U- ¹⁴ C]alanina | 31 |
| E.6. L-[U- ¹⁴ C]lisina | 31 |
| E.7. L-[U- ¹⁴ C]prolina | 31 |
| Medida de la producción de lactato | 32 |

| | |
|---|----|
| Salida del piruvato | 35 |
| Medida del contenido de DNA. | 36 |
| Medida de la secreción de insulina | 37 |
| 1. Radioyodación con ¹²⁵ I Na de la insulina | 38 |
| 2. Cálculo de la actividad específica de la insulina marcada | 39 |
| 3. Purificación de la insulina radioyodada. | 40 |
| 4. Radioinmunoensayo | 42 |
| Preparación del anticuerpo | 43 |
| Preparación de la insulina-I ¹²⁵ | 43 |
| 5. Separación de la insulina libre de la ligada al anticuerpo | 45 |
| Análisis estadístico de los resultados | 45 |
| RESULTADOS | 46 |
| Producción de lactato | 46 |
| Efecto del tiempo | 47 |
| Efecto de la concentración de glucosa | 48 |
| β-iodoacetamida. | 48 |
| D-manoheptulosa | 52 |
| Utilización de glucosa | 52 |
| Oxidación de glucosa. | 56 |
| Flujo a través de la vía de las pentosas fosfato | 58 |
| Salida de piruvato | 60 |
| Inhibidores de la función mitocondrial | 61 |
| Fosforilación de la glucosa | 67 |
| Inhibidores de la fosforilación de la glucosa | 70 |
| Oxidación de otros sustratos | 78 |
| CONCLUSIONES | 94 |
| BIBLIOGRAFÍA | 95 |

Introducción

INTRODUCCIÓN

En mamíferos, los islotes de Langerhans sintetizan hormonas polipeptídicas que dirigen el almacenamiento y la utilización de sustratos oxidables simples. La homeostasis de estos metabolitos es controlada, en gran medida, por la interacción de dos de los productos de los islotes: el glucagón y la insulina. Estas dos hormonas ejercen un efecto antagónico en el metabolismo celular, y su secreción está controlada de manera inversa por factores tales como la dieta, el estado nutricional y el stress (1). Así, un valor alto del cociente insulina/glucagón es un indicador de un estado postprandial y activa rutas anabólicas tales como el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno, y de ácidos grasos en forma de triglicéridos. Contrariamente, un valor alto del cociente glucagón/insulina es típico de una situación catabólica, como el ayuno, que origina un incremento en sangre de los niveles de los metabolitos simples tales como la glucosa procedente de la glucogenolisis y los ácidos grasos de la lipolisis.

Los mecanismos reguladores de los niveles de glucagón e insulina son complejos. En los últimos años, se ha prestado una atención especial al entendimiento de los procesos bioquímicos que relacionan las fluctuaciones de los niveles de metabolitos simples, con cambios en los niveles de secreción de insulina producida por las células β de los islotes de Langerhans. El interés en este área radica, naturalmente, en su relación con la diabetes. La diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), también conocida como diabetes tipo I, se da como consecuencia de una destrucción autoinmune de la células productoras de insulina, células β de los islotes, mientras que las células productoras de glucagón, células α , permanecen intactas. El descubrimiento de la insulina en 1922 por Banting & Best desembocó en la inyección de insulina como terapia estratégica para la IDDM, tratamiento que continúa actualmente. A pesar de que la inyección de insulina salva vidas, falla en reproducir el exquisito control de la homeostasis de los sustratos oxidables llevada a cabo por los islotes normales, los cuales regulan la liberación de glucagón e insulina, minuto a minuto, en respuesta a los cambios en los niveles de sustratos. Así, un gran número de investigaciones se han centrado en el trasplante de células con capacidad secretora (2,3,4). Claramente, un prerequisite para un desarrollo coherente de estas investigaciones, es un entendimiento detallado del proceso de secreción de insulina producido por los metabolitos en islotes normales. La diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM), también conocida como diabetes tipo II,

parece que se da como consecuencia de dos lesiones celulares/metabólicas distintas, la resistencia a la insulina y una disfunción β -celular; y se da frecuentemente unida a obesidad. La resistencia a la insulina se manifiesta por una marcada reducción de la eficacia de la hormona para estimular la entrada de glucosa y para suprimir la lipólisis en tejidos sensibles a insulina como el músculo y el tejido adiposo. El defecto de las células β tiene dos componentes. Primero, en estados de resistencia a la insulina tanto de diabéticos como de no diabéticos, la secreción de insulina en respuesta a concentraciones no estimuladoras de glucosa (≤ 5 mM) es significativamente mayor que en los controles normales (5,6). El paso de la obesidad y la resistencia a la insulina, a la diabetes está asociado con la aparición de una segunda lesión: la pérdida de respuesta secretora a niveles de glucosa (generalmente 8 mM o más) que en islotes normales producen un gran incremento de secreción de insulina. Como solo la resistencia a la insulina es generalmente insuficiente para causar diabetes, la lesión de las células β es un componente crucial de la enfermedad. Así, resulta de vital importancia la comprensión de los mecanismos del proceso de secreción de insulina por glucosa y otros metabolitos en islotes normales para poder entender las bases de la disfunción de las células β en la diabetes tipo II.

La secreción de insulina por las células β de los islotes es afectada por un gran número de factores. A concentraciones fisiológicas sólo la D-glucosa y en menor medida la D-manosa, es capaz de iniciar la secreción de insulina, ya que la respuesta de otros efectores requiere la presencia del azúcar. La L-leucina ha demostrado ser también un iniciador pero sólo a concentraciones farmacológicas (7).

REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE INSULINA PRODUCIDA POR GLUCOSA

La secuencia de los eventos que llevan a la estimulación de la secreción de insulina en respuesta a un incremento en la concentración extracelular de glucosa, envuelve tres pasos fundamentales:

- 1. Reconocimiento de la glucosa, o más precisamente, la percepción de los cambios en la concentración extracelular de glucosa como estímulo para la secreción de insulina.**

2. **Sistema de acoplamiento entre estímulo y secreción.** Alteración de los flujos iónicos a través de la membrana plasmática que produce una acumulación citosólica de Ca^{2+} .

3. **Liberación de insulina.** Translocación de los gránulos secretores de insulina y su liberación por exocitosis.

Históricamente se han enunciado dos hipótesis para explicar cómo las células β reconocen cambios en la concentración de glucosa plasmática y responden produciendo un aumento en la secreción de insulina (8):

a. **Hipótesis del glucorreceptor:** la iniciación de la secreción de insulina por glucosa, sería el resultado de su interacción directa con receptores existentes en la membrana plasmática de las células β . Según esta hipótesis, la glucosa se combinaría con una molécula receptora, formando un complejo glucosa-receptor que activaría la exocitosis de los gránulos de insulina directamente o a través de la formación de un mensajero intracelular.

La evidencia experimental más importante en favor de este modelo, proviene de estudios sobre la especificidad anomérica de diferentes efectos de la D-glucosa sobre la célula β (9). Se observó que los anómeros α de la D-glucosa y de la D-manosa eran más eficaces que los anómeros β en estimular la secreción de insulina (10). Como la especificidad anomérica de las isomerasas para la glucosa-6-fosfato y la manosa-6-fosfato eran opuestas, la fosfoglucosa isomerasa tiene preferencia por el anómero α y la fosfomanosa isomerasa tiene preferencia por el β , se sugirió que las células β de los islotes pancreáticos reconocían la configuración α de las hexosas como el estímulo dominante en un nivel anterior a la fosfohexosa isomerasa, probablemente a nivel del receptor en la membrana celular (9). En contra de esta interpretación favorable a la hipótesis del glucorreceptor, otros autores (11) proponen que los anómeros α son más eficaces en estimular la secreción de insulina por que tienen una velocidad glicolítica mayor. Esta velocidad glicolítica mayor sería debida: en el caso de la glucosa, a la α -estereoespecificidad de la fosfoglucosa isomerasa y de la fosfoglucomutasa. Este último enzima, que es estrictamente específico para el anómero α de la D-glucosa, catalizaría la síntesis de glucosa-1,6-bifosfato a partir de α -D-glucosa, que activaría la fosfofructoquinasa-1 aumentando la velocidad del flujo glicolítico en islotes expuestos

a α -D-glucosa en comparación a β -D-glucosa. En el caso de la manosa el mecanismo propuesto para la mayor velocidad glicolítica del anómero α , es la α -estereoespecificidad de la fosfoglucomutasa encargada de la síntesis de manosa-1,6-bifosfato activador de la fosfofructoquinasa-1 (11).

La imposibilidad de demostrar la existencia del glucoreceptor junto con el gran número de resultados experimentales obtenidos en los últimos años en favor del modelo alternativo que se expone a continuación (7), han apoyado el reconocimiento de la hipótesis siguiente y que es ahora ampliamente aceptada.

b. Hipótesis metabólica: El metabolismo de la glucosa en las células β generaría la señal intracelular que pone en marcha la exocitosis de los gránulos que contienen la insulina. Las primeras evidencias apoyando este modelo las aportaron *Grodsky y cols* (12) y *Coore y cols* (13), al observar que la secreción de insulina es estimulada significativamente sólo por aquellos azúcares que son metabolizados por los tejidos. De todos los D-diastereoisómeros de la glucosa estudiados, sólo los azúcares metabolizables, como la manosa y la fructosa, estimulan la secreción de insulina (14), aunque con menor eficacia que la propia glucosa. Los azúcares pobremente metabolizables tales como la galactosa, xilosa o L-arabinosa no son capaces de estimular la secreción de insulina (12). La hipótesis gana peso cuando se demuestra que los análogos no metabolizables de la D-glucosa, tales como la 2-deoxi-D-glucosa ó 3-O-metil glucosa, son ineficaces en provocar la liberación de la secreción de insulina y que inhibidores de la glicolisis, como la D-manohetulosa o la glucosamina, bloquean la respuesta de la D-glucosa (13,15).

El "*reconocimiento de la glucosa*" en algunas etapas de su metabolismo da lugar a una señal que acopla el estímulo (glucosa) a la liberación de insulina. Dado que este proceso de acoplamiento queda fuera del interés metabólico de reconocimiento de la glucosa y de este trabajo, se describirá brevemente la hipótesis más universalmente aceptada en la actualidad. Existe un consenso casi general de que la señal generada en el metabolismo de la glucosa consiste en un incremento de los niveles citosólicos de ATP o del cociente ATP/ADP. Esto provocaría un cierre de los canales de potasio de la membrana plasmática sensibles al nucleótido con la consiguiente despolarización celular. Esta despolarización produciría una apertura de los canales de calcio de la membrana sensibles al voltaje. Este aumento de permeabilidad al calcio produciría finalmente un

incremento de la concentración citosólica del catión que activaría en última instancia el proceso de exocitosis de los gránulos de insulina (16,17).

METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN LOS ISLOTES PANCREÁTICOS

El metabolismo de la glucosa en los islotes puede darse por distintas vías de las cuales la glicolisis es indiscutiblemente la mayoritaria. La síntesis de **glucógeno** en condiciones fisiológicas es pequeña, entre un 1-7 % del consumo de la glucosa. Sólo tras unas condiciones de hiperglucemia crónica los depósitos insulares de glucógeno aumentan y la movilización de éste por teofilina puede estimular la secreción de insulina (18).

Parece ser que el **ciclo de las pentosas fosfato** es una vía minoritaria del metabolismo de la glucosa en los islotes pancreáticos (19). Sin embargo, no parece estar claro todavía si el porcentaje de glucosa metabolizada por esta vía, con respecto al flujo total de glucosa utilizada, varía (20) o no (21) con la concentración de glucosa en un rango estimulante de la secreción. En cualquier caso, los enzimas de la vía pentosas fosfato se encuentran en los islotes pancreáticos con una actividad substancialmente mayor que el flujo medido en islotes intactos. Esto podría indicar que la actividad de estos enzimas se encuentra limitada por la disponibilidad de NADP⁺(19).

Los islotes de Langerhans no llevan a cabo la **gluconeogénesis** a pesar de que expresan los enzimas glucosa-6-fosfatasa (22) y piruvato carboxilasa, ya que carecen de otras actividades enzimáticas tales como: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y fructosa-1,6-bifosfatasa (1,23).

METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN LA GLICOLISIS

Ya que la velocidad del metabolismo de la glucosa en las células β está relacionada con la cantidad de insulina liberada, el conocimiento de los factores que controlan el flujo de glucosa debería definir el *sensor de glucosa*: la unidad de reconocimiento o punto regulador de la respuesta al azúcar.

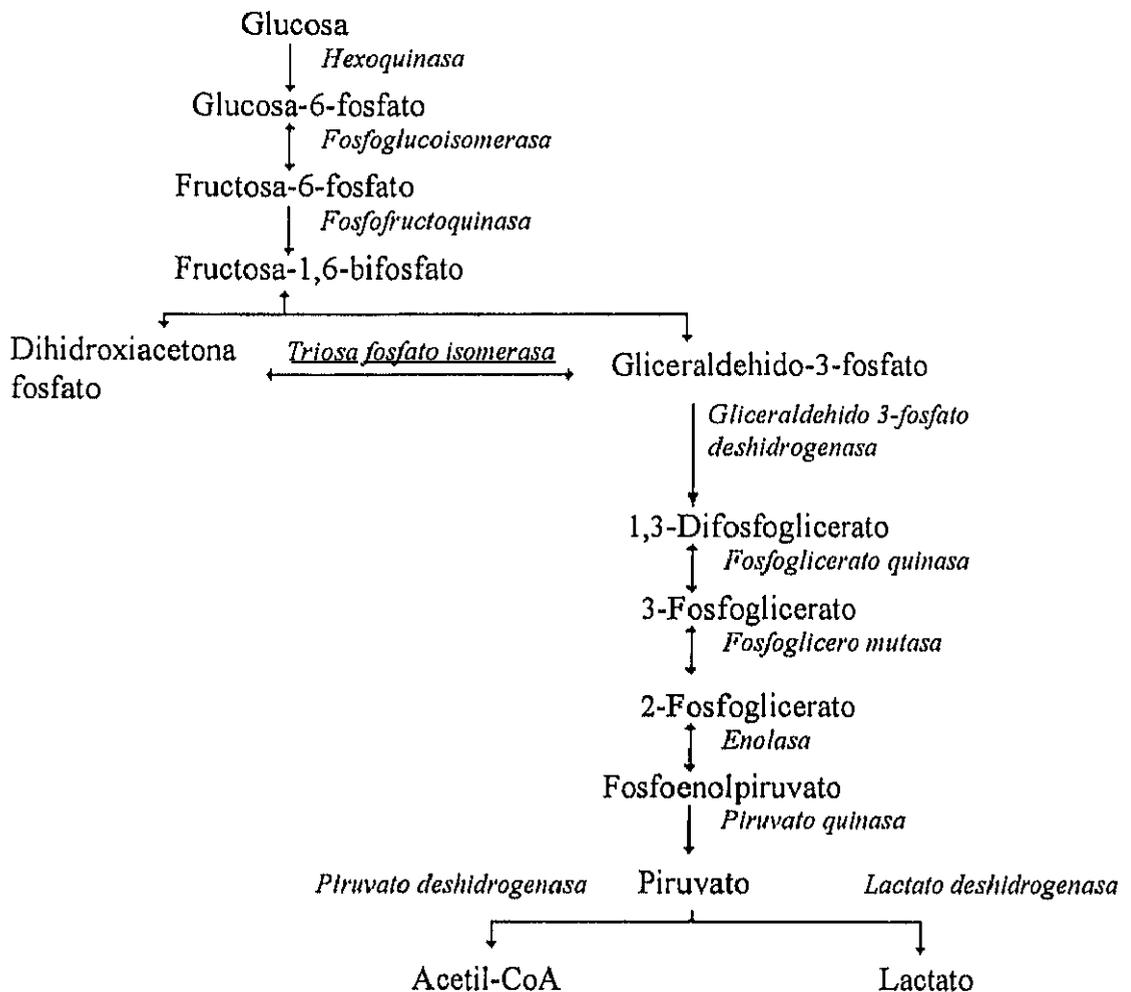


Figura 1. Esquema general del metabolismo de la glucosa en la glicolisis.

TRANSPORTE DE GLUCOSA

En el proceso de captación de glucosa por parte de la célula β , las concentraciones del azúcar a ambos lados de la membrana plasmática se equilibran casi instantáneamente por un proceso de transporte facilitado (24). Se ha demostrado que, como en el hígado, los islotes pancreáticos expresan el transportador de glucosa GLUT-2 de un alto K_m (40 - 60 mmol/l) que no está saturado a concentraciones plasmáticas de glucosa (7). Por lo

tanto, en condiciones fisiológicas, la entrada de glucosa en los islotes no debe ser considerada como un factor limitante para su metabolismo intracelular. Investigaciones realizadas en los cinco últimos años sobre este transporte, han hecho resurgir el papel del transporte de glucosa junto a la glucoquinasa como un componente importante del sensor de la glucosa (25). Ya que, mientras en condiciones de expresión normal del transportador GLUT-2, éste ejercería un papel permisivo en el control del metabolismo de la glucosa (7), cuando ocurre una subexpresión del transportador se obtiene una pérdida de la respuesta secretora inducida por la glucosa (5,26). Así, parece ser que la conclusión más aceptada por el momento señala que la expresión del transportador GLUT-2 sería necesaria, pero no suficiente para la secreción de insulina producida por la glucosa; también se requeriría la presencia de una actividad glucoquinasa y posiblemente otros factores (27).

FOSFORILACIÓN DE LA GLUCOSA

Dada la alta capacidad de transporte, se pensó que la fosforilación de la glucosa podría ser considerada como el sensor o la etapa limitante de la utilización de la glucosa en los islotes, y que podría determinar la relación entre la concentración de glucosa extracelular y la secreción de insulina. Se han detectado dos actividades fosforilantes de glucosa en extractos de islotes por cromatografía de afinidad: una de ellas de alta afinidad para glucosa (hexoquinasa I) (28) y otra de baja afinidad (hexoquinasa IV o glucoquinasa) (28,29,30,31). Recientemente se ha descrito una isoforma de glucoquinasa que se expresa en células β mediante un procesamiento específico del correspondiente mRNA y que desde el punto de vista cinético es indistinguible de la isoforma hepática (33). A pesar de esta igualdad cinética de ambas isoformas, se ha observado que la secuencia de la glucoquinasa hepática y la de las células β de los islotes pancreáticos difieren en 15 aminoácidos de su NH_2 terminal. Esto es debido a que el gen único que codifica estas proteínas, utiliza promotores alternativos específicos para cada tejido produciendo mRNAs de glucoquinasa en hígado e islote que difieren en su 5' terminal (31). Se piensa que esta diferencia podría permitir una regulación específica en cada tejido del mismo enzima (34). La glucoquinasa presenta una serie de características particulares que la distinguen de las otras hexoquinasas:

1. Posee una distribución tisular específica. Se encuentra en hepatocitos y en la células β de los islotes pancreáticos.
2. Presenta baja afinidad por la glucosa. La glucoquinasa presenta una K_m para la glucosa de alrededor de 10 mM, mientras que las demás hexoquinasa presentan una K_m para la glucosa entre 7 y 150 μ M.
3. Ausencia de inhibición por glucosa-6-fosfato. Las otras hexoquinasa son inhibidas por este compuesto fosforilado.

Todavía se discute qué actividad fosforilante es cuantitativamente más importante *in vivo*; en homogenados de islotes, la mayor parte de la glucosa se fosforilaría por intervención de la hexoquinasa, incluso en presencia de altas concentraciones de glucosa (5,35,36,37); solo entre un 15 y un 40% de la fosforilación de la glucosa sería atribuible a la glucoquinasa. Sin embargo, esta actividad máxima de la hexoquinasa en homogenados excede en mucho al componente de alta afinidad de la utilización de la glucosa encontrada en islotes intactos. Por ello, se propuso que en islotes intactos expuestos a glucosa, la hexoquinasa podría sufrir una fuerte inhibición (37), posiblemente producida por los niveles de glucosa-6-fosfato (37,38,39). La contribución de la hexoquinasa a la fosforilación de la glucosa en islotes intactos, representaría un pequeño porcentaje de la fosforilación máxima que ocurre a elevadas concentraciones de la hexosa (39). Aunque bajo condiciones en las que los niveles de sus reguladores (glucosa-6-fosfato y Pi) varían, la actividad hexoquinasa podría variar (7).

La actividad glucoquinasa podría también estar sujeta a regulación por una proteína inhibidora dependiente de fructosa-6(1)-fosfato, recientemente descrita en islotes (39). Se ha propuesto que esta proteína reguladora podría actuar de la misma forma que en los hepatocitos. La proteína reguladora inhibiría a la glucoquinasa al formar un complejo con el enzima en presencia de fructosa-6-fosfato, y la fructosa-1-fosfato antagonizaría esta inhibición impidiendo la formación del complejo (41). Se ha observado que el efecto de la fructosa-1-fosfato sobre la actividad de la glucoquinasa en extractos de islotes, es considerablemente menor que en extractos de hígado (40). En hepatocitos aislados la fosforilación de la glucosa es estimulada por la adición de fructosa o gliceraldehído (42). Estos compuestos podrían generar fructosa-1-fosfato por acción de

la fructoquinasa o mediante la condensación con dihidroxiacetona fosfato respectivamente (43). En islotes la estimulación de la utilización de la glucosa por fructosa es muy pequeña <10% (44,45,46); posiblemente esto es debido a que, aunque se ha demostrado la existencia de fructoquinasa en islotes (47), parece ser que su actividad es mucho menor que en hepatocitos, 50 pmol/min.mg tejido frente a 10 nmol/min.mg tejido (47,48). En cuanto al D-gliceraldehido, *Malaisse y cols* han observado una estimulación de la utilización de glucosa del 17% a D-gliceraldehido 2 mM, y una inhibición a 10 mM que explican por dilución isotópica a nivel de las triosas fosfato (40). La concentración de fructosa-1-fosfato que se alcanza en presencia de 2 mM de gliceraldehido, sería suficiente para antagonizar la inhibición de la glucoquinasa por la proteína reguladora (43), por lo que propusieron este mecanismo como responsable del incremento de la utilización inducida por gliceraldehido. En islotes pancreáticos, la proteína reguladora podría controlar la actividad de la glucoquinasa de igual forma que en hepatocitos, pero con una menor eficacia (40).

Por otra parte, la participación de la hexoquinasa y de la glucoquinasa en la fosforilación de la glucosa, podría ser objeto de una regulación sinérgica de tipo secuencial, en la que estarían implicadas las concentraciones de glucosa y ATP (49). De hecho, el incremento en la concentración de ATP citosólico, que según la hipótesis más aceptada ocurriría en respuesta a una elevación de la concentración extracelular de glucosa (50), podría ejercer un efecto de retroalimentación positiva sobre la fosforilación de la hexosa. Se ha encontrado que, en homogenados de islotes, una fracción de hexoquinasa, entre un 72 % a pH 6 y un 32 % a pH 7,4, se encuentra unida a la mitocondria y que esta fracción de hexoquinasa unida es menos sensible que la libre a la inhibición por glucosa 6-fosfato (51); el mismo trabajo indica la posibilidad de que también la glucoquinasa esté unida a la mitocondria (51). Estudios posteriores confirmaron esta distribución subcelular e indicaron que los dos enzimas, en cuanto a su distribución, siguen un patrón similar (52). Existe diferencia entre la glucoquinasa hepática y pancreática en cuanto a su distribución celular. Mientras que en las células β de los islotes pancreáticos los datos indican que aproximadamente un 70% de la actividad del enzima se encuentra unida a la mitocondria, en homogenados hepáticos esta unión no representaría ni el 10% (52). Otras investigaciones apoyaron la existencia de esta asociación mitocondrial de la glucoquinasa de las células β al comprobar la unión de la porina, proteína insertada en la membrana exterior de la mitocondria, con la glucoquinasa

y la hexoquinasa y el efecto liberador de esta unión por la glimepirida (53). El estudio en mitocondrias de islotes realizado por *Malaisse y cols* les sugiere que el ATP mitocondrial podría ser utilizado con preferencia al ATP citosólico como sustrato para la fosforilación de la glucosa (54) como parece ser que ocurre en el cerebro (55,56). Esta relación física y metabólica entre la fosforilación y la mitocondria podría propiciar una coordinación entre la glicolisis y la oxidación mitocondrial.

Los enzimas encargados de la fosforilación de la glucosa han sido sobreexpresados en islotes y en líneas celulares de insulinomas. La sobreexpresión de 20 a 30 veces de la glucoquinasa en islotes conlleva un incremento en su capacidad secretora inducida por glucosa 20 mM de sólo entre un 36 y 53%, sin observarse ninguna variación en la utilización de glucosa ni la producción de lactato (58). La sobreexpresión de la hexoquinasa I de mamíferos (59) o de levadura (60,61) unas 10 veces, produce un incremento de sólo 2 a 4 veces de la secreción de insulina, la utilización de glucosa y la producción de lactato. El incremento de la utilización y la secreción de insulina se da sólo a concentraciones de glucosa basales (3 mM) pero no a concentraciones estimuladoras (20 mM). Esta diferencia no puede ser explicada por una inhibición de la actividad de la hexoquinasa de bajo K_m por la glucosa-6-fosfato en los islotes, ya que el enzima de la levadura no es sensible al inhibidor (59). La discrepancia entre los altos niveles de la actividad enzimática y los modestos cambios en la utilización de glucosa y la secreción de insulina encontrados en los dos distintos tipos de experimentos, no parece que puedan ser explicados por la inhibición de la actividad de la hexoquinasa sobreexpresada en células intactas. Se ha sugerido que estos resultados podrían ser más consistentes con un modelo en el que el enzima tiene que ensamblarse en un complejo para ser funcionalmente competente (58).

Estudios genéticos recientes, han aportado nuevas evidencias apoyando el importante papel de la glucoquinasa en la regulación de la secreción de insulina estimulada por glucosa. Se han detectado mutaciones en el gen de la glucoquinasa en pacientes de un subtipo de la diabetes tipo II conocido con el nombre maturity-onset diabetes of the young (MODY) (57). Estas observaciones, junto con las características cinéticas de la glucoquinasa (K_m 8-10 mM), hacen pensar que ésta podría desempeñar el papel de unidad de reconocimiento o sensor de glucosa en el proceso secretor que se activa en un rango de concentraciones de la hexosa (5-20 mM) centrado alrededor del K_m

del enzima.

En este trabajo, hemos elegido para bloquear el metabolismo de las células β de los islotes pancreáticos varios inhibidores como la D-manoheptulosa, 2-deoxi-D-glucosa y β -iodoacetamida. Parece ser que la D-manoheptulosa compite con la glucosa por el transporte transmembranar de la célula β (62). Se ha visto que en homogenados de islotes de ratones *ob/ob* actúa como un inhibidor competitivo exclusivo de la glucoquinasa (63). En islotes intactos causa una inhibición de la secreción de insulina inducida por glucosa (9,13), aunque parece ser que no afecta la producción de lactato a partir de glucosa (8). La 2-deoxi-D-glucosa inhibe de forma no competitiva a la hexoquinasa (8). La 2-deoxi-D-glucosa es fosforilada a 2-deoxi-D-glucosa-6-fosfato, compuesto no metabolizable y que se acumula en el citoplasma inhibiendo a la hexoquinasa. Además, la 2-deoxi-D-glucosa-6-fosfato es un inhibidor competitivo de la fosfoglucoisomerasa, enzima encargado de catalizar la interconversión de D-glucosa-6-fosfato en D-fructosa-6-fosfato (64). La β -iodoacetamida ha sido ampliamente utilizada como inhibidor de la glicolisis suponiendo que inactiva la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (65).

CANALIZACIÓN DE LAS HEXOSAS FOSFATO

La mayor parte de la glucosa-6-fosfato producida, utiliza la vía glicolítica para su metabolismo. La fosfoglucoisomerasa es el primer enzima y actúa específicamente sobre el anómero α de la glucosa-6-fosfato (66).

La fosforilación de la fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-difosfato, es catalizada por la fosfofructoquinasa-1 (PFK1). Este enzima es inhibido en los islotes por altas concentraciones de ATP (67) y muestra una curva de saturación sigmoideal por su sustrato, la fructosa-6-fosfato. La glucosa-1,6-difosfato, que podría aumentar su concentración en respuesta a un incremento de la concentración extracelular de glucosa (68), parece ser que activa a la PFK1 (69). En cuanto a la fructosa-2,6-bifosfato, se pensó que podría activar a la fosfofructoquinasa, ya que en homogenados de islotes la velocidad de la reacción en su ausencia, es menor que la medida en islotes intactos, y que al añadirla se iguala (70). En cuanto al contenido de fructosa-2,6-bifosfato en islotes, se han presentado resultados contradictorios y es aún tema de discusión. En unos primeros estudios se observó un

incremento del contenido de la fructosa-2,6-bifosfato pasando de 94,08 fmoles/isl (15 μM) en ausencia de glucosa, a 147 fmoles/isl (50 μM) a 16,7 mM de glucosa (71). En un estudio posterior realizado por el mismo grupo, se encontró que los niveles de fructosa-2,6-bifosfato, aunque se incrementaban con la concentración de glucosa extracelular, eran cuantitativamente menores a los publicados previamente (72). Según este estudio, la concentración de fructosa-2,6-bifosfato seguía una cinética hiperbólica con respecto a la concentración de glucosa produciéndose el mayor incremento a concentraciones entre 0 y 5,6 mM de glucosa, pasando de 3,9 a 12,8 fmoles/isl y con un aumento casi lineal a concentraciones más altas de glucosa, 16,2 fmoles/isl a 16,7 mM de glucosa. Por otra parte, otros autores encontraron que la influencia de la glucosa sobre el contenido de fructosa-2,6-bifosfato era muy pequeña; la fructosa-2,6-bifosfato se incrementa de 0,8 μM en 5,5 mM de glucosa a 1 μM en 10 mM de glucosa y 1,3 μM a 16,7 mM de glucosa (73). A pesar de la discrepancia cuantitativa entre ambos grupos investigadores, parece ser que a concentraciones estimulantes de la secreción de insulina, solo se daría un incremento modesto de la concentración de fructosa-2,6-bifosfato, lo que podría poner en duda la importancia fisiológica de este activador en islotes pancreáticos (73).

En muchos tipos celulares bajo condiciones de anoxia o tratamiento con inhibidores respiratorios como la antimicina A o la rotenona (agentes bloqueantes de la transferencia de electrones a nivel del complejo respiratorio III y I respectivamente), se produce una aceleración de la glicolisis anaerobia al reducirse la inhibición de la PFK1 como consecuencia de la disminución de la producción de ATP mitocondrial. El fin de esta regulación metabólica es mantener constante los niveles de ATP (74). En islotes pancreáticos, aun se discute si muestran esta aceleración llamada **efecto Pasteur**. Según unos autores (75) la anoxia inhibe la utilización y la oxidación de glucosa, indicando no sólo una falta de efecto Pasteur sino también una inhibición de la glicolisis. Los autores lo atribuyen a una disminución de la concentración del ATP que limitaría la fosforilación de la glucosa. También señalan la posibilidad de que no se produzca una reoxidación suficientemente rápida del NADH, debido a que encuentran una baja actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) en islotes (75). La baja concentración de NAD^+ limitaría la actividad de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) causando una disminución de la utilización de glucosa. Esta explicación sería válida a altas concentraciones de glucosa pero no justificaría la ausencia de efecto Pasteur a bajas concentraciones. Por el contrario, otros autores encuentran que sí existe este efecto en los

islotes expuestos a hipoxia (76). En este estudio se vio que a bajas concentraciones de glucosa, se daba un incremento de la utilización de glucosa y de producción de lactato y una disminución de la oxidación de glucosa, explicados por una disminución de la concentración de ATP que liberaría de su inhibición a la PFK1. En cambio, a altas concentraciones de glucosa encuentran una inhibición de la utilización de glucosa que explican por la disminución de los niveles de los activadores de la PFK1, fructosa-1,6-bisfosfato y fructosa-2,6-bisfosfato que se observa en hipoxia (76).

CONVERSIÓN DE LAS TRIOSAS FOSFATO EN PIRUVATO

La importancia del tramo inferior de la glicolisis, entre la fructuosa-1.6-bisfosfato y el piruvato, toma cuerpo al observar que el gliceraldehido, al igual que la glucosa, es metabolizado en los islotes produciendo un incremento del cociente ATP/ADP, un incremento en los niveles de nucleótidos de piridina reducidos (NADH+NADPH) y es un potente secretor de insulina (77-82), mientras que el piruvato y el lactato, a pesar de ser oxidados en los islotes, fallan en modificar alguno de estos parámetros (83,84). Estos hechos llevaron a pensar en la existencia de un metabolito generado entre el gliceraldehido-3-fosfato y el piruvato, necesario para la estimulación de la secreción de insulina por glucosa. En los últimos años, se han realizado numerosos estudios utilizando diversos agentes farmacológicos para conocer los eventos específicos que median la secreción de insulina producida por los sustratos oxidables. La secreción de insulina provocada por glucosa se reduce al incubar los islotes con distintos inhibidores mitocondriales como la antimicina A, rotenona, FCCP (carbonilcianuro-3-fluorofenilhidrazona) (16), sugiriendo que el metabolismo mitocondrial es un componente esencial en la respuesta producida por la glucosa. Sin embargo, un estudio reciente muestra que la incubación de islotes con 2α -metoxicianocinato (α -CHC), inhibidor mitocondrial del transporte del piruvato, o con fluoroacetato, inhibidor del ciclo de Krebs, no afecta el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) producido por glucosa o gliceraldehido (85). Tampoco tiene efecto sobre el cierre de los canales de K_{ATP} el arsenato, desacoplante de la producción de ATP a nivel de la fosfoglicerato quinasa, ni el fluoruro, desacoplante a nivel de la piruvato quinasa; sin embargo, el iodoacetato, que inhibe la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), bloquea totalmente el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP por glucosa (85) e

inhibe la secreción de insulina (16). Se propuso como acontecimiento crítico de la señalización, la generación de NADH en la reacción catalizada por la G3PDH. Este NADH así generado sería translocado a la mitocondria por dos sistemas de lanzaderas: malato/aspartato y glicerol fosfato/dihidroxiacetona fosfato que transfieren equivalentes reducidos a los sitios 1 y 2 de la cadena transportadora de electrones respectivamente. El ATP producido saldría al citosol donde bloquearía los canales K_{ATP} que produciría una despolarización de la membrana plasmática, esta despolarización un incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular y secreción de insulina (85).

Esta última hipótesis tiene varios aspectos atractivos pero también abre nuevas preguntas. Por un lado, apoya la idea de que la secreción de insulina producida por un sustrato oxidable, está unida a un estado reducido de los islotes pancreáticos (7,86,87). También explicaría por qué la glucosa y el gliceraldehido estimulan la secreción de insulina mientras que el piruvato y el lactato no lo hacen (83,84). Este concepto es consistente con las observaciones sobre las actividades de la glicerol fosfato deshidrogenasa mitocondrial y la lanzadera malato-aspartato que exceden mucho las de otros tejidos (87,88,89). Por otro lado, hay otra serie de observaciones que son más difíciles de reconciliar con este papel especial del ATP derivado exclusivamente del transporte de NADH del citosol a la mitocondria. Primero, el 2-cetoisocaproato y los metil esterres del succinato provocan secreción de insulina a pesar del hecho de que producen ATP y NADH a través de su metabolismo exclusivamente mitocondrial en el ciclo de Krebs. Segundo, el fallo del piruvato para desencadenar la secreción de insulina podría ser por su supuesta preferencia a convertirse en lactato oxidando NADH, como sugiere el incremento de 4.4 veces de lactato en el medio al incubar los islotes con 30 mM de piruvato (84). Parecen necesarios más estudios sobre el papel del NADH glicolítico, aunque los datos apuntan a que posiblemente ningún mediador individual sería suficiente para explicar el proceso de la secreción de insulina producido por sustratos oxidables.

En las células β de los islotes pancreáticos, el transporte de equivalentes reducidos entre el citosol y la mitocondria ha sido propuesto como un paso crítico entre el metabolismo de los sustratos y la iniciación de la secreción de insulina (7). La FAD L-glicerol-3 fosfato deshidrogenasa mitocondrial está asociada a la superficie exterior de la membrana mitocondrial interna en células de mamíferos (90). Este enzima junto a la

NAD⁺ L-glicerol-3 fosfato deshidrogenasa citosólica, forman los componentes de la lanzadera de glicerol-3 fosfato (figura 2) que hace posible que el NADH citosólico se oxide en la cadena respiratoria mitocondrial (91). Se propuso que la diferencia en cuanto a la capacidad de desencadenar la secreción de insulina entre la glucosa y el gliceraldehido con respecto al piruvato o lactato podría ser el resultado de las propiedades de las lanzaderas que regulan la transferencia intracelular de equivalentes reducidos (7). La lanzadera de L-glicerol-3 fosfato podría tener un papel relevante en este transporte ya que la dihidroxiacetona fosfato, sustrato de la L-glicerol-3 fosfato deshidrogenasa citosólica, se cree que aumenta en respuesta al incremento del flujo glicolítico en islotes estimulados por glucosa (92); mientras que el piruvato no incrementaría los niveles de triosas fosfato al no expresarse la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa en islotes (23). Parece ser que las células β pancreáticas tienen un contenido alto de L-glicerol-3 fosfato deshidrogenasa mitocondrial (88,93) y que este enzima muestra sensibilidad a los iones Ca⁺ (93). Este hecho podría tener especial importancia fisiológica, ya que el incremento de la secreción de insulina está invariablemente asociado con un incremento en la concentración de Ca²⁺ citosólico libre (94,95).

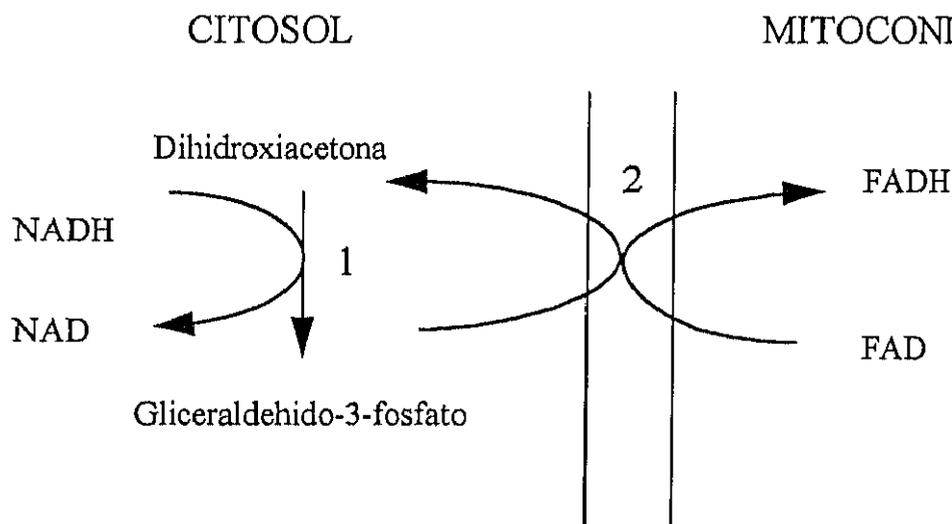


Figura 2. Lanzadera L-glicerol-3-fosfato. (1) L-glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (NAD⁺ dependiente); (2) L-glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (flavin dependiente)

La células β de los islotes tiene otra lanzadera la lanzadera malato/aspartato cuya función podría ser la de oxidar el NADH citosólico. La capacidad de esta lanzadera

parece ser bastante mayor que la del glicerol-3-fosfato al comparar sus actividades enzimáticas (88,89). Existe controversia en cuanto al sentido en el que esta lanzadera trabaja y se ha propuesto que esta lanzadera se encargaría de transportar NADH desde la mitocondria al citoplasma en lugar del sentido contrario (96) sugerencia que necesita ser corroborada (89).

EL DESTINO DEL PIRUVATO

El piruvato se forma en los islotes principalmente como producto final de la glicolisis. Los destinos del piruvato pueden ser varios. El piruvato es convertido a lactato por la reacción catalizada por el enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Desde el punto de vista cuantitativo, parece ser que el ácido láctico es el principal producto final del catabolismo de la hexosa en islotes pancreáticos (7). La formación de lactato se incrementa con la concentración de glucosa, aunque existe cierta discrepancia cuantitativa, aún sin resolver, sobre su relación dosis-respuesta. Por un lado hay autores que observan que la producción de lactato se incrementa al aumentar la concentración de glucosa, encontrando que la formación de lactato tiene un valor de Km para la glucosa alto, de alrededor de 10 mM (97). Así, islotes aislados incubados en un medio conteniendo una concentración de glucosa subestimuladora de la secreción de insulina (4-5 mM), producen entre 9 (97) y 62 (98) pmol lactato/islxh. La producción de lactato se incrementaría de dos a seis veces, pasando a 50 (97) o 121 (98) pmol lactato/islxh cuando el medio contiene 17 mM de glucosa. Otros autores observan que la formación de lactato ocurre con una Km para la glucosa baja alrededor de 2 mM (99), pasando de 35 pmol lactato/islxh con 5.5 mM de glucosa a 41 pmol lactato/islxh con 16,7 mM de glucosa. Parece que la relación cuantitativa entre la formación de lactato y la concentración de glucosa en islotes pancreáticos no está todavía universalmente consensuada.

Otra posibilidad estudiada es la salida del piruvato al medio extracelular aunque, en cualquier caso, sería una ruta minoritaria comparada con la producción de lactato. Existe cierta discrepancia en cuanto al incremento de la producción de lactato con respecto a la producción de piruvato. Según datos publicados (100), tanto la producción de lactato como la de piruvato se incrementan con la concentración de glucosa, pasando

de 1.02 a 2.48 pmol/min.isl y de 0.16 a 0.49 pmol/min.isl respectivamente al incrementar la concentración de glucosa de 0 a 15 mM. La producción de piruvato sería proporcional a la de lactato, con una relación lactato/piruvato 4:1 independiente de la presencia de glucosa (100). Otros datos señalan que la producción de piruvato, medida como el contenido total del piruvato de los islotes más el del medio de incubación, no se incrementa con la concentración de glucosa, a pesar de que la formación de lactato aumenta con concentraciones altas de la hexosa; por lo que la relación lactato/piruvato se incrementa de 7 a 12 al elevar la concentración de glucosa de 11.1 a 27.8 mM (101).

Destino mitocondrial del piruvato

Un incremento en la concentración extracelular de glucosa produce una estimulación preferencial de la glicolisis aerobia respecto a la velocidad glicolítica total (101). La velocidad de descarboxilación del piruvato, así como la de oxidación de residuos de acetil-CoA aumenta, incluso expresadas en porcentaje de la velocidad total de glicolisis (103,104).

El piruvato formado a partir de glucosa, tras ser transportado a través de la membrana mitocondrial, puede entrar en el metabolismo mitocondrial por cualquiera de la siguientes rutas:

1. por su carboxilación a oxalacetato en la mitocondria catalizado por la piruvato carboxilasa
2. por su descarboxilación a acetil-coA catalizada por la piruvato deshidrogenasa (PDH) en la mitocondria.

Los islotes contienen cada una de estas enzimas. Evidencias recientes, implican a la PDH como una de los enzimas envueltos en el metabolismo de la glucosa (105). Este enzima está regulado por factores que controlan la cantidad de enzima activo (forma no fosforilada), a través de sus efectos sobre las actividades piruvato deshidrogenasa quinasa (PDH quinasa) y piruvato deshidrogenasa fosfato fosfatasa (PDH fosfato fosfatasa) (105). La PDH quinasa es inhibida por piruvato y ADP y activada por incrementos en los cocientes NADH/NAD⁺ y acetil-CoA/CoA (106). La PDH fosfatasa es activada por Mg²⁺ y por Ca²⁺, lo que hace de la PDH uno de los enzimas que junto con la 2-cetoglutarato

deshidrogenasa y la isocitrato deshidrogenasa pueden ser activados por un incremento en la concentración de Ca^{2+} (104,105,107). El incremento de la concentración extracelular de glucosa produce un incremento de la cantidad de PDH activa (no fosforilada) en islotes, posiblemente debido a un incremento en la concentración de Ca^{2+} (105), aunque actualmente se duda si la activación de la PDH es una causa o una consecuencia del incremento de Ca^{2+} citosólico. La estimulación preferencial de la etapa oxidativa mitocondrial de la glucosa en el ciclo de Krebs anteriormente señalada, podría estar determinada por la activación de las deshidrogenasa mitocondriales por calcio (104,105).

La evidencia de que los islotes contenían una cantidad de piruvato carboxilasa comparable a la que presentan los tejido gluconeogénicos, junto con el hecho de que los islotes no llevan a cabo la gluconeogénesis, sugirió la existencia y funcionamiento de la lanzadera piruvato/malato en islotes (108) (figura 3). En esta lanzadera el piruvato entraría a la mitocondria y sería convertido a oxalacetato por la piruvato carboxilasa. El oxalacetato sería convertido a malato, el cual saldría al citosol donde sería descarboxilado a piruvato en una reacción catalizada por el enzima málico que produce NADPH en el citoplasma. El piruvato entonces re-entraría en la mitocondria donde podría participar en la lanzadera otra vez o podría descarboxilarse a acetil-coA y oxidarse. Según este autor, la mitad del piruvato producido a partir de glucosa se metaboliza vía carboxilación y la otra mitad vía descarboxilación. Esta lanzadera tendría una función anaplerótica, de relleno de los intermediarios del ciclo tricarboxílico, de tal forma que la mitocondria estaría dispuesta a responder inmediatamente a cambios en la concentración de glucosa extracelular (108,109,110).

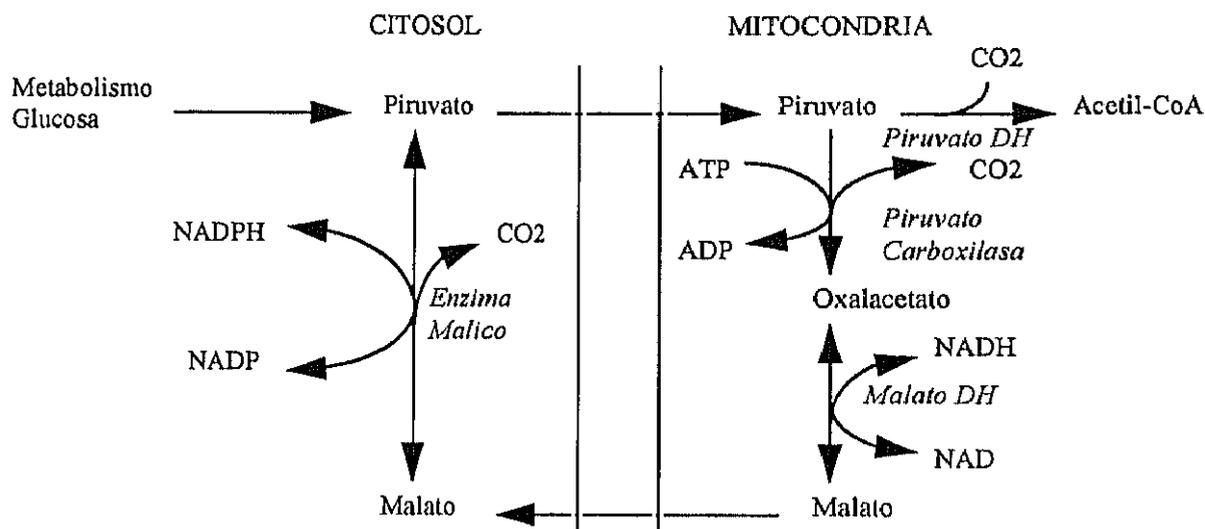


Figura 3. Lanzadera Piruvato/malato y descarboxilación del piruvato.

Malaisse y cols (40,102) observaron que el $^{14}\text{CO}_2$ producido a partir de [3,4- ^{14}C]glucosa o [1- ^{14}C]piruvato, que representaría la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ en la reacción catalizada por la piruvato deshidrogenasa, es mayor que el $^{14}\text{CO}_2$ producido a partir de [6- ^{14}C]glucosa o [3- ^{14}C]piruvato, que representaría la liberación del $^{14}\text{CO}_2$ en el ciclo de Krebs. Estos datos se interpretaron como que la velocidad de descarboxilación del piruvato representaría el doble de la velocidad de oxidación de los residuos de acetil-coA (102). Estos resultados le llevaron a sugerir que una fracción importante de acetil-coA formado escaparía de la oxidación completa. El destino de este acetil-coA remanente, según el autor, sería por una parte, su incorporación a aminoácidos y el resto sería usado como sustrato para la lipogénesis (84). Aunque tiene en cuenta la posibilidad de que parte del $^{14}\text{CO}_2$ producido a partir de [^{14}C]glucosa podría ser generado en el ciclo de Krebs tras la conversión del [^{14}C]piruvato en oxalacetato vía piruvato carboxilasa, considera esta ruta minoritaria (102). Pero como hemos visto anteriormente (108,109,110), en estudios cronológicamente posteriores a los realizados por *Malaisse y cols*, se puso de manifiesto la existencia de una alta actividad de la piruvato carboxilasa de tal forma que la mitad del piruvato producido a partir de glucosa se metaboliza vía carboxilación y la otra mitad vía descarboxilación (109,110). Por lo que podría considerarse que la estimación de la cantidad de acetil-CoA generada a partir de [3,4- ^{14}C]glucosa podría estar sobrevalorada.

Objetivos

OBJETIVOS

- Estudiar la relación entre la concentración de glucosa y la producción de lactato en los islotes de Langerhans, con la ayuda de un método directo de medición de lactato.

- Caracterizar la producción insular de lactato a partir de glucosa como medida de glicolisis y estudiar su comportamiento frente a distintos inhibidores de la glicolisis y la fosforilación de la glucosa.

- Estudiar la contribución cuantitativa del metabolismo oxidativo y de la producción de lactato a la velocidad global de utilización de glucosa en islotes de Langerhans. Relacionar estos parámetros con la secreción de insulina inducida por glucosa.

- Investigar la dependencia de la glicolisis con respecto a la producción mitocondrial de ATP, utilizando inhibidores de la función mitocondrial que producen un descenso en la concentración de ATP e investigar como afecta este descenso a:

1. la velocidad global de glicolisis medida como detritiación de [5-³H]glucosa y determinar si los islotes de Langerhans presentan o no efecto Pasteur.

2. la fosforilación de la glucosa medida como detritiación de [2-³H]glucosa.

Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

AISLAMIENTO DE ISLOTES DE LANGERHANS.

Lacy y Kostianosvky en 1967 (111) describieron un método para aislar los islotes de Langerhans, consistente en la digestión del páncreas con colagenasa. Este enzima hidroliza el colágeno liberando los islotes del tejido exocrino, que pueden entonces separarse uno a uno mediante una micropipeta y con la ayuda de un microscopio de disección (x25). Los islotes así separados permiten estudiar su función secretora endocrina independientemente de la función exocrina.

1. Materiales.

- Ratas Wistar macho (Iffa-credo) peso entre 250-300 g.
- Pilocarpina 4%
- Colagenasa Tipo P (Boehringer Mannheim GmbH, Germany)
- Solución de Hanks: Solución salina fisiológica cuya composición es la siguiente:

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

Ajustado a pH 7,4 con solución de NaHCO₃ al 8,4%.

2. Método.

Se utilizan ratas Wistar macho, alimentadas con dieta standard y con un peso corporal de alrededor de 250 gr. Se les inyecta Pilocarpina al 4% (0,1 ml por 100 gr de peso) vía intraperitoneal una hora antes de empezar el experimento. Este tratamiento se realiza para provocar una secreción exocrina masiva de enzimas proteolíticos, evitando así su presencia en el proceso de aislamiento de islotes. Se ha descrito que este tratamiento con pilocarpina no altera la función endocrina y aumenta el rendimiento en

la obtención de islotes.

Se procede a la decapitación del animal tras ser anestesiado con éter. Se realiza una incisión abdominal descubriendo la cavidad abdominal y procediendo rápidamente a la extracción del páncreas. Una vez eliminado el tejido adiposo adyacente se trocea el páncreas finamente con unas tijeras. Los trozos de páncreas se llevan a un volumen de 5 ml de solución de Hanks en un vial de centelleo que contiene 15 mg de colagenasa. El vial es agitado vigorosamente en un baño de agua de temperatura constante (37°C) durante 3 minutos. El tiempo de la digestión puede variar sensiblemente según el lote de colagenasa, por lo que se ha de controlar cuidadosamente ya que una prolongación del tiempo puede dar como resultado la obtención de islotes no funcionales desde el punto de vista metabólico y secretor. La digestión se detiene transvasando la papilla pancreática a un vial grande donde se diluye con solución de Hanks (45 ml) a temperatura ambiente.

Se agita durante unos segundos y se deja reposar 5 minutos para permitir la sedimentación de los islotes. Se aspira el 80% del sobrenadante y se vuelve a repetir el lavado un par de veces más. Tras el último lavado se toman alícuotas del volumen residual y se analizan en una placa de Petri bajo una lupa con luz transmitida (Zeiss).

Los islotes son reconocidos por sus formas redondeadas u ovoidales, por su coloración marrón claro y su superficie homogénea. Los islotes se separan de los restos del tejido exocrino mediante una pipeta capilar y son trasladados a otra placa de Petri con solución de Hanks, desde donde se distribuirán según necesidades.

SISTEMA DE PERIFUSIÓN.

1. Medio de perfusión:

Se utilizó Krebs-Ringer bicarbonato:

| | |
|--------------------------------------|---------|
| NaCl | 115 mM |
| KCl | 4,7 mM |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 2,56 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1,2 mM |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 1,2 mM |
| NaHCO ₃ | 5 mM |

Se añaden 2 ml de HEPES (ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico) 1 M por cada 90 ml de Krebs-Ringer bicarbonato y se ajusta el pH a 7,4 con NaOH 2M.

Finalmente se disuelve albúmina bovina fracción V libre de ácidos grasos (Boehringer Mannheim) hasta una concentración final de 0,5 % y glucosa (Merck) según la concentración deseada.

2. Aparato de perfusión.

Se utilizó un diseño de doble vía en paralelo que permite confrontar cada experimento con su control correspondiente.

Cada vía consta de dos reservorios de medio de perfusión conectados mediante catéteres de tygon a una válvula que deja pasar el flujo de uno u otro reservorio según su posición. Ambos reservorios se encuentran sumergidos en un baño termostático a 37°C. Uniendo la válvula y la cámara de perfusión se encuentra un tubo de conexión que se sumerge en el baño a 37°C. La cámara se conecta con otro catéter de tygon a una bomba peristáltica (modelo Multipex LKB) que se regula a un flujo constante de 0,5 ml/min.

La cámara de perfusión consta de dos aperturas: una por donde entra el catéter procedente de la válvula y otra donde, tras colocar los 40 islotes que se van a perfundir, se instala el catéter de salida hacia la bomba peristáltica. Los islotes se colocan sobre un filtro de nylon y en el inicio del catéter de salida se coloca otro filtro, del tal forma que los islotes quedan colocados en una pequeña cámara cerrada en los extremos por dos filtros.

3. Patrones de perfusión.

En todos los casos se perfunden los islotes con glucosa 3 mM o en ausencia de sustrato durante un período de 30 minutos (período de estabilización). A continuación se perfunde con un estímulo (glucosa 20 mM o D-gliceraldehído a distintas concentraciones) durante 30 minutos (período de estimulación). Por último se vuelve a perfundir con 3 mM de glucosa o ausencia de sustrato durante 30 minutos, el restablecimiento de las condiciones iniciales pretende la recuperación del nivel basal de

secreción, lo cual es un buen indicador de la viabilidad de los islotes perifundidos .

ESTUDIOS METABÓLICOS.

A. UTILIZACIÓN DE GLUCOSA.

La velocidad de utilización de glucosa se calcula midiendo la producción de $^3\text{H}_2\text{O}$ por los islotes a partir de D-[^5H]glucosa (21). Este método está basado en la liberación del ^3H de la [$5\text{-}^3\text{H}$]glucosa en forma de agua tritiada durante la reacción catalizada por la triosa fosfato isomerasa; en caso de que la reacción no estuviera en equilibrio completamente, existe una oportunidad posterior de liberar el ^3H de esa posición en forma de agua tritiada en la reacción catalizada por la enolasa. Así, este método mide la velocidad global de glicolisis.

1. Materiales.

- Krebs Ringer-Hepes-bicarbonato
- Albúmina, fracción V libre de ácidos grasos (Boehringer Mannheim)
- Glucosa. H_2O (Merck)
- HCl 0,2 M (Merck)
- D-[^5H]glucosa (Amersham Int.)
- [^3H] H_2O (Du Pont de Nemours, Germany)
- Líquido de centelleo (Ecolite, Nuclear Ibérica)

2. Método.

Se liofilizan 10 μl de D-($5\text{-}^3\text{H}$)-Glucosa con el fin de eliminar cualquier cantidad de [^3H]agua presente. Se redisuelve en 200 μl de Krebs Ringer-Hepes bicarbonato conteniendo 0,5% de albúmina libre de ácidos grasos y glucosa 3 ó 20 mM (actividad específica 16,6 y 2,5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{M}$ respectivamente). Se pipetea 20 μl en tubos eppendorf en cada uno de los cuales se transfieren 20 islotes y se cierran. Estos tubos se incuban a 37°C durante 2 horas deteniéndose la incubación al añadir 5 μl de ClH 0,2 M. Tras la detención se introducen los eppendorf abiertos en viales de centelleo que contienen 0,5 ml de agua destilada y que se cierran herméticamente. Se incuban durante 12 horas a 37°C para

permitir un equilibrio de reparto del $^3\text{H}_2\text{O}$ formada entre el eppendorf y el vial de centelleo. Una vez retirado el eppendorf se añaden 5 ml de líquido de centelleo al vial y se cuenta su radiactividad en un contador β Tri-carb, modelo 2500TR (Packard), durante un minuto.

En cada experimento se procesó un vial de cada medio de incubación sin islotes (blancos) cuya radiactividad expresa la producción espontánea de $^3\text{H}_2\text{O}$. La actividad específica de la glucosa marcada se calculó midiendo la radiactividad en alícuotas de 5 μl del medio.

Los resultados se expresaron como pmol de equivalentes de glucosa utilizada según la siguiente fórmula:

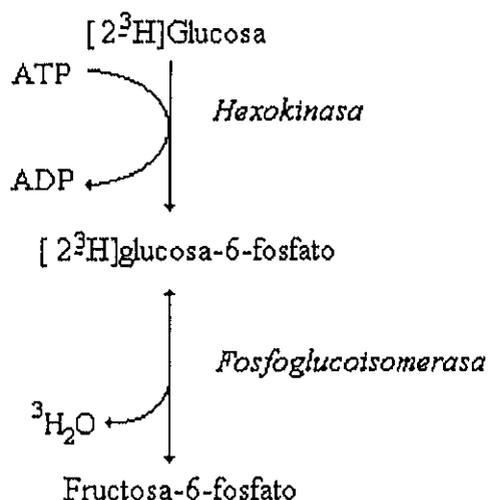
$$\text{Glu. util. (pmoles)} = \frac{{}^3\text{H}_2\text{O formada (cpm)}}{\text{Ac. específica de [5-}^3\text{H]glucosa (cpm/pmol)}}$$

Para expresar la utilización de glucosa por islote y por hora basta con dividir los pmoles por 2 (horas de incubación) y por 20 (nº de islotes).

La recuperación de $^3\text{H}_2\text{O}$ añadida exogenamente resultó ser $79,2 \pm 1,8 \%$ (n=9).

B. FOSFORILACIÓN DE GLUCOSA.

La velocidad de fosforilación de glucosa se calcula midiendo la producción de $^3\text{H}_2\text{O}$ por los islotes a partir de D-[2- ^3H]glucosa (21). Este método está basado en la liberación del ^3H de la [2- ^3H]glucosa en forma de agua tritiada durante la reacción catalizada por la fosfoglucoisomerasa, y supone que este proceso es casi instantáneo en relación con la fosforilación de glucosa. (esquema 1).



Esquema 1. Liberación del ^3H de la $[2\text{-}^3\text{H}]$ glucosa en forma de agua tritiada durante la reacción catalizada por la fosfoglucoisomerasa.

1. Materiales.

- Krebs-Hepes
- Albúmina, fracción V libre de ácidos grasos (Boehringer Mannheim)
- Glucosa (Merck)
- HCl 0,2 M (Merck)
- D- $[2\text{-}^3\text{H}]$ glucosa (Amersham Int.)
- $(^3\text{H})\text{H}_2\text{O}$ (Du Pont de Nemours, Germany)
- Líquido de centelleo (Ecolite, Nuclear Ibérica)

2. Método.

Se liofilizan 10 μl de D- $[2\text{-}^3\text{H}]$ glucosa y se redisuelve en 200 μl de Krebs-Hepes conteniendo 0,5% de albúmina libre de ácidos grasos y glucosa 3 mM ó 20 mM (actividad específica 16,6 y 2,5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ respectivamente). Se pipetea 20 μl en tubos eppendorf en cada uno de los cuales se transfieren 20 islotos y se cierran. Estos tubos se incuban en un baño termostático a 37°C durante 2 horas deteniéndose la incubación al

añadir 5 µl de ClH 0,2 M. Tras la detención se introducen los eppendorf abiertos en viales de centelleo que contienen 0,5 ml de agua destilada y que se cierran herméticamente. Se incuban durante 12 horas a 37°C para permitir un equilibrio de reparto del $^3\text{H}_2\text{O}$ formada entre el eppendorf y el vial de centelleo. Una vez retirado el eppendorf se añaden 5 ml de líquido de centelleo al vial y se cuenta su radiactividad en un contador β Tri-carb, modelo 2500TR (Packard), durante un minuto.

En cada experimento se procesó un vial de cada medio de incubación sin islotes (blancos) cuya radiactividad expresa la producción espontánea de $^3\text{H}_2\text{O}$. La actividad específica de la glucosa marcada se calculó midiendo la radiactividad en alícuotas de 5 µl del medio.

Los resultados se expresaron como pmol de equivalentes de glucosa fosforilada según la siguiente fórmula:

$$\text{Glu. fosforilada. (pmoles)} = \frac{{}^3\text{H}_2\text{O formada (cpm)}}{\text{Ac. específica de [2-}^3\text{H]glucosa (cpm/pmol)}}$$

Para expresar la fosforilación de glucosa por islote y por hora basta con dividir los pmoles por 2 (horas de incubación) y por 20 (nº de islotes).

La recuperación de $^3\text{H}_2\text{O}$ añadida exogenamente resultó ser 79,2 + 1,8 % (n=9).

C. OXIDACIÓN DE D-[U- ^{14}C]GLUCOSA

La velocidad de oxidación de glucosa se calcula midiendo la producción de $^{14}\text{CO}_2$ por los islotes a partir de D-[U- ^{14}C]glucosa (21).

1. Materiales.

- D-[U- ^{14}C]glucosa (Amersham Int.)
- Bicarbonato sódico, $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (Du Pont de Nemours, Germany)
- Glucosa (Merck)
- Buffer fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,4 M + KH_2PO_4 0,4 M) pH=6.
- Rotenona 10µM.

- Hidróxido de Hiamina (Du Pont de Nemours, Germany)
- Líquido de centelleo (Ecolite, Nuclear Ibérica S.A., España)

2. Método.

Se liofilizan 100 μl de D-[U- ^{14}C]glucosa (320 mCi/mmol) y se redisuelven en 200 μl de Krebs-Hepes conteniendo 0,5% de albúmina bovina y glucosa 3 ó 20 mM (16,6 y 2,5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ respectivamente). Se pipetea 20 μl en tubos eppendorf, a cada uno de los cuales se transfieren 20 islotes y se incuban durante 2 horas a 37°C. Se detiene la incubación añadiendo 20 μl de buffer fosfato con rotenona 10 μM . Tras la detención, cada eppendorf se introduce abierto en un vial de centelleo que contiene un papel de filtro y 0,5 ml de la solución de hidróxido de hiamina (amina cuaternaria de elevado peso molecular, usada para atrapar el $^{14}\text{CO}_2$ desprendido en forma de carbamato). El $^{14}\text{CO}_2$ desprendido por el buffer fosfato se recoge en la hiamina durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se retira el eppendorf, se añaden 5 ml de líquido de centelleo al vial y se cuenta la radiactividad en un contador β , Tri-carb, modelo 2500TR (Packard), durante un minuto.

En cada experimento se procesó un vial de cada medio de incubación sin islotes (blancos), cuya radiactividad expresa la producción espontánea de $^{14}\text{CO}_2$. La actividad específica de la glucosa marcada se calculó midiendo alícuotas de 5 μl del medio de incubación por triplicado.

los resultados se expresaron como pmol de equivalentes de glucosa oxidada según la siguiente fórmula:

$$\text{Glu. oxid. (pmoles)} = \frac{{}^{14}\text{CO}_2 \text{ formada (c.p.m.)}}{\text{Ac. específica de } [{}^{14}\text{C}] \text{ glucosa (c.p.m./pmol)}}$$

Para expresar la oxidación de glucosa por islote y por hora basta con dividir los pmoles por 2 (horas de incubación) y por 20 (n° de islotes).

D. OXIDACIÓN [1-¹⁴C]GLUCOSA Y [6-¹⁴C]GLUCOSA: VÍA PENTOSAS FOSFATO.

La producción de ¹⁴CO₂ por los islotes a partir de D-[1-¹⁴C]glucosa (54 mCi/mmol) y D-[6-¹⁴C]glucosa (60 mCi/mmol) (Amersham Int.) se midió como en el apartado anterior.

Los cambios en la producción de ¹⁴CO₂ a partir de D-[1-¹⁴C]glucosa y D-[6-¹⁴C]glucosa se calcularon como pmol de glucosa oxidada/pmol de glucosa utilizada, para ello es necesario determinar la velocidad de utilización de glucosa. La contribución del ciclo de las pentosas fosfato al metabolismo de la glucosa en los islotes pancreáticos se calculó según la ecuación de Katz & Wood (112):

$$\frac{G1_{CO_2} - G6_{CO_2}}{1 - G6_{CO_2}} \cdot \frac{3P}{1 + 2P}$$

Donde G1_{CO₂} representa la cantidad de [1-¹⁴C]glucosa oxidada respecto a la utilizada y G6_{CO₂} representa la cantidad de [6-¹⁴C]glucosa oxidada respecto a la utilizada y P es el factor que indica la contribución porcentual de la vía de la pentosas a la velocidad global de utilización de la glucosa, de tal forma que, el valor absoluto de la glucosa metabolizada vía pentosas fosfato se calcula:

Glucosa utilizada (pmol glu/islxh) x P = pmol glucosa/islxh metabolizada por la vía pentosas fosfato.

Con el fin de incrementar la glucosa metabolizada por la vía de las pentosas fosfato se añadió al medio de incubación menadiona a una concentración 10 μM, concentración en la que el único efecto sobre parámetros metabólicos es reducir la concentración de NADH y NADPH (101).

E. OXIDACIÓN DE OTROS SUSTRATOS:

La velocidad de oxidación de cada uno de los distintos sustratos se calcula midiendo la producción de $^{14}\text{CO}_2$ por los islotes a partir de su correspondiente (^{14}C)-Sustrato. En general, el procedimiento es el siguiente:

1. Materiales.

- [^{14}C]Sustrato
- Bicarbonato sódico, $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (Du Pont de Nemours, Germany)
- Hidróxido de Hiamina (Du Pont de Nemours, Germany)
- Líquido de centelleo (Ecolite, Nuclear Ibérica S.A., España)
- Buffer fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,4 M + KH_2PO_4 0,4 M) pH 6.
- Rotenona 20 μM , β -iodoacetamida 2 mM.
- D-gliceraldehido (Merck), L-glutamina (Fluka), piruvato (Boehringer Mannheim), L-leucina (Sigma), L-Alanina (Fluka), L-lisina (Sigma), L-prolina (Sigma), según el sustrato marcado.

1. D-[U- ^{14}C]GLICERALDEHIDO.

Se liofilizan 100 μl de D-[U- ^{14}C]gliceraldehido (150 mCi/mmol) (American Radiolabeled Chemicals. U.S.A) y se redisuelven en 200 μl de Krebs-Hepes conteniendo 0,5% de albúmina bovina y gliceraldehido 1, 5 o 10 mM (50, 10, o 5 mCi/mmol respectivamente).

2. L-[U- ^{14}C]GLUTAMINA.

Se liofilizan 120 μl de L-[U- ^{14}C]glutamina (293 mCi/mmol) (Amersham Int.) y se redisuelven en 120 μl de Krebs-Hepes conteniendo 0,5% de albúmina bovina y glutamina 10 mM (5 mCi/mmol).

3. [2-¹⁴C]PIRUVATO.

El [2-¹⁴C]piruvato (Du Pont de Nemours, Germany) (10.8 mCi/mmol) se encuentra almacenado en forma sólida para reducir su tasa de descomposición. Para utilizarlo es necesario disolverlo en agua, dividirlo en alícuotas según las necesidades y desecarlo bajo atmósfera de nitrógeno. Cada alícuota de 10 µl (5 µCi) se redisuelven en 100 µl de Krebs-Hepes conteniendo 0,5% de albúmina bovina y piruvato 1, 10 o 20 mM (50, 5, 2,5 mCi/mmol respectivamente).

4. L-[U-¹⁴C]LEUCINA.

Se liofilizan 120 µl de L-[U-¹⁴C]leucina (240 mCi/mmol) y se redisuelven en 120 µl de Krebs-Hepes conteniendo 0,5% de albúmina bovina y leucina 10 mM (5 mCi/mmol).

5. L-[U-¹⁴C]ALANINA.

Se liofilizan 120 µl de L-[U-¹⁴C]alanina (154 mCi/mmol) y se redisuelven en 120 µl de Krebs-Hepes conteniendo 0,5% de albúmina bovina y alanina 10 mM (5 mCi/mmol).

6. L-[U-¹⁴C]LISINA.

Se liofilizan 120 µl de L-[U-¹⁴C]lisina (293 mCi/mmol) y se redisuelven en 120 µl de Krebs-Hepes conteniendo 0,5% de albúmina bovina y lisina 10 mM (5 mCi/mmol).

7. L-[U-¹⁴C]PROLINA.

Se liofilizan 120 µl de L-[U-¹⁴C]prolina (283.4 mCi/mmol) y se redisuelven en 120 µl de Krebs-Hepes conteniendo 0,5% de albúmina bovina y prolina 10 mM (5 mCi/mmol).

Método.

Se pipetea 20 μ l de Krebs Ringer-Hepes bicarbonato con el sustrato marcado correspondiente en tubos eppendorf, a cada uno de los cuales se transfieren 20 islotes y se incuban durante 2 horas a 37°C.

Se detiene la incubación añadiendo 20 μ l de buffer fosfato con rotenona 20 μ M y β -iodoacetamida 2 mM. Tras la detención, cada eppendorf se introduce abierto en un vial de centelleo que contiene un papel de filtro y 0,5 ml de la solución de hidróxido de hiamina y que se cierra herméticamente. El $^{14}\text{CO}_2$ desprendido se recoge en la hiamina durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se retira el eppendorf, se añaden 5 ml de líquido de centelleo a cada vial y se cuenta su radiactividad en un contador β , Tri-carb, modelo 2500TR (Packard), durante un minuto.

Igual que en todos los demás experimentos se procesó un vial de cada medio de incubación sin islotes (blancos), cuya radiactividad expresa la producción espontánea de $^{14}\text{CO}_2$. La actividad específica del sustrato marcado se calculó midiendo alícuotas de 5 μ l del medio de incubación por triplicado.

Los resultados se expresaron como pmol de sustrato oxidado según la siguiente fórmula:

$$\text{Sustrato oxidado (pmol)} = \frac{{}^{14}\text{CO}_2 \text{ formada (c.p.m.)}}{\text{Ac. específica de } [{}^{14}\text{C}]\text{sustrato (c.p.m./pmol)}}$$

Para expresar la oxidación del sustrato por islote y por hora basta con dividir los pmoles por 2 (horas de incubación) y por 20 (nº de islotes).

MEDIDA DE LA PRODUCCIÓN DE LACTATO POR ISLOTES AISLADOS.

La cantidad de lactato acumulada es medida por un método de HPLC descrito recientemente (113) con ligeras modificaciones que describimos a continuación.

1. Materiales.

- HClO₄ 1,35 M
- Tris 0,1 M (Boehringer Mannheim) + KHCO₃ 2,8 M.
- D-lactato (Boehringer Mannheim)
- NaOH 50 mM
- Acetonitrilo grado lichrosolv (E. Merk, Germany)
- 18-crown-6 (1,4,7,10,13,16-Hexaoxaciclorooctadenona, Fluka Chemie A. G. Suiza)
- 4-Bromofenacil bromuro (Fluka Chemie A.G. Suiza)
- Columna C₁₈ de fase reversa (8 x 100 mm : 4 μm de tamaño de partícula) con acetonitrilo : agua (30:70 v/v).
- El sistema de HPLC utilizado es de Waters y consiste en un módulo W600 MSDS, un inyector manual U6K, un detector de absorbancia 484 y un registrador M746.

2. Método.

Se pipetea en cada eppendorf 30 μl del medio de incubación (Krebs-Ringer-Hepes bicarbonato) conteniendo 0,5% de albúmina libre de ácidos grasos y el sustrato correspondiente (glucosa, gliceraldehído etc). Se transfieren 30 islotes a cada eppendorf y se incuban 2 horas a 37°C. A continuación se sacan los eppendorf del baño y se introducen en hielo con el fin de detener los procesos metabólicos. Tras centrifugar ligeramente y sedimentar los islotes, se toma una alícuota (25 μl) del medio de incubación de cada eppendorf, teniendo cuidado para no llevarse los islotes, y se desproteinizan con 20 μl de HClO₄ 1,35 M. El exceso de HClO₄ se precipita y se neutraliza con 15 μl de Tris 0,1 M y KHCO₃ 2,8 M. Después de centrifugar, una alícuota (40 μl) del sobrenadante se deposita en pequeños viales de vidrio. A cada uno de estos viales se les añade 20 μl de NaOH (200 mM) para favorecer la formación de Lactato sódico y se desecan en vacío durante la noche.

La derivatización se realiza mediante la adición al residuo seco de acetonitrilo (200 μl) conteniendo 5 nM de 18-crown-6 (agente catalítico para la solubilización del lactato en la fase orgánica) y 100 nM de 4-bromofenacil bromuro (para su esterificación con el

lactato). Tras 10 minutos de agitación suave, la mezcla se incubaba a 80°C durante 20 minutos en los viales tapados herméticamente. Las muestras se almacenan en congelador hasta el momento de su separación cromatográfica.

El éster del lactato formado es separado isocráticamente (tiempo de retención aproximadamente 6,6 minutos) en una columna C_{18} de fase reversa con acetonitrilo:agua (30:70 v/v) y es cuantificado por su absorción de luz a 260 nm. Una vez separado el éster del lactato, se lava la columna con acetonitrilo:agua (70:30 v/v) durante 15 minutos y se vuelve a las condiciones iniciales. El volumen de inyección es de 20 μ l y el tiempo entre cada muestra es de 27 minutos (figura 4). Como standard se usó D-Lactato (sal de litio) disuelto en medio de incubación (25 a 200 μ M) y tratado igual que las muestras. El piruvato no es significativamente derivatizado y no interfiere en la derivatización del Lactato. El piruvato incubado con lactato deshidrogenasa y NADH en el medio de incubación es estequiométricamente recuperado como lactato tras la derivatización y la cromatografía. Todos los intentos realizados para conseguir demostrar la conversión de lactato en piruvato fallaron debido a que los buffer (Hidrazina, Glutamato) o los reactivos requeridos para este equilibrio desfavorable, interferían con la derivatización del ácido láctico en las muestras tratadas y no fue posible obtener ninguna curva standard bajo esas condiciones.

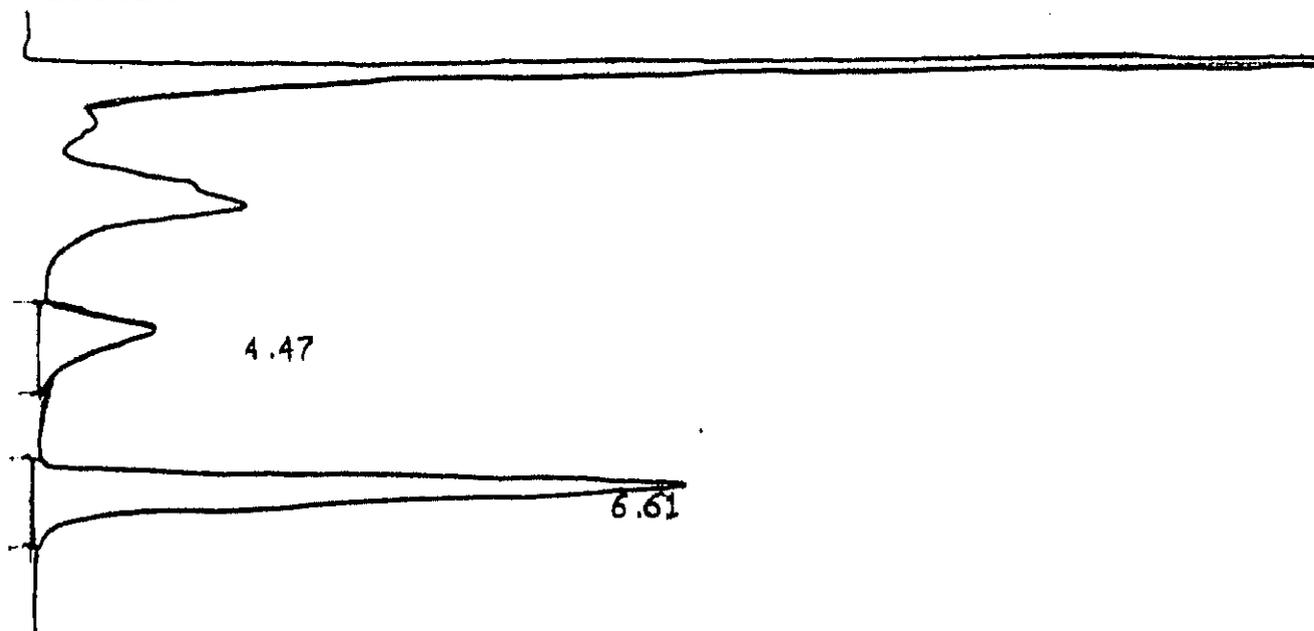


Figura 4. Separación cromatográfica del éster de lactato. Tiempo de retención 6,61 minutos

SALIDA PIRUVATO

1. Materiales.

- Piruvato (Boehringer Mannheim)
- NADH (Boehringer Mannheim)
- D-lactato (Boehringer Mannheim)
- Lactato Dehidrogenasa (LDH) (Boehringer Mannheim)

2. Método.

la cuantificación del piruvato acumulado en el medio de incubación se realizó de la siguiente manera. Incubamos durante 2 horas 60 islotes en 60 μ l de KRB pH 7,4 conteniendo glucosa 20 mM. El medio de incubación fue dividido en dos fracciones de 20 μ l cada una. A cada una de las fracciones se le añadió 5 μ l del medio de incubación conteniendo 5 mM de NADH y 54 U/l de LDH. Una de la alícuotas fué incubada durante 120 minutos a 37°C y la otra fué directamente desproteinizada sin incubación. En la fracción incubada se realizó la reacción:



Según exista un exceso de NAD^+ o de NADH se podrá desplazar la reacción hacia la formación de piruvato o de lactato. Obviamente, puesto que el H^+ es un reactante, el pH del medio influye decisivamente en la marcha de la reacción. A pH 7,4 el equilibrio está muy desplazado hacia la formación de lactato.

Tras el periodo de incubación de dos horas, en el que el piruvato existente se ha convertido en lactato, se mide, por el método de HPLC descrito, el lactato total incrementado. La cantidad de piruvato acumulado fué calculado como la diferencia del contenido de lactato entre ambas alícuotas, medido con el método de H.P.L.C. Soluciones equimolares de piruvato sódico y D-lactato monolitio (25 a 400 μ M) en medio de incubación fueron tratadas como muestras y usadas rutinariamente como standards en

cada determinación. La conversión piruvato a lactato es estequiométrica.

MEDIDA DEL CONTENIDO DE DNA.

El DNA fue medido en cada grupo de islotes incubado para medir cualquiera de los parámetros metabólicos descritos anteriormente. Para ello, los islotes son lavados con 100 μ l NaOH (5 mM) y centrifugados. Tras repetir el lavado un par de veces más, los islotes son sonicados en un volumen final de 100ul. Alícuotas de 40 μ l son pipeteadas en tubos 7 x 40 mm y desecadas para la determinación fluorométrica de DNA(114).

1. Materiales.

- 5mM NaOH
- 1 M PCA
- 1 M HCl
- (a) 10 mM Na₂CO₃ x 1 M NaOH
- (b) 20% (w/v) DABA x 2 HCl (ácido 3,5 diamino benzoico dihidroclorídrico)
- Filtros 0,22 μ m (tipo millex-GS, Millipore S.A.).
- DNA (Boehringer Mannheim)

.Preparación de DABA 20% (w/v): Se disuelve 1 g de DABA en 5 ml de H₂O destilada. Se añade 0,05 g de charcoal activado y se centrifuga a 3000 rpm durante 5 minutos repitiéndose el proceso tres veces. Tras el último centrifugado se recoge el sobrenadante y se filtra a través de un filtro de 0,22 μ m.

.Solución fluorescente: Se mezcla 3 volúmenes de (a) con uno de (b) y se incuban durante 60 minutos a temperatura ambiente, justo antes de añadirlo a los standard y a las muestras.

Standard: Partiendo de una solución stock de DNA 1 mg/ml de 5 mM de NaOH se prepara una dilución intermedia de la siguiente manera :

- 20 μ l del stock + 605 μ l NaOH 5mM (0,64 μ g de DNA/20 ml)

A partir de ella se realizan la siguiente serie de diluciones:

- 300 μ l dilución intermedia + 300 μ l NaOH 5 mM : (0,32 μ g DNA/20 ml)
- 300 μ l (0,32 μ g DNA/20 ml) + 300 μ l NaOH 5 mM : (0,16 μ g DNA/20 ml)
- 300 μ l (0,16 μ g DNA/20 ml) + 300 μ l NaOH 5 mM : (0,08 μ g DNA/20 ml)
- 300 μ l (0,08 μ g DNA/20 ml) + 300 μ l NaOH 5 mM : (0,04 μ g DNA/20 ml)
- 300 μ l (0,04 μ g DNA/20 ml) + 300 μ l NaOH 5 mM : (0,02 μ g DNA/20 ml)
- 300 μ l (0,02 μ g DNA/20 ml) + 300 μ l NaOH 5 mM : (0,01 μ g DNA/20 ml)

2. Método.

Se pipetea 20 μ l de cada una de las diluciones standard en tubos 7 x 40 mm. Se añaden 20 μ l de agua destilada a las muestras desecadas. Se añaden 20 μ l de PCA 1 M a los tubos de la curva standard y a las muestras. Se agitan e incuban a 70°C durante 60 minutos. Se añade 40 μ l de la solución fluorescente (Na₂CO₃ en NaOH y DABA . 2HCl). Se vuelve a agitar y a incubar durante otros 60 minutos a 37°C. Se diluye la muestra con 300 μ l de 1 M HCl y finalmente se lee su fluorescencia a 520 nm, tras ser excitada a 405-408nm.

MEDIDA DE LA SECRECIÓN DE INSULINA.

Para la determinación de la concentración de insulina en las muestras se utilizó un método radioinmunológico descrito originariamente por Yalow y Bergson (115).

El fundamento de este método consiste esencialmente en una reacción de competencia entre la insulina de la muestra ("insulina fría") y una cantidad constante de insulina marcada con ¹²⁵I ("insulina caliente") para combinarse con un anticuerpo específico para ellas. La combinación de la insulina marcada con el anticuerpo se puede cuantificar midiendo la radiactividad en la fracción de insulina libre, no combinada con el anticuerpo. Este parametro depende de la concentración de insulina fría, de modo que se puede utilizar la relación existente entre radiactividad en la fracción de hormona libre o combinada al anticuerpo y la cantidad total de insulina fría para la concentración de esta última en las muestras.

A continuación se detalla la preparación de cada uno de los pasos necesarios para la puesta en marcha de la determinación radioinmunológica de insulina.

Diez islotes aislados con colagenasa se incubaron durante dos horas en 1ml de medio de incubación. Se tomaron alícuotas (300 μ l) del medio de incubación que se almacenaron congeladas a -40°C hasta el momento de la determinación de insulina.

1. RADIOYODACIÓN CON ^{125}I INA DE LA INSULINA.

Se empleó la técnica de radioyodación de Hunter Greenwood (116). Esta técnica se basa en la oxidación por la cloramina T del yoduro radiactivo a yodo atómico, el cual se introduce en uno de los carbonos del anillo bencénico de alguno de los cuatro restos de tiroxina de la cadena A (restos 14 y 19) ó B (restos 16 y 26) de la insulina. La acción oxidante de la cloramina T se detiene al cabo de 30 segundos mediante la adición de metabisulfito. La insulina marcada se separa de los demás productos de la reacción por cromatografía de filtración en gel.

1.1 Materiales.

- HCl 0.03 N
- Buffer fosfato 0,5 M pH 7,5 (a partir de una solución de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 M y otra de KH_2PO_4 0,5 M, combinandolas hasta lograr un pH 7,5).
- Buffer fosfato 0,05 M. Dilución 1/10 de la solución anterior.
- Cloramina T trihidratada (Merck): se pesaron 35 mg de cloramina T y se disolvieron en 10 ml del buffer fosfato 0,05 M.
- Metabisulfito sódico (Merck): se pesaron 24 mg y se disolvieron en 10 ml del buffer fosfato 0,05 M.
- Yoduro potásico (Merck): se pesaron 100 mg y se disolvieron en 10 ml del buffer fosfato 0,05 M.
- 1 mCi ^{125}I en 10 μ l (Radiochemical Center Amersham).
- Buffer glicina (Merck) 0,2 M pH 8,8. Se disuelven 15 g de glicina en unos 900 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 8,8 con NaOH 2 M y se completa hasta 1000 ml.
- Albúmina bovina 20% en buffer glicina. Se pesaron 0,5 g de albumina

(Sigma) grado RIA en 2,5 ml del buffer glicina.

- Insulina porcina (Novo) para marcar; se pesó 1 mg de insulina en 1 ml 0.03 N HCl y se almacenó a -40°C en fracciones de 50 µl.

1.2. Método de radioyodación.

Una vez preparados los anteriores reactivos se pipetea en un tubo de plástico de la siguiente manera:

Se pipetea 25 µl de buffer fosfato 0,5 M, se añaden 5 µl (5 µg) de insulina porcina, 10 µl de cloramina T y 1mCi I¹²⁵ (volumen según preparación comercial). Se agita durante 30 segundos y se añade, para parar la reacción, 50 µl de metabisulfito sódico. Tras agitar unos segundos más se añade 100 µl de yoduro potásico y se vuelve a agitar. Por último se añaden 100 µl de albúmina bovina 20% en buffer glicina con el objeto de que la insulina marcada no se absorba a las paredes del tubo.

2. CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA INSULINA MARCADA.

Calculamos el % de incorporación de ¹²⁵I a la insulina en el proceso de radioyodación aplicando la propiedad del ácido tricloroacético (TCA) de precipitar las proteínas.

2.1. Materiales.

- Ácido tricloroacético (Merck) al 20%. Se disolvió 2 g de ácido tricloroacético en 10 ml de agua destilada.

2.2. Método.

Tomamos 5 µl de la mezcla de radioyodación y los diluimos con 5 ml de buffer glicina 0,2 M. Se cuenta la radiactividad y si es necesario, se realizan diluciones progresivas hasta conseguir entre 20.000 y 50.000 cpm en 0.1 ml. Se pipetea en triplicado 0,1 ml en tubos de plástico y se cuenta en un contador gamma para saber exactamente la radiactividad total. Se añade a cada tubo 0,8 ml de de buffer glicina y se

agita. Se añade 1 ml de ácido tricloroacético al 20% y se deja reposar durante 15 minutos a 4°C. A continuación se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos y se aspira el sobrenadante. Comparando la radiactividad del precipitado con la total puede calcularse el % de incorporación del ^{125}I a la insulina.

$$\% \text{ de incorporación} = \frac{\text{radiactividad precipitado} \times 100}{\text{radiactividad total}}$$

Podemos calcular la actividad específica de la hormona marcada mediante la fórmula:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\% \text{ incorporación} \times \mu\text{ci } ^{125}\text{I}}{\mu\text{g insulina}}$$

3. PURIFICACIÓN DE LA INSULINA RADIOYODADA.

3.1. Materiales.

- Sephadex G-25 y Sephadex G-75 (Pharmacia Fine chemicals, Inc). Nombre comercial del dextrano con un margen de fraccionamiento en peso molecular entre 1.000 y 5.000 y 3.000 y 70.000 d. respectivamente. Previamente se hidratan con agua destilada durante 24 horas y a continuación se desgasifican.

- Columnas de cromatografía (Pharmacia Fina Chemicals), ambas de 1,5 cm de diámetro por 30cm de altura. Se rellenó cada una de las columnas de cromatografía con el gel Sephadex G-25 y G-75 respectivamente hasta una altura de 25 cm y se lavaron con buffer glicina 0,2 M durante una hora.

3.2. Método de purificación de la insulina.

La insulina marcada se separa del resto de la mezcla de radioyodación por cromatografía en gel. La columna de Sephadex G-25 se equilibra previamente con buffer glicina y antes de poner la mezcla de marcaje se pasa por la columna 200 μl de albumina bovina al 20%, con objeto de que durante la cromatografía de la insulina marcada, está no se adsorba a las paredes de la columna. Se transfiere la mezcla a la superficie de la columna de cromatografía y se eluye con buffer glicina 0,2 M, recogándose 50

fracciones de 1 ml (15 gotas) con la ayuda de un colector (LKB, modelo 7000 Ultrorac). Se añade a los tubos donde eluye la insulina- I^{125} 0,1 ml de albúmina bovina al 20%. El conteo de la radiactividad en un contador gamma de cada una de las fracciones, nos permite identificar la insulina radioyodada y el yodo libre. Como corresponde al peso molecular, primero eluye la insulina y después el yodo (Figura 5).

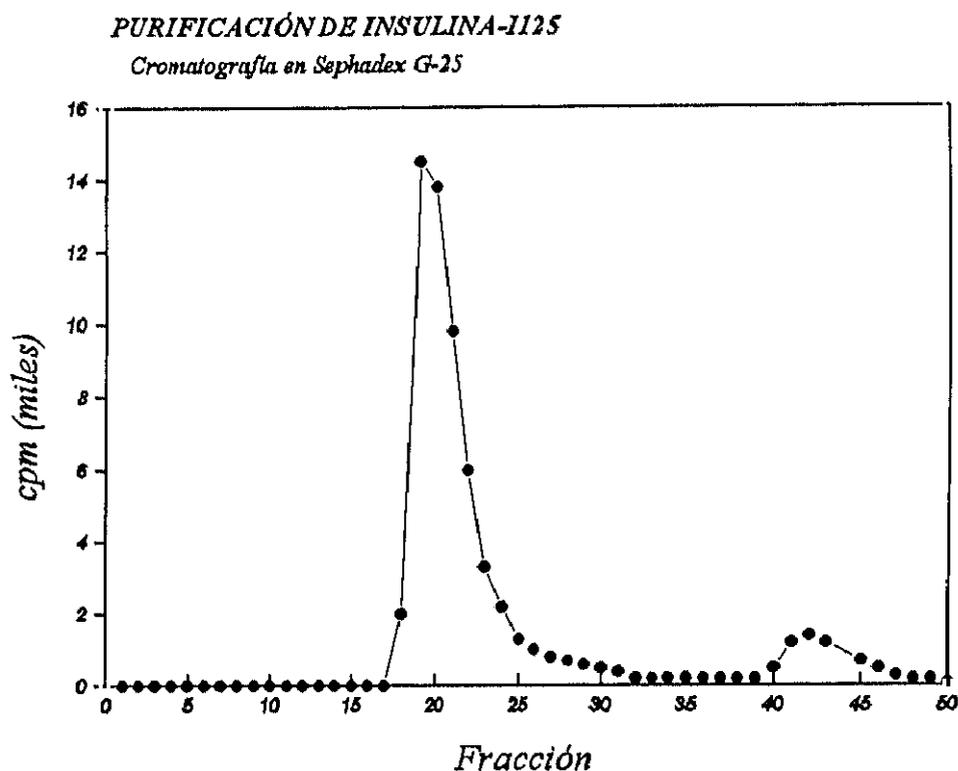


Figura 5. Purificación de I^{125} -insulina por cromatografía en Sephadex G-25.

Las fracciones de I^{125} -insulina obtenidas de la cromatografía de Sephadex G-25 se repurificaron en Sephadex G-75 para separar la I^{125} -insulina degradada (inmunológicamente inactiva) de la I^{125} -insulina activa. El proceso a realizar es igual al anterior descrito: se equilibra la columna de Sephadex-G-75 con buffer glicina 0,2 M, se añade 0,2 ml de albúmina bovina 20%, y se transfiere a la columna las fracciones de la hormona marcada obtenidas en la cromatografía anterior. Se eluye con buffer glicina recogiendo 50 fracciones con un colector (LKB, modelo 7000 Ultrorac). Se obtiene dos picos, el primero, cuyo volumen de elución coincide con el de exclusión de la columna corresponde a la insulina inmunológicamente inactiva, el segundo pico corresponde a la

insulina activa, que es la que usamos como trazador para el radioinmunoensayo (Figura 6).

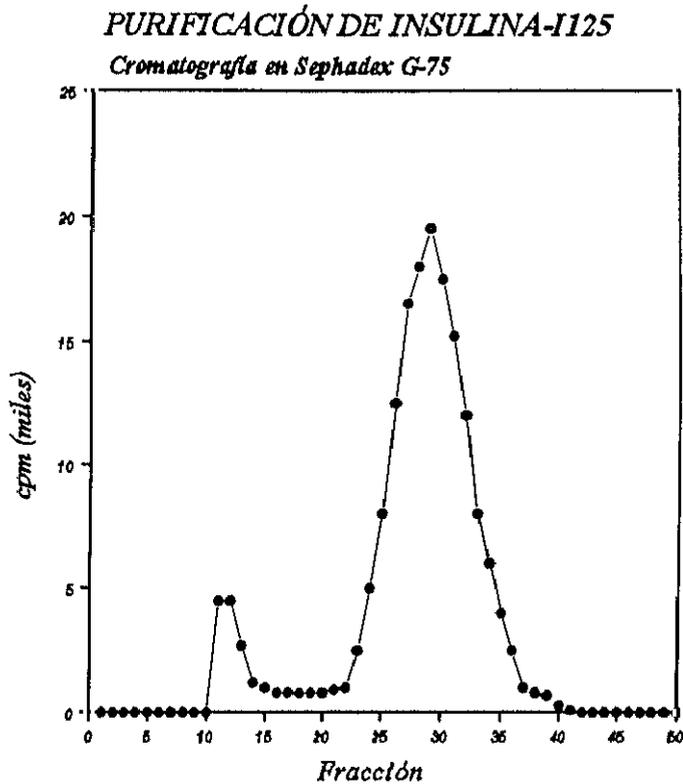


Figura 6. Repurificación ^{125}I -insulina por cromatografía en Sephadex G-75. Separación de la insulina degradada y activa.

4. RADIOINMUNOENSAYO.

4.1. Material.

- Buffer glicina 0,2 M pH 8,8 con albúmina bovina grado RIA al 0,25%.
- Anticuerpo anti-insulina a una dilución final 1/200.000 que combina aproximadamente un 60% de insulina- I^{125} en ausencia de insulina fría, según se recomienda. Este anticuerpo nos fue gratuitamente cedido por el Departamento de Histología de la Universidad de Umea (Prof. B. Hellman).

- ¹²⁵I-insulina.

- Insulina para la curva standard: Se pesa 1 mg de insulina de rata (Novo Research Institute) y se diluye en 1 ml de HCl 0,03 N. Se toman 25 µl de la dilución anterior y se completa el volumen hasta 50 ml con buffer glicina 0,2 M, quedando esta dilución final a 500 ng/ml. Se guardan en fracciones de 2 ml a -20 °C.

4.2 Método.

4.2.a. Preparación del anticuerpo.

Para prepara el anticuerpo anti-insulina a una dilución final 1/200.000, se parte de una dilución inicial del anticuerpo del 1/100 almacenada en el congelador. Como el volumen total de incubación es de 1 ml y el anticuerpo se añade en 0,4 ml (se diluye 2,5 veces) se prepara una dilución 2,5 veces más concentrada (1/80.000) que la deseada en la mezcla final de la incubación (1/200.000). El volumen total a preparar depende del número de pruebas (n):

$$\text{volumen a preparar(ml)} = n^{\circ} \text{ de pruebas} \times 0,4 \text{ ml}$$

4.2.b. Preparación de la insulina-I ¹²⁵.

Se le añade a cada tubo del radioinmunoensayo 45 pg de la insulina marcada contenidos en 0,5 ml de tampón glicina 0,2 M pH 8,8 cuya radiactividad (CPM) variará según la actividad específica de la hormona radioyodada, en nuestro caso 20.000 CPM. El volumen total a preparar dependerá del número de pruebas (n):

$$\text{volumen a preparar(ml)} = n \times 0,5 \text{ ml}$$

4.2.c. Preparación de la curva standard.

Nos sirve para calcular la relación entre ¹²⁵I-insulina ligada al anticuerpo y la insulina fría total de la muestra.

La curva standard consiste en preparar una serie de diluciones conocidas de insulina de rata que se harán reaccionar con el anticuerpo en presencia de una cantidad

constante de insulina radioyodada.

Las diluciones se preparan a partir de una solución stock de 500 ng/ml (2 ml) y se realizan las siguientes diluciones:

| | |
|------------|--|
| 128 ng/ml: | 0,448 solución stock + 1,302 ml buffer glicina |
| 64 ng/ml: | 1 ml (128 ng/ml) + 1 ml buffer glicina |
| 32 ng/ml: | 1 ml (64 ng/ml) + 1 ml buffer glicina |
| 16 ng/ml: | 1 ml (32 ng/ml) + 1 ml buffer glicina |
| 8 ng/ml: | 1 ml (16 ng/ml) + 1 ml buffer glicina |
| 4 ng/ml: | 1 ml (8 ng/ml) + 1 ml buffer glicina |
| 2 ng/ml: | 1 ml (4 ng/ml) + 1 ml buffer glicina |
| 1 ng/ml: | 1 ml (2 ng/ml) + 1 ml buffer glicina |
| 0,5 ng/ml: | 1 ml (1 ng/ml) + 1 ml buffer glicina |

Cada dilución de la curva standard se pipeteo por triplicado según el siguiente esquema:

0,1 ml dilución curva standard
0,5 ml insulina ¹²⁵I
0,4 ml anticuerpo

Se preparan también cinco tubos conteniendo solamente 0,5 ml de insulina ¹²⁵I, que se rotulan como AT y que nos permitirán conocer la cantidad real de insulina marcada añadida a cada tubo; También se preparan en los que el anticuerpo se sustituye por tampón glicina (rotulados N) y que nos servirán para medir la eficacia del método de separación.

4.2.d. Preparación de las muestras.

Análogamente a los tubos de la curva estándar se pipeteó:

0,1 ml de la muestra
0,5 ml insulina ¹²⁵I
0,4 ml anticuerpo

Una vez pipeteados los tubos de la curva standard y las muestras se incubaron en

cámara fría a +4 °C durante 48 horas.

5. SEPARACIÓN DE LA INSULINA LIBRE DE LA LIGADA AL ANTICUERPO.

5.1. Materiales.

- Carbón (Sigma)
- Dextrano (Pharmacia Fine Chemicals)
- Centrífuga
- Contador Gamma (modelo Cobra, Packard).

5.2. Método.

Se utiliza como método de separación el carbón activo recubierto de dextrano que absorbe la insulina libre, dejando en solución el complejo antígeno-anticuerpo (117).

Se prepara una suspensión de carbón-dextrano (3% carbón y 0,25% de dextrano) en tampón glicina 0,2 M, pH 8.8. Se añaden 0,5 ml de esta mezcla a todos los tubos (excepto a los rotulados como AT) y se mantienen a +4°C durante 45 minutos, luego se centrifugan a 3000 rpm durante 10 minutos. A continuación se aspira el sobrenadante de cada uno de los tubos, midiéndose la radiactividad del precipitado en un contador gamma durante un minuto.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Todos los resultados se han expresado como el valor medio ($X \pm SEM$) junto el número de determinaciones individuales (n). La significancia estadística de las diferencias entre los valores medios se evaluó por el test-t de Student.

Resultados

RESULTADOS

PRODUCCIÓN DE LACTATO.

Nuestro primer objetivo fue cuantificar la glicolisis en los islotes pancreáticos a través de un nuevo método de HPLC. La intención al estudiar la producción de lactato fue la de proporcionar un método nuevo y fiable para la estimación del flujo glicolítico, con el fin de elucidar el modo de acción de aquellos factores que modifican la respuesta secretora a glucosa de las células β de los islotes pancreáticos. Este método de HPLC cuantifica lactato en el medio extracelular en un rango μM . Estudiamos el efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de lactato expresada en pmol de equivalentes de glucosa/islxh. Los datos relativos a la producción de lactato han sido expresados como pmol de equivalentes de glucosa para facilitar su comparación con los demás parámetros estudiados. Para realizar esta conversión basta con dividir los pmol de lactato obtenidos por dos, ya que una molécula de glucosa produce 2 moléculas de lactato. Al calcular el contenido de DNA de cada islote obtuvimos un valor medio de 20 ng de DNA por islote.

Para determinar el tiempo óptimo que debemos usar en la incubación de los islotes con el fin de cuantificar la producción de lactato utilizando este método, estudiamos el efecto del tiempo sobre la producción de lactato a una concentración de glucosa 20 mM (figura 7). A esta concentración de la hexosa, el lactato obtenido se duplica ($29,27 \pm 1,59$ (8) vs. $54,89 \pm 1,12$ (8) pmol equivalentes glucosa/islote) al pasar de una a dos horas el tiempo de incubación. Como se puede advertir la velocidad de producción de lactato durante las dos horas es esencialmente constante. Por ello fijamos en todos los experimentos sucesivos el tiempo de incubación en dos horas.

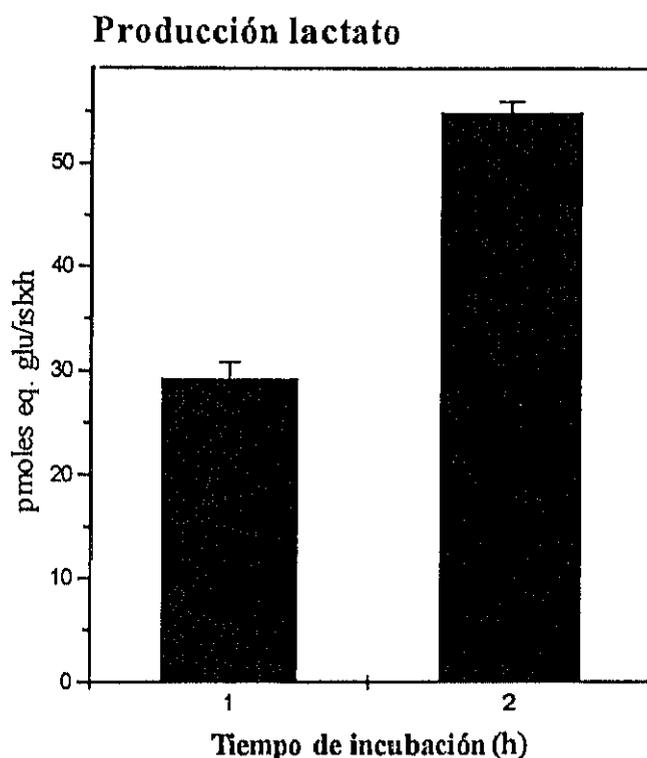


FIGURA 7. Efecto del tiempo sobre la producción de lactato de glucosa 20 mM en islotes aislados. Para la medición de la producción de lactato en este caso, se incubaron a 37°C grupos de 60 islotes en 30 μ l del medio con glucosa 20 mM en los tiempos indicados.

La figura 8 muestra la cinética hiperbólica que describe la producción de lactato con respecto a la concentración de glucosa. Esta producción alcanza su máximo a 3 mM de la hexosa y la concentración de glucosa en la que la producción de lactato es la mitad de la máxima se halla alrededor de 0,5 mM. El incremento de la producción de lactato se produce a bajas concentraciones de glucosa, menores de 3 mM, concentraciones no estimuladoras de la secreción de insulina.

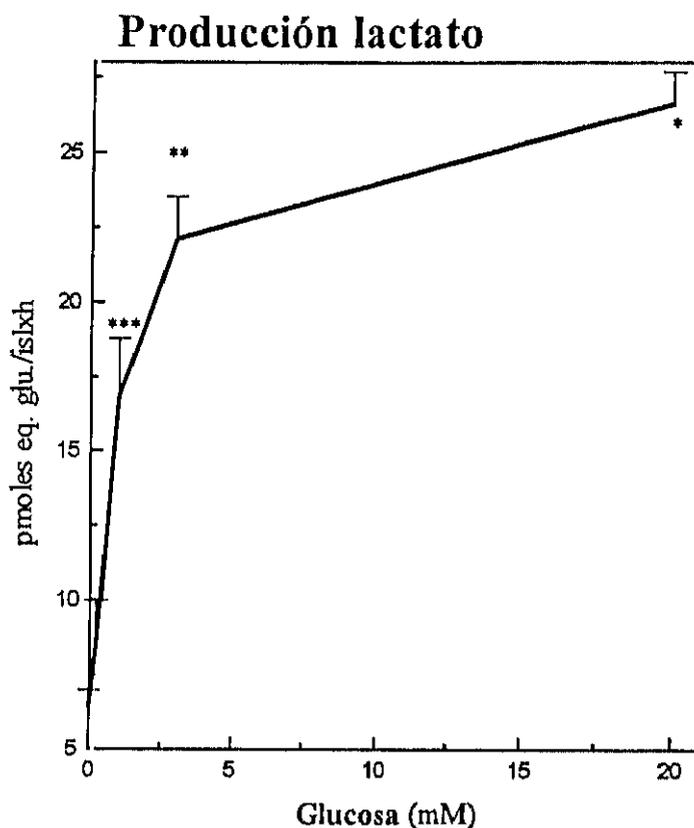


FIGURA 8. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de lactato en islotes pancreáticos. Cada punto es el valor medio \pm su correspondiente S.E.M. obtenido en, al menos, seis preparaciones de islotes, cada una de las cuales se realizó por triplicado. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre cada valor y el inmediatamente anterior. (* $p < 0,02$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$)

Con el fin de evaluar este método relativamente nuevo de determinación de lactato, se estudió el efecto de un inhibidor de la glicolisis a nivel de la gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa, la β -iodoacetamida. La administración de este compuesto a islotes incubados, produce una reducción acusada de la conversión de glucosa (3 o 20 mM) en lactato. En la tabla 1 se puede observar que este descenso es dependiente de la concentración del inhibidor. Así, iodoacetamida 0,1 mM produce un ligero descenso de la producción de lactato, aunque no es estadísticamente significativo; concentraciones mayores del inhibidor producen un descenso significativo y la máxima concentración probada, 1 mM, provoca un bloqueo de la producción de lactato alcanzando un valor muy próximo al obtenido en ausencia de glucosa ($6,45 \pm 0,53$ (7) pmol equivalentes

glucosa/islxh).

TABLA 1. Efecto de distintas concentraciones de iodoacetamida sobre la conversión de glucosa 3 y 20 mM en lactato.

| [Glucosa] (mM) | [iodoacetamida] (mM) | Producción lactato (pmol equivalente glucosa/islxh) | P |
|-------------------|-------------------------|---|---------|
| 3 | - | 21.84 ± 1.56 (10) | control |
| 3 | 0.1 | 18.62 ± 0.52 (12) | N.S. |
| 3 | 1.0 | 6.24 ± 1.03 (6) | <0,001 |
| 20 | - | 25.67 ± 1.33 (9) | control |
| 20 | 0.1 | 20.66 ± 2.00 (8) | N.S. |
| 20 | 0.2 | 19.02 ± 1.55 (3) | <0,05 |
| 20 | 0.4 | 16.40 ± 1.56 (3) | <0,01 |
| 20 | 1.0 | 5.79 ± 0.56 (5) | <0,001 |

Cada resultado está expresado como el valor medio ± su correspondiente S.E.M. obtenido en un número variable de preparaciones de islotes que se da entre paréntesis. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre cada valor y su control respectivo.

Como cabría esperar, la secreción de insulina inducida por glucosa en islotes pancreáticos también disminuye por la presencia de β-iodoacetamida dependiendo de su concentración. La liberación de insulina muestra una mayor sensibilidad al inhibidor, el cual induce el 50% de su efecto máximo a una concentración entre 0,1-0,2 mM, mientras que se requieren concentraciones mas altas para provocar un descenso en el metabolismo de la glucosa del mismo porcentaje (tabla 2).

TABLA 2. Efecto de distintas concentraciones de iodoacetamida (IAA) sobre la secreción de insulina producida por glucosa 20 mM.

| [Glucosa] (mM) | [IAA] (mM) | Secreción de insulina (ng/islxmin) | P |
|-------------------|---------------|--|---------|
| 3 | - | 0.01 ± 0.002 (20) | <0.001 |
| 20 | - | 0.17 ± 0.07 (34) | control |
| 20 | 0.05 | 0.13 ± 0.01 (17) | <0.05 |
| 20 | 0.1 | 0.11 ± 0.05 (28) | <0.01 |
| 20 | 0.2 | 0.07 ± 0.01 (24) | <0.001 |
| 20 | 0.4 | 0.03 ± 0.01 (17) | <0.001 |
| 20 | 0.5 | 0.03 ± 0.003 (30) | <0.001 |
| 20 | 1.0 | 0.02 ± 0.003 (34) | <0.001 |

Dos o tres grupos, cada uno de 10 islotes, fueron incubados a 37°C durante 120 minutos. La insulina acumulada en el medio de incubación fue medida radioinmunológicamente. Cada resultado está expresado como el valor medio ± su respectivo S.E.M. obtenido en un número variable de preparaciones de islotes que se da entre paréntesis.

Para una mayor caracterización de la producción insular de lactato como expresión de la glicolisis, hemos estudiado el efecto de dos inhibidores diferentes de la fosforilación de la glucosa: la D-manoheptulosa y la 2-deoxiglucosa (31).

La producción de lactato a partir de glucosa 3 o 20 mM, es ligera pero significativamente inhibida por manoheptulosa 20 mM. Esta inhibición representa el 30% de la producción de lactato de glucosa 3 mM ($p < 0,01$) y el 25% cuando la concentración de glucosa es 20 mM ($p < 0,02$).

En la tabla 3 mostramos el efecto del otro inhibidor de la fosforilación, la 2-deoxiglucosa 10 mM. Este compuesto disminuye significativamente la producción de lactato tanto de glucosa 3 como 20 mM con una probabilidad $p < 0,01$ y $p < 0,001$ respectivamente. En ambos casos, esta disminución representa aproximadamente el 50% del valor en ausencia del inhibidor.

TABLA 3. Efecto de 2-deoxiglucosa 10 mM sobre la conversión de glucosa 3 y 20 mM en lactato.

| [Glucosa] (mM) | [2-deoxiglucosa] (mM) | Producción lactato (pmol eq. glucosa/islxh) | P |
|-------------------|--------------------------|--|---------|
| 3 | - | 21.83 ± 1.56 (10) | control |
| 3 | 10 | 11.43 ± 2.58 (5) | <0,01 |
| 20 | - | 25.67 ± 1.33 (9) | control |
| 20 | 10 | 11.87 ± 1.61 (6) | <0,001 |

Cada resultado está expresado como el valor medio ± su respectivo S.E.M. obtenido en un número variable de preparaciones de islotes que se da entre paréntesis.

La secreción de insulina inducida por glucosa es muy sensible a D-manoheptulosa que induce una reducción de la mitad del valor máximo a una concentración de alrededor de 2 mM (tabla 4). Concentraciones mayores de D-manoheptulosa producen un descenso adicional de la respuesta secretora, la cual es completamente bloqueada a 20 mM (no hay diferencia estadísticamente significativa con la secreción de insulina producida por glucosa 3 mM).

TABLA 4. Efecto de distintas concentraciones de D-manoheptulosa (MH) sobre la secreción de insulina producida por glucosa 20 mM.

| [Glucosa] (mM) | [MH] (mM) | Secreción insulina (ng/islxmin) | P |
|-------------------|--------------|---------------------------------------|---------|
| 3 | - | 0.01 ± 0.001 (8) | |
| 20 | - | 0.18 ± 0.01 (15) | control |
| 20 | 1 | 0.16 ± 0.01 (16) | N.S. |
| 20 | 2 | 0.13 ± 0.01 (19) | <0.01 |
| 20 | 5 | 0.03 ± 0.002 (26) | <0.001 |
| 20 | 10 | 0.02 ± 0.002 (18) | <0.001 |
| 20 | 20 | 0.01 ± 0.004 (22) | <0.001 |

Dos o tres grupos de 10 islotes fueron incubados en 1 ml de tampón KRB pH 7,4 conteniendo glucosa 20 mM en ausencia o presencia de distintas concentraciones de manoheptulosa (MH). Cada resultado está expresado como el valor medio ± el error standard obtenido en un número variable de preparaciones de islotes que se da entre paréntesis. Las comparaciones estadísticas se realizaron con el valor obtenido en ausencia de manoheptulosa.

UTILIZACIÓN DE GLUCOSA

Para conocer el porcentaje de participación de la producción de lactato en la utilización de glucosa, se estudió la producción de $^3\text{H}_2\text{O}$ por los islotes a partir de D-[5- ^3H]glucosa en las mismas condiciones experimentales que la producción de lactato. Este método se basa en la liberación del ^3H de la D-[5- ^3H]glucosa en forma de agua tritiada, mayoritariamente en la interconversión de gliceraldehido fosfato y dihidroxiacetona y, en menor medida, en la conversión de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato. Por lo tanto, la velocidad de formación de agua tritiada representa la suma de la utilización de glucosa en la glicolisis y en la vía de las pentosas fosfato. La relación entre la concentración de glucosa y su velocidad de utilización se representa en la figura 9. La utilización de la glucosa por los islotes muestra una cinética hiperbólica con respecto a la concentración extracelular de glucosa que presenta una pendiente marcada a bajas concentraciones,

suavizándose a partir de 3 mM. La velocidad de utilización de glucosa se duplica al incrementar la concentración de la hexosa de 3 a 20 mM y muestra un valor de K_m aparente entre 3 y 10 mM.

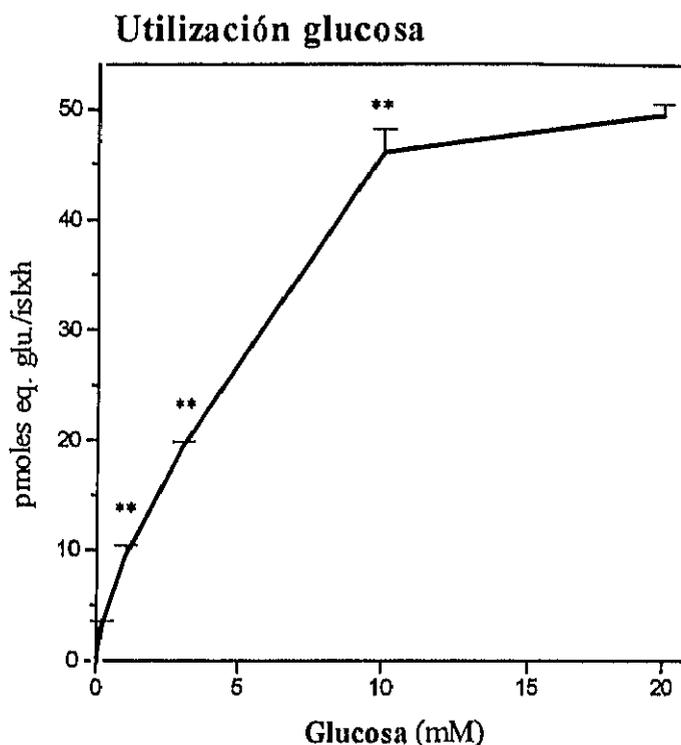


FIGURA 9. Efecto de distintas concentraciones de glucosa sobre su velocidad de utilización en islotes pancreáticos. Los valores representan el valor medio de, al menos, seis experimentos realizados por triplicado. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre cada valor y el anterior. (** $p < 0,001$).

La tabla 5 compara la relación de la concentración de glucosa con su velocidad de utilización y su conversión a lactato. Ambos parámetros se incrementan paralelamente en un rango de concentraciones bajas, de 0 a 3 mM, concentraciones no estimulantes de la secreción de insulina. Al aumentar la concentración de glucosa a 10 o 20 mM, su velocidad de utilización sigue aumentando, 2,2 veces respecto a glucosa 3 mM, mientras que su tasa de producción de lactato permanece inalterada. El método radioisotópico usado para cuantificar la utilización de glucosa es, en ocasiones, más sensible que el método de H.P.L.C. que mide lactato, como se aprecia en el menor valor del blanco (en

ausencia de glucosa). Esto explicaría que los valores de lactato son, paradójicamente, más altos que la tasa global de utilización de glucosa en el rango de concentraciones entre 0 y 3 mM.

TABLA 5. Relación entre la concentración de glucosa y su velocidad de utilización o su conversión a lactato.

| [Glucosa] (mM) | Utilización glucosa (pmol glu/islxh) | P | Producción lactato (pmol eq. glu/islxh) | P |
|-------------------|---|---------|--|---------|
| 20 | 51.41 ± 1.46 (22) | control | 25.67 ± 1.33 (9) | control |
| 10 | 49.09 ± 1.50 (3) * | N.S. | - | - |
| 3 | 22.14 ± 0.71 (33) *** | <0,001 | 22.11 ± 1.42 (11) *** | N.S. |
| 1 | 13.8 ± 0.56 (4) * | <0,001 | 16.83 ± 1.94 (6)** | <0,005 |
| 2 | 5.59 ± 0.55 (5) * | <0,001 | 8.19 ± 1.79 (6) | <0,001 |
| 0 | 0.0 ± 0.0 (3) | <0,001 | 6.45 ± 0.53 (7) | <0,001 |

Cada resultado está expresado como el valor medio ± el error standard obtenido en un número variable de preparaciones de islotes que se da entre paréntesis. *p<0,001, ** p<0,01, *** p<0,05 comparaciones con la concentración de glucosa inmediatamente inferior.

La tabla 6 representa el efecto de la iodoacetamida sobre la velocidad de utilización de glucosa. Tal como le ocurre a la producción de lactato, la iodoacetamida causa un descenso de la velocidad de utilización que depende de la concentración del inhibidor y de la glucosa. Así, cuando empleamos una dosis baja del inhibidor (0,1 mM) el ligero descenso de la velocidad de utilización no es significativo a glucosa 3 mM pero si a glucosa 20 mM (p<0,01). Iodoacetamida 1 mM reduce la utilización de glucosa 20 mM por debajo de los niveles obtenidos a 3 mM en ausencia del inhibidor. Las velocidades residuales de utilización a ambas concentraciones (3 y 20 mM) obtenidas en presencia de iodoacetamida 1 mM son muy pequeñas y similares.

TABLA 6. Efecto de distintas concentraciones de iodoacetamida (IAA) sobre la velocidad de utilización de glucosa 3 y 20 mM.

| [Glucosa] (mM) | [IAA] (mM) | Utilización glucosa (pmol glucosa/islxh) | P |
|-------------------|---------------|---|---------|
| 3 | - | 22.14 ± 0.71 (33) | control |
| 3 | 0.1 | 20.26 ± 2.83 (3) | N.S. |
| 3 | 1.0 | 6.93 ± 0.94 (3) | <0,001 |
| 20 | - | 51.41 ± 1.46 (22) | control |
| 20 | 0.1 | 43.23 ± 2.64 (11) | <0,01 |
| 20 | 0.5 | 16.7 ± 3.2 (7) | <0,001 |
| 20 | 1.0 | 9.76 ± 0.82 (13) | <0,001 |

Cada resultado está expresado como el valor medio ± el error standard obtenido en un número variable de preparaciones de islotes que se da entre paréntesis.

La D-manoheptulosa es un conocido inhibidor competitivo de la fosforilación de la glucosa en homogenados de islotes (63). La tabla 7 muestra el descenso de la velocidad de utilización de glucosa 20 mM por la D-manoheptulosa dependiendo de su concentración. El efecto máximo aparentemente ejercido es a 5 mM de D-manoheptulosa ya que, a mayor concentración no se produce ningún descenso adicional estadísticamente significativo. De acuerdo con esto, la mitad del efecto máximo fue obtenido a una concentración de D-manoheptulosa de alrededor de 1 mM. Concentraciones mayores (5, 10, 20 mM), reducen la velocidad de utilización de glucosa 20 mM hasta niveles próximos a los obtenidos con glucosa 3 mM en ausencia del inhibidor. La D-manoheptulosa a las concentraciones ensayadas no modifica significativamente la velocidad de utilización de glucosa 3 mM.

TABLA 7. Efecto de distintas concentraciones de manoheptulosa (MH) sobre la velocidad de utilización de glucosa 3 y 20 mM.

| [Glucosa] (mM) | [MH] (mM) | Utilización glucosa (pmol glucosa/islxh) | P |
|-------------------|--------------|---|---------|
| 3 | - | 22.14 ± 0.71 (33) | control |
| 3 | 1 | 19.19 ± 1.12 (5) | N.S. |
| 3 | 5 | 18.28 ± 0.85 (4) | N.S. |
| 3 | 20 | 19.21 ± 1.52 (5) | N.S. |
| 20 | - | 52.24 ± 2.92 (6) | control |
| 20 | 1 | 41.77 ± 2.48 (7) | <0,02 |
| 20 | 5 | 38.5 ± 4.44 (6) | <0,05 |
| 20 | 20 | 33.31 ± 3.06 (7) | <0,002 |

Cada resultado está expresado como el valor medio ± el error standard obtenido en un número variable de preparaciones de islotes que se da entre paréntesis.

OXIDACIÓN DE GLUCOSA.

Además de la conversión a lactato, el otro destino mayoritario del piruvato formado a partir de la glucosa en los islotes pancreáticos, es su oxidación mitocondrial en el ciclo de Krebs. Para cuantificar la aportación de la oxidación mitocondrial a la utilización de glucosa, se calculó la velocidad de oxidación de la hexosa midiendo la formación de $^{14}\text{CO}_2$ por los islotes a partir de D-[U- ^{14}C]glucosa. La tabla 8 muestra que la velocidad de oxidación, cuando la concentración de glucosa aumenta de 3 a 20 mM, se incrementa de 2.55 ± 0.14 (20) a 9.27 ± 0.46 (28) pmol glucosa/islxh, casi cuatro veces. En la misma tabla se representa el efecto de iodoacetamida 1 mM y de manoheptulosa 20 mM sobre la velocidad de oxidación de glucosa 3 y 20 mM. La iodoacetamida 1 mM produce un descenso marcado y significativo de la velocidad de oxidación de tanto glucosa 3 mM ($p < 0,01$) como de 20 mM ($p < 0,001$). La heptosa produce un descenso de la velocidad de oxidación a ambas concentraciones de glucosa con una probabilidad de $p < 0,05$ y $p < 0,001$ respectivamente.

TABLA 8. Relación entre la concentración de glucosa y su velocidad de oxidación. Efecto de iodoacetamida (IAA) y de manoheptulosa (MH) sobre la velocidad de oxidación de glucosa 3 y 20 mM.

| | Oxidación glucosa (pmol glucosa/islxh) | P |
|--------------------------|--|---------|
| Glucosa 3 mM | 2.48 ± 0.17 (17) | control |
| Glucosa 3 mM+ IAA 1 mM | 1.42 ± 0.13 (4) | <0,01 |
| Glucosa 3 mM + MH 20 mM | 1.55 ± 0.3 (4) | <0,05 |
| Glucosa 20 mM | 10.14 ± 0.65 (20) | control |
| Glucosa 20 mM + IAA 1 mM | 3.05 ± 0.29 (6) | <0,001 |
| Glucosa 20 mM + MH 20 mM | 4.92 ± 0.4 (4) | <0,001 |

Cada resultado está expresado como el valor medio ± su correspondiente S.E.M. obtenido en un número variable de preparaciones de islotes que se da entre paréntesis. Las comparaciones estadísticas se han realizado respecto a los controles respectivos.

La tabla 9 representa esquemáticamente la contribución de la producción de lactato y la oxidación de glucosa a la velocidad de utilización de glucosa. Todos los datos están expresados en pmol de equivalentes de glucosa/islxh, para facilitar su comparación. Observamos que mientras la velocidad de utilización de glucosa se duplica al aumentar la concentración de glucosa de 3 a 20 mM, la producción de lactato permanece inalterada y la velocidad de oxidación aumenta cuatro veces.

TABLA 9. Resumen de la contribución de los parámetros estudiados: velocidad de utilización y oxidación de glucosa 3 y 20 mM y su velocidad de producción de lactato.

| [Glucosa] (mM) | Velocidad utilización (pmol glucosa/islxh) | Producción lactato (pmol eq. glucosa/islxh) | Velocidad oxidación (pmol glucosa/islxh) |
|----------------|--|---|--|
| 3 | 19.47 ± 0.39 (42) | 21.83 ± 1.56 (10) | 2.55 ± 0.14 (20) |
| 20 | 47.81 ± 1.02 (30) *** | 25.67 ± 1.337 (9) + | 9.27 ± 0.46 (28) *** |

Los resultados están expresados como el valor medio ± S.E.M. El número de las diferentes preparaciones de islotes usadas se encuentra entre paréntesis. Comparaciones estadísticas entre los valores de glucosa 3 y 20 mM. (*** p<0,001, + No significativo).

A bajas concentraciones de glucosa la suma del lactato producido y la velocidad de oxidación de la glucosa coincide, dentro del error experimental, con la velocidad de utilización mientras que a altas concentraciones esto no ocurre. Existe un flujo de unos 12 pmol equivalentes de glucosa/islxh que no se justifica por estas dos vías metabólicas. Por ello a continuación estudiamos la aportación de la ruta de las pentosas fosfato al catabolismo de la glucosa.

FLUJO A TRAVÉS DE LA VÍA DE LAS PENTOSAS FOSFATO.

Para cuantificar la cantidad de glucosa metabolizada por esta vía, se estudio la producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ glucosa y $[6-^{14}\text{C}]$ glucosa y se comparó con la producción de $^3\text{H}_2\text{O}$ a partir de $[5-^3\text{H}]$ glucosa según la ecuación de Katz & Wood (112) (tabla 10).

A partir de estos datos y según la siguiente ecuación, se pudo calcular el flujo a través de la vía de las pentosas fosfato

$$\frac{G1_{\text{CO}_2} - G6_{\text{CO}_2}}{1 - G6_{\text{CO}_2}} \cdot \frac{3P}{1.2P}$$

Donde $G1_{\text{CO}_2}$ representa el porcentaje de $[1-^{14}\text{C}]$ glucosa oxidada respecto a la utilizada y $G6_{\text{CO}_2}$ representa el porcentaje de $[6-^{14}\text{C}]$ glucosa oxidada respecto a la utilizada y P es el factor que indica la contribución porcentual de la vía de las pentosas fosfato a la velocidad global de utilización de la glucosa, de tal forma que el valor absoluto de la glucosa metabolizada vía pentosas fosfato se calcula:

Glucosa utilizada (pmol glu/islxh) x P = pmol glucosa/islxh metabolizada por la vía de las pentosas fosfato.

TABLA 10. Velocidad de utilización de [5-³H]glucosa, velocidad de oxidación de [1-¹⁴C]glucosa y de oxidación de [6-¹⁴C]glucosa a concentraciones de glucosa 3 y 20 mM.

| [Glucosa] (mM) | Utilización glucosa (pmol glu/islxh) | Oxidación [1- ¹⁴ C]glucosa (pmol glu /islxh) | Oxidación [6- ¹⁴ C]glucosa (pmol glu /islxh) | (*) |
|----------------|--------------------------------------|---|---|------|
| 3 | 12,18 ± 0,77 (16) | 2,50 ± 0,20 (6) | 1,54 ± 0,10 (6) | 0,29 |
| 20 | 45,53 ± 3,02 (15) | 7,41 ± 0,62 (7) | 6,21 ± 0,62 (7) | 0,47 |

La última columna de la tabla (*) representa el valor absoluto de glucosa metabolizada por la vía de la pentosas fosfato y se encuentra expresado en pmol glucosa/islxh. Todos los resultados están expresados como el valor medio ± S.E.M. El número de las diferentes preparaciones de islotes usadas para probar cada condición se encuentra entre paréntesis.

En la tabla 10 destaca que el flujo a través de la vía de las pentosas fosfato siempre representó menos del 3% de la velocidad total de utilización de [5-³H]glucosa. Es posible que debido a una baja utilización del NADPH producido, niveles altos de este nucleótido impidan un mayor flujo metabólico a través de esta vía por inhibición de la glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (118). Por ello, estudiamos el efecto de menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) 10 μM sobre la glucosa metabolizada por esta vía. Los islotes pancreáticos contienen un sistema enzimático (quinona reductasa) que cataliza la reducción de menadiona concomitantemente con la oxidación de los nucleótidos de piridina reducidos (NADH, NADPH) (101). Así, este tratamiento aumentaría la disponibilidad de nucleótidos oxidados (NAD⁺ y NADP⁺) facilitando el flujo de la glucosa a través de la vía de las pentosas fosfato. Encontramos que la administración de menadiona 10 μM al medio de incubación, produce un incremento notable de la glucosa metabolizada por esta vía. Este incremento es de seis veces cuando la concentración de glucosa es 3 mM y se duplica cuando la concentración de glucosa es de 20 mM. (tabla 11).

TABLA 11. Flujo a través de la vía de las pentosas fosfato. Efecto de 10 μ M de menadiona.

| Glucosa (mM) | Flujo metabólico (pmol glu/islxh) | |
|--------------|-----------------------------------|------------------------|
| | Control | Menadiona |
| 3 | 0,2910 \pm 0,012 (16) | 1,76 \pm 0,11 (16) |
| 20 | 0,47 \pm 0,311 (15) | 0,842 \pm 0,035 (16) |

Los resultados están expresados como el valor medio \pm su correspondiente S.E.M obtenido en un número variable de preparaciones de islotes que se da entre paréntesis.

SALIDA DE PIRUVATO

Para aclarar la aparente discordancia surgida al comparar la velocidad global de utilización de glucosa con la suma de su velocidad de oxidación y de su conversión a lactato se investigó la posible salida de piruvato al medio extracelular. Con el fin de evaluar esta posibilidad estudiamos la concentración de piruvato en el medio extracelular. Para ello incubamos 120 islotes durante 2 horas, en 60 μ l de KRB pH 7,4 conteniendo 20 mM de glucosa. El medio de incubación fue dividido en dos fracciones. Una de las fracciones se incubó durante 2 horas más en presencia de NADH y lactato deshidrogenasa (LDH) en exceso para catalizar la conversión de piruvato en lactato y la otra fue directamente desproteinizada sin incubación. A continuación se cuantificó la cantidad de lactato de las dos fracciones.

La figura 10 ilustra los resultados obtenidos al incubar los islotes en presencia de glucosa 20 mM. No encontramos diferencias significativas entre la fracción del medio de incubación donde cuantificamos sólo la producción de lactato, y la fracción donde cuantificamos el lactato y el piruvato producidos. Tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas cuando añadimos al medio de incubación D-gliceraldehído 5 mM, tal y como muestra la figura 10.

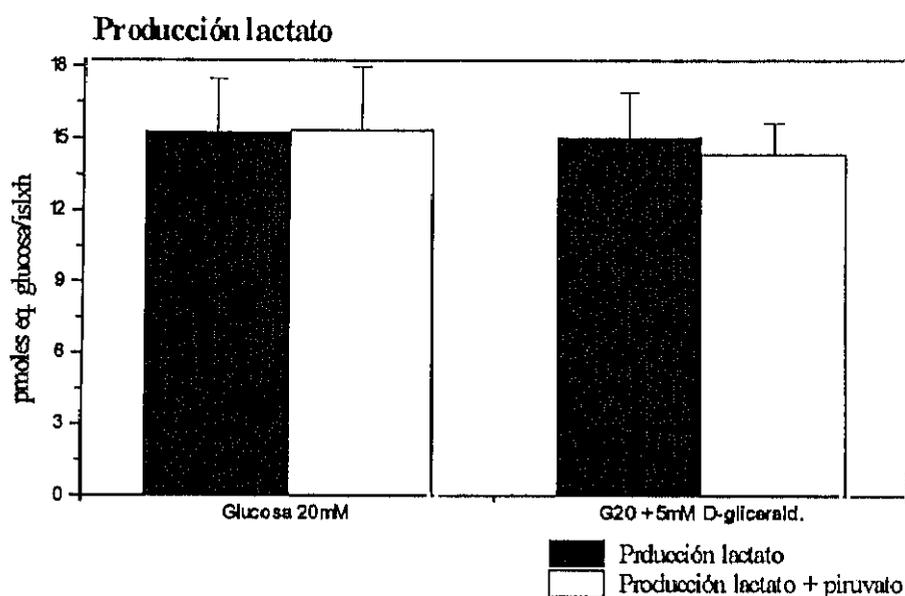


FIGURA 10. Cuantificación de la producción de lactato y piruvato en el medio de incubación. Los resultados están expresados como el valor medio \pm su correspondiente S.E.M obtenido en nueve preparaciones de islotes.

INHIBIDORES DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL

Con el fin de caracterizar la relación entre el metabolismo mitocondrial y la glicolisis, estudiamos en primer lugar, el efecto de diferentes inhibidores de la función mitocondrial sobre la velocidad de producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de D-[U- ^{14}C]glucosa: La antimicina A es un agente bloqueante de la transferencia de electrones a nivel del complejo respiratorio III, la rotenona bloquea la transferencia de electrones a nivel del complejo I, la oligomicina un inhibidor de la fosforilación oxidativa y el 2,4-dinitrofenol un agente desacoplante.

Se conoce desde hace mucho tiempo que la inhibición de la función mitocondrial bloquea la secreción de insulina. La figura 11 ilustra como ejemplo el efecto casi instantáneo de la antimicina A (10 μM) sobre la secreción de insulina inducida por glucosa 20 mM en un sistema dinámico de perfusión de islotes.

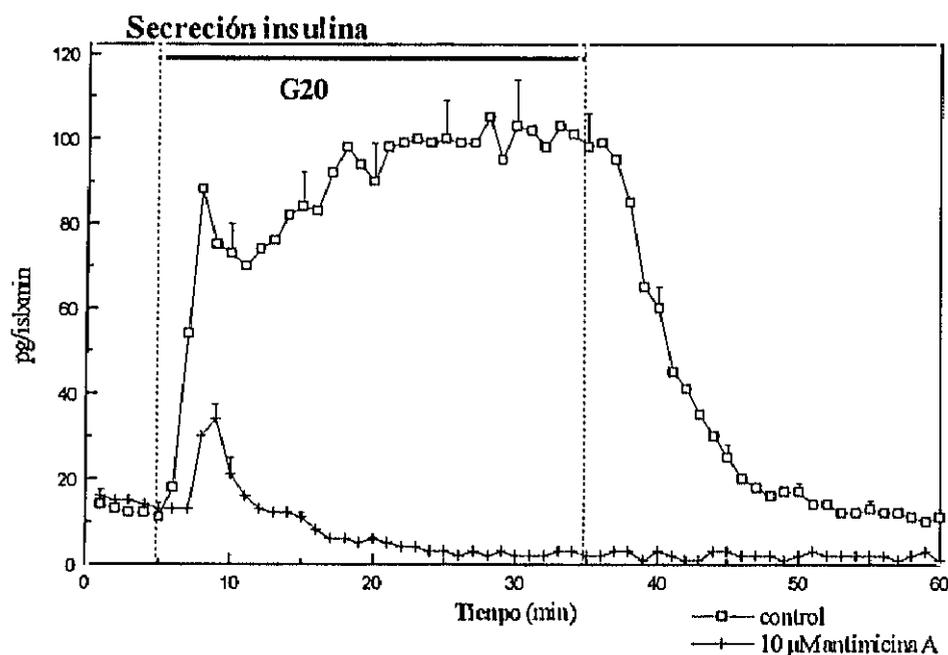


FIGURA 11. Efecto de antimicina A $10 \mu\text{M}$ sobre la secreción de insulina inducida por glucosa 20 mM en islotes perifundidos. Grupos de 40 islotes fueron preperifundidos durante 30 minutos con glucosa 3 mM . Tras este período de estabilización del que solo se evalúan los últimos cinco minutos, se cambia el medio de perfusión a uno conteniendo glucosa 20 mM en presencia (línea de cruces) o ausencia de antimicina A $10 \mu\text{M}$ (control, línea de cuadrados) manteniéndose durante 30 minutos. Tras este período se vuelve a las condiciones iniciales de glucosa 3 mM . La concentración de insulina en el perfusado fue medida a intervalos de 1 minuto. Cada punto es el valor medio de, al menos, cinco experimentos \pm su correspondiente S.E.M.

Los distintos inhibidores utilizados (rotenona, oligomicina y antimicina A) producen una inhibición de más de un 60% de la oxidación mitocondrial. La tabla 12 muestra el descenso de la velocidad de oxidación de glucosa 3 y 20 mM cuando en el medio de incubación se añade alguno de estos inhibidores. En todos los casos la diferencia entre el control y los islotes tratados es significativa $p < 0,001$.

TABLA 12. Efecto de diferentes inhibidores de la función mitocondrial sobre la velocidad de oxidación de glucosa 3 y 20 mM.

| [Glucosa] (mM) + otros modificadores | Velocidad oxidación (pmol glucosa/islxh) | P |
|--------------------------------------|---|---------|
| Glucosa 3 mM | 2.55 ± 0.14 (20) | control |
| Glucosa 3 mM + rotenona 10 µM | 1.17 ± 0.30 (4) | <0,001 |
| Glucosa 3 mM + oligomicina 2 µg/ml | 1.08 ± 0.17 (7) | <0,001 |
| Glucosa 3 mM + antimicina A 10 µM | 1.46 ± 0.15 (8) | <0,001 |
| Glucosa 20 mM | 9.27 ± 0.46 (28) | control |
| Glucosa 20 mM + rotenona 10 µM | 2.77 ± 0.19 (7) | <0,001 |
| Glucosa 20 mM + oligomicina 2 µg/ml | 3.97 ± 0.36 (9) | <0,001 |
| Glucosa 20 mM + antimicina A 10 µM | 4.68 ± 0.35 (8) | <0,001 |

Los resultados están expresados como el valor medio ± S.E.M. El número de las diferentes preparaciones de islotes usadas para probar cada condición se encuentra entre paréntesis.

Por el contrario el tratamiento con 2,4-dinitrofenol 100 µM (figura 12) no modifica la velocidad de oxidación de glucosa 3 ni 20 mM. La velocidad de oxidación de glucosa 3 mM permanece inalterada: 2,55 ± 0,14 (20) pmol glucosa/islxh en ausencia del desacoplante frente a 2,73 ± 0.31 (6) pmol glucosa/islxh en presencia de 100 µM de 2,4-dinitrofenol. Lo mismo ocurre cuando la concentración de glucosa aumenta a 20 mM: 9,27 ± 0,46 (28) pmol glucosa./islxh en ausencia de 2,4-dinitrofenol frente a 9,08 ± 1,26 (7) pmol glucosa/islxh en presencia del agente desacoplante.

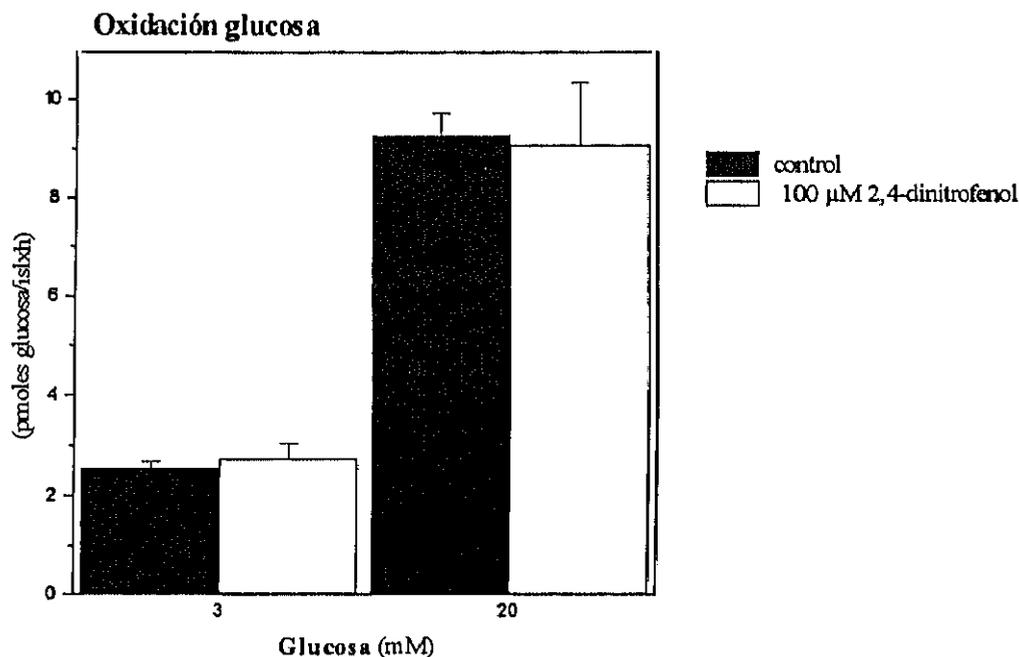


FIGURA 12. Efecto de 2,4-dinitrofenol 100 μM sobre la velocidad de oxidación de glucosa 3 y 20 mM. Cada dato es el valor medio \pm su correspondiente S.E.M. obtenido en, al menos, seis experimentos realizados por triplicado.

Una vez conocido el efecto inhibitor sobre la velocidad de oxidación de glucosa y la secreción de insulina, estudiamos el efecto de los inhibidores mitocondriales sobre la velocidad de utilización de glucosa y la producción de lactato. El objeto de este estudio fué el de evaluar la dependencia de la glicolisis con respecto a la producción mitocondrial de ATP. El estudio de esta dependencia nos podría precisar el comportamiento de la glicolisis global y de la glicolisis anaerobia cuantificada por el nuevo método de medición de lactato, cuando la producción de ATP mitocondrial está disminuida, lo que ocurre al aplicar inhibidores mitocondriales. De esta forma podremos determinar si en ausencia de producción mitocondrial de ATP se produce una aceleración de la glicolisis con el fin de mantener los niveles de ATP, es decir, determinar si los islotes pancreáticos presentan o no efecto Pasteur. En caso de presentar este efecto, se reflejaría en una aceleración en la utilización de glucosa y en una mayor

velocidad de producción de lactato.

Contrariamente a lo esperado, el tratamiento con inhibidores de la función mitocondrial no solo no aumenta la velocidad de utilización de la glucosa, sino que además, a concentraciones altas de glucosa, produce una inhibición de la velocidad glicolítica global. La tabla 13 muestra cómo la velocidad de utilización de glucosa 3 mM no es significativamente modificada por rotenona 10 μM , ni por oligomicina 2 $\mu\text{g/ml}$ o antimicina A 10 μM . La velocidad de utilización de glucosa 20 mM desciende significativamente al incubar los islotes pancreáticos en presencia de estos compuestos a las concentraciones probadas, con una probabilidad $p < 0,001$. El descenso de la velocidad de utilización representa, aproximadamente, el 50% del incremento de la velocidad de utilización entre glucosa 3 y 20 mM.

TABLA 13. Efecto de distintos inhibidores de la función mitocondrial sobre la velocidad de utilización de glucosa 3 y 20 mM.

| [Glucosa] (mM) + otros modificadores | Velocidad utilización (pmol glucosa/islxh) | P |
|--|---|---------|
| Glucosa 3 mM | 19.47 \pm 0.39 (42) | control |
| Glucosa 3 mM + rotenona 10 μM | 19.31 \pm 1.88 (6) | N.S. |
| Glucosa 3 mM + oligomicina 2 $\mu\text{g/ml}$ | 19.7 \pm 1.36 (7) | N.S. |
| Glucosa 3 mM + antimicina A 10 μM | 20.19 \pm 1.76 (4) | N.S. |
| Glucosa 20 mM | 47.81 \pm 1.02 (30) | control |
| Glucosa 20 mM + rotenona 10 μM | 36.89 \pm 2.59 (6) | <0,001 |
| Glucosa 20 mM + oligomicina 2 $\mu\text{g/ml}$ | 33.05 \pm 0.45 (6) | <0,001 |
| Glucosa 20 mM + antimicina A 10 μM | 33.05 \pm 2.19 (4) | <0,001 |

Los resultados están expresados como el valor medio \pm S.E.M. El número de las diferentes preparaciones de islotes usadas para probar cada condición se encuentra entre paréntesis. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre cada valor y su correspondiente control.

En cuanto a la velocidad de glicolisis anaerobia cuantificada como producción de lactato a partir de glucosa 3 o 20 mM, no se ve afectada sustancialmente por rotenona

10 μ M, oligomicina 2 μ g/ml o antimicina A 10 μ M, tal como se muestra en la tabla 14.

TABLA 14. Efecto de los inhibidores de la función mitocondrial sobre la producción de lactato a partir de glucosa 3 y 20 mM.

| [Glucosa] (mM) + otros modificadores | Producción lactato (pmol glucosa/islxh) | P |
|--|---|---------|
| Glucosa 3 mM | 21.9 \pm 1.56 (10) | control |
| Glucosa 3 mM + oligomicina 2 μ g/ml | 27.49 \pm 2.23 (9) | N.S. |
| Glucosa 3 mM + antimicina A 10 μ M | 23.04 \pm 2.73 (3) | N.S. |
| Glucosa 20 mM | 25.67 \pm 1.33 (9) | control |
| Glucosa 20 mM + rotenona 10 μ M | 26.37 \pm 2.10 (10) | N.S. |
| Glucosa 20 mM + oligomicina 2 μ g/ml | 24.42 \pm 1.46 (5) | N.S. |
| Glucosa 20 mM + antimicina A 10 μ M | 28.87 \pm 1.78 (6) | N.S. |

Los islotes fueron incubados en KRB pH 7,4 conteniendo glucosa 3 o 20 mM y en presencia o ausencia de alguno de los siguientes compuestos: rotenona 10 μ M, oligomicina 2 μ g/ml o antimicina A 10 μ M. Se cuantificó la producción de lactato. Los resultados están expresados como el valor medio \pm S.E.M. El número de las diferentes preparaciones de islotes usadas para probar cada condición se encuentra entre paréntesis.

La figura 13 ilustra el efecto del 2,4-dinitrofenol sobre la producción de lactato y la velocidad de utilización de glucosa 3 y 20 mM. Observamos que, si bien el 2,4-dinitrofenol a una concentración 100 μ M no altera significativamente ni la tasa de producción de lactato a partir de glucosa 3 o 20 mM, ni la velocidad de utilización de glucosa 3 mM, da lugar a una inhibición de la velocidad de utilización de glucosa 20 mM. Esta inhibición representa aproximadamente el 50% del incremento de la velocidad de utilización entre glucosa 3 mM y 20 mM ($p < 0,001$). Para confirmar estos datos utilizamos otro conocido desacoplante: el carbonilcianuro-3-clorofenilhidrazona (CCCP) a una concentración 5 μ M. La velocidad de utilización de glucosa 20 mM descendió de 47,81 \pm 1,02 (30) pmol glucosa/islxh en ausencia del desacoplante a 35,56 \pm 0,86 (4) pmol glucosa/islxh en presencia de 5 μ M de CCCP ($p < 0,001$). Verificamos la ausencia de efecto de CCCP 5 μ M sobre la velocidad de utilización de glucosa 3 mM (19,47 \pm 0,39 (42) pmol glucosa/islxh en ausencia de desacoplante vs. 17,59 \pm 1,34 (4) pmol

glucosa/islxh en presencia de CCCP 5 μ M).

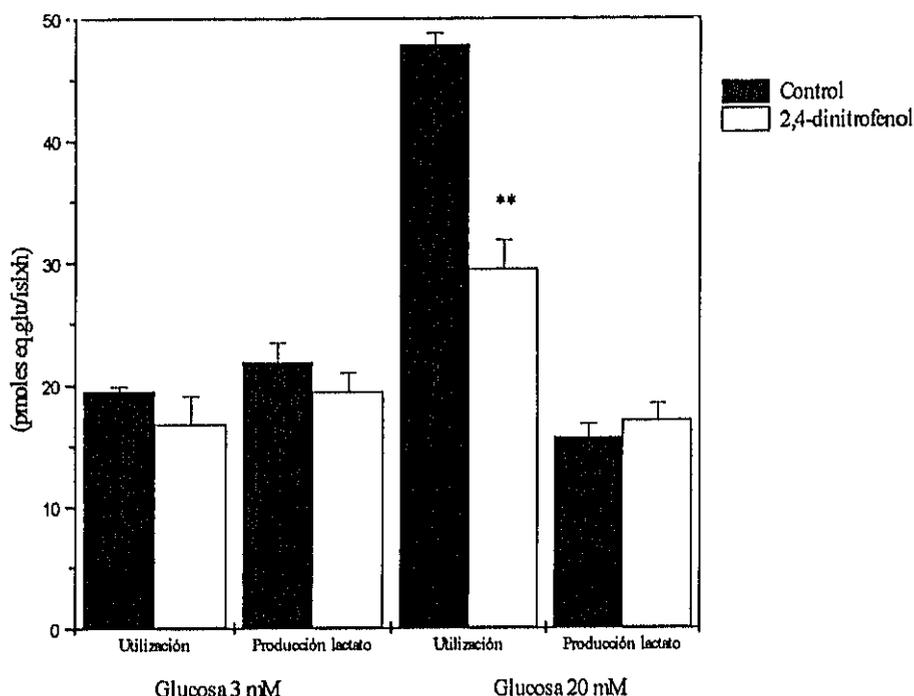


FIGURA 13. Efecto de 2,4-dinitrofenol sobre la velocidad de utilización y la producción de lactato de glucosa 3 y 20 mM. Cada dato es el valor medio \pm su correspondiente S.E.M. obtenido en, al menos, seis experimentos realizados por triplicado. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre cada valor en ausencia (control) y presencia de 2,4-dinitrofenol. (** $p < 0,001$).

FOSFORILACIÓN DE LA GLUCOSA

Para determinar el mecanismo de esta dependencia de la glicolisis con respecto a la producción mitocondrial de ATP, se estudió la fosforilación de la glucosa, reacción catalizada por hexoquinasa y glucoquinasa, primera etapa del metabolismo de la glucosa en los islotes. La velocidad de fosforilación se midió como la producción de $^3\text{H}_2\text{O}$ a partir de $[2\text{-}^3\text{H}]$ glucosa (detritiación). Este método se basa en la cuantificación del agua tritiada que se forma a partir del ^3H liberado en la isomerización entre glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato catalizada por la fosfoglucoisomerasa, y supone que este proceso es casi instantáneo en relación con la fosforilación de glucosa. En la figura 14 se

representa la relación entre la concentración de glucosa y su velocidad de fosforilación. Esta relación muestra una cinética hiperbólica que presenta una mayor pendiente a bajas concentraciones de glucosa.

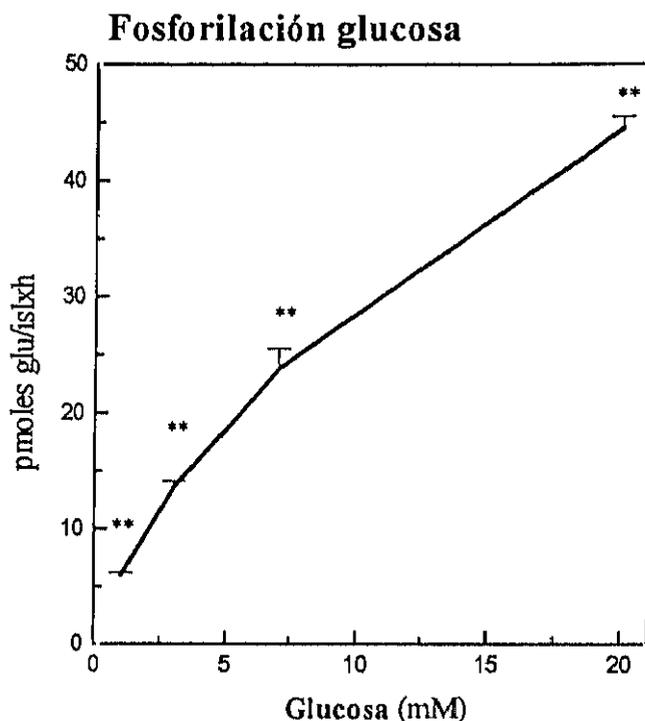


FIGURA 14. Efecto de distintas concentraciones de glucosa sobre su velocidad de fosforilación. Cada punto es el valor medio de, al menos, seis experimentos realizados por triplicado. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre cada punto y el siguiente (** $p < 0,001$).

Comparando la relación entre la concentración de glucosa su velocidad de utilización y su velocidad de fosforilación, observamos que ambas relaciones muestran cinéticas casi idénticas, incrementándose ambas velocidades paralelamente al aumentar la concentración de glucosa, tal y como se muestra en la tabla 15. El método de isótopos marcados utilizado es muy sensible y reproducible, como se refleja en el hecho de encontrar diferencias estadísticamente significativas entre cualquiera de las concentraciones de glucosa probadas.

TABLA 15. Comparación entre las velocidades de utilización y fosforilación a concentraciones variables de glucosa.

| Glucosa (mM) | Utilización glucosa (pmol glucosa/islxh) | P | Fosforilación glucosa (pmol glucosa/islxh) | P |
|--------------|--|--------|--|--------|
| 0 | 0.0 ± 0.0 (3) | | - | - |
| 0,2 | 3.37 ± 0.18 (5) | <0.001 | - | - |
| 1 | 9.52 ± 0.90 (5) | <0.001 | 5.94 ± 0.27 (8) | |
| 3 | 19.47 ± 0.39 (42) | <0.001 | 13.68 ± 0.46 (25) | <0.001 |
| 7 | - | - | 23.84 ± 1.63 (4) | <0.001 |
| 10 | 33.69 ± 2.16 (3) | <0.001 | - | - |
| 20 | 47.81 ± 1.02 (30) | <0.001 | 44.54 ± 0.95 (45) | <0.001 |

Cada resultado está expresado como el valor medio ± su correspondiente S.E.M. obtenido en un número de preparaciones de islotes que se representa entre paréntesis. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre cada valor de glucosa y el inmediatamente inferior.

Con el fin de evaluar el método de detritiación de [2-³H]glucosa como índice de la fosforilación, ensayamos el efecto sobre ella de conocidos inhibidores de la misma como la manoheptulosa y la 2-deoxiglucosa. Mientras que la manoheptulosa inhibe de forma competitiva la fosforilación de la glucosa, la 2-deoxiglucosa inhibe de forma no competitiva a la hexoquinasa. La 2-deoxiglucosa es fosforilada a 2-deoxiglucosa-6-fosfato, compuesto no metabolizable y que se acumula en el citoplasma inhibiendo a la hexoquinasa. Además, la 2-deoxiglucosa-6-fosfato es un inhibidor competitivo de la fosfoglucoisomerasa, enzima encargado de catalizar la interconversión de D-glucosa-6-fosfato en D-fructosa-6-fosfato (64).

La tabla 16 muestra el efecto de la manoheptulosa 20 mM y de la 2-deoxiglucosa 10 mM sobre la velocidad de fosforilación de glucosa 3 y 20 mM. El tratamiento con 2-deoxiglucosa 10 mM produce un descenso significativo ($p < 0,001$) de la tasa de fosforilación de glucosa 3 y 20 mM. Este descenso representa un 54% y un 37% respectivamente. Paralelamente, el tratamiento con manoheptulosa 20 mM también reduce la fosforilación de glucosa 3 y 20 mM, representando esta reducción el 29% y

53% respectivamente ($p < 0,001$). Según estos datos, la manoheptulosa inhibe la fosforilación de la glucosa más potentemente a altas concentraciones de glucosa mientras que la 2-deoxiglucosa lo hace a bajas concentraciones.

Esta diferencia selectiva en cuanto a la capacidad inhibidora, apoya los estudios realizados en homogenados de islotes en los que se encontró que la D-manoheptulosa es un inhibidor competitivo exclusivo de la glucoquinasa (63).

TABLA 16. Efecto manoheptulosa 20 mM y de 2-deoxiglucosa 10 mM sobre la velocidad de fosforilación de glucosa 3 y 20 mM

| [Glucosa] (mM) + otros modificadores | Fosforilación glucosa (pmol glucosa/islxh) | P |
|--------------------------------------|--|---------|
| 3 | 13,68 ± 0,46 (25) | control |
| 3 + manoheptulosa 20 mM | 9,58 ± 0,78 (5) | <0,001 |
| 3 + 2-deoxiglucosa 10 mM | 6,24 ± 0,16 (4) * | <0,001 |
| 20 | 44,54 ± 0,95 (45) | control |
| 20 + manoheptulosa 20 mM | 20,88 ± 1,26 (5) | <0,001 |
| 20+ 2-deoxiglucosa 10 mM | 28,23 ± 1,88 (4) ** | <0,001 |

Cada resultado está expresado como el valor medio ± su correspondiente S.E.M. obtenido en un número de preparaciones de islotes que se representa entre paréntesis. (* $p < 0,01$ y ** $p < 0,002$ comparación con su correspondiente valor en presencia de manoheptulosa).

INHIBIDORES DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y LA FOSFORILACIÓN DE LA GLUCOSA.

La inhibición de la función mitocondrial produjo, paradójicamente, una disminución de la velocidad de glicolisis que se evidenció por una velocidad de utilización (detritación de D-[5-³H-]glucosa) disminuida. La disminución de la concentración intracelular de ATP en estas condiciones, era de esperar que produjera una aceleración de la glicolisis por desinhibición de la fosfofructoquinasa-1 y,

consecuentemente, de la hexoquinasa al disminuir los niveles de su inhibidor no competitivo (glucosa-6-fosfato). Con el fin de determinar cómo responde específicamente la velocidad de fosforilación de glucosa a esta disminución de ATP mitocondrial, estudiamos el efecto de alguno de los inhibidores de la función mitocondrial caracterizados anteriormente, sobre la fosforilación de glucosa (detritación de D-[2-³H]glucosa) 3 y 20 mM.

La tabla 17 muestra el efecto de rotenona 10 μ M y de 2,4-dinitrofenol 100 μ M sobre la velocidad de fosforilación de glucosa 3 y 20 mM. Observamos que, si bien la adición de rotenona 10 μ M produce un descenso significativo ($p < 0,001$) de la velocidad de fosforilación de glucosa 3 y 20 mM, la administración de 2,4-dinitrofenol solo provoca una disminución de la velocidad de fosforilación de glucosa 20 mM ($p < 0,02$). La velocidad de detritación de glucosa 3 mM no es alterada por la presencia del desacoplante.

TABLA 17. Efecto de rotenona 10 μ M y de 2,4-dinitrofenol 100 μ M sobre la velocidad de fosforilación de glucosa 3 y 20 mM.

| [Glucosa] (mM)+ otros modificadores | Fosforilación glucosa (pmol glucosa/islxh) | P |
|-------------------------------------|---|---------|
| 3 | 13.68 \pm 0.46 (25) | control |
| 3 + rotenona 10 μ M | 8.45 \pm 0.72 (5) | <0,001 |
| 3 + 2,4-dinitrofenol 100 μ M | 11.25 \pm 2.22 (4) | N.S. |
| 20 | 44.54 \pm 0.95 (45) | control |
| 20 + rotenona 10 μ M | 18.66 \pm 1.63 (10) | <0,001 |
| 20 + 2,4-dinitrofenol 100 μ M | 36.04 \pm 3.7 (4) | <0,02 |

Cada resultado está expresado como el valor medio \pm su correspondiente S.E.M. obtenido en un número de preparaciones de islotes que se representa entre paréntesis. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre cada valor y su correspondiente control.

La fosforilación de concentraciones elevadas de glucosa en estas condiciones podría estar limitada por una reducida disponibilidad de ATP. Para comprobar esta

hipótesis, ensayamos diferentes sustratos mitocondriales, sobre la velocidad de fosforilación de glucosa en presencia de β -iodoacetamida como agente bloqueante de la glicolisis, y por tanto de la producción mitocondrial de ATP por la glucosa.

La tabla 18 muestra que la β -iodoacetamida 1 mM remeda aparentemente el efecto del bloqueo mitocondrial disminuyendo significativamente la velocidad de fosforilación de glucosa 20 mM. En presencia de β -iodoacetamida, ninguno de los sustratos mitocondriales utilizados (glutamina sola o en combinación con leucina, o el metil-éster del ácido succínico al que se le supone una mayor facilidad para equilibrarse a través de la membrana plasmática que el ácido succínico) recuperó la velocidad de fosforilación.

TABLA 18. Efecto de iodoacetamida (IAA) 1 mM sobre la fosforilación de glucosa 20 mM. Efecto de distintos sustratos mitocondriales en presencia de iodoacetamida 1 mM sobre la fosforilación de glucosa 20 mM.

| [Glucosa] (mM) + otros modificadores | Fosforilación glucosa P (pmol glucosa/islxh) | |
|---|---|---------|
| 20 mM | 44.54 \pm 0.95 (45) | <0,001 |
| 20 + IAA 1 mM | 17.82 \pm 1.33 (15) | control |
| 20 + IAA 1 mM + glutamina 10 mM | 20.29 \pm 2.68 (5) | N.S. |
| 20 + IAA 1 mM + glutamina 10 mM + leucina 10 mM | 20.46 \pm 1.86 (5) | N.S. |
| 20 + IAA 1 mM + metilsuccinato 10 mM | 16.92 \pm 2.38 (5) | N.S. |

Cada resultado está expresado como el valor medio \pm su correspondiente S.E.M. obtenido en un número de preparaciones de islotes que se representa entre paréntesis. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre cada valor y el control (glucosa 20 mM con iodoacetamida 1 mM).

La observación de que la fosforilación de la glucosa inhibida por β -iodoacetamida no es recuperable por sustratos mitocondriales podría atribuirse a dos causas:

1- La β -Iodoacetamida no es un inhibidor específico de la glicolisis y produce una inhibición inespecífica del metabolismo mitocondrial.

2- Los sustratos mitocondriales suministrados son pobremente oxidados.

La primera posibilidad fué explorada, investigando el efecto de la iodoacetamida sobre la velocidad de oxidación mitocondrial de [2-¹⁴C]piruvato y L-[U-¹⁴C]glutamina: la producción de ¹⁴CO₂ a partir de ambos sustratos a una concentración 10 mM fué significativamente disminuida p<0,001 (más de un 50%) en presencia del inhibidor como se muestra en la tabla 19. Este efecto inespecífico de la β-iodoacetamida sobre el metabolismo oxidativo invalida la estrategia planteada y hace innecesaria la búsqueda de la segunda alternativa propuesta.

TABLA 19. Efecto de iodoacetamida 1 mM sobre la velocidad de oxidación de distintos sustratos.

| [¹⁴ C]Sustrato (mM) | [IAA] (mM) | Velocidad oxidación (pmol sustrato oxidado/islxh) | P |
|---------------------------------|------------|---|---------|
| Piruvato 10 mM | - | 6.98 ± 0.25 (10) | control |
| Piruvato 10 mM | 1 | 2.86 ± 0.35 (6) | <0,001 |
| Glutamina 10 mM | - | 10.99 ± 0.74 (11) | control |
| Glutamina 10 mM | 1 | 5.41 ± 0.56 (2) | <0,001 |

Cada resultado está expresado como el valor medio ± su correspondiente S.E.M. obtenido en un número de preparaciones de islotes que se representa entre paréntesis. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre cada valor y su correspondiente control.

La carencia de un inhibidor específico de la glicolisis que permitiera bloquear la producción mitocondrial de ATP a partir de la glucosa obligó a cambiar la estrategia experimental. Se planteó entonces someter a comprobación si la velocidad de fosforilación de glucosa a bajas concentraciones (inferior a 3 mM), cuyo metabolismo es fundamentalmente anaerobio según datos anteriormente presentados, era sensible a la oxidación de sustratos mitocondriales. Se eligieron inicialmente el D-gliceraldehido y el metil éster del piruvato.

El D-gliceraldehido es un sustrato glicolítico que posiblemente es fosforilado por una trioquinasa en los islotes y no interfiere, por tanto, directamente con la fosforilación

de la glucosa (119). La tabla 20 muestra la dependencia de su oxidación (producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de D-[U- ^{14}C]gliceraldehido) con respecto a la concentración y su comparación con la glucosa. La velocidad de oxidación del D-gliceraldehido aumenta varias veces cuando su concentración se incrementa de 1 a 5 mM. Mayores concentraciones de la triosa (10 mM) no producen un incremento adicional de la producción de $^{14}\text{CO}_2$. La β -iodoacetamida (1 mM) reduce aproximadamente un 50% la cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ producido a partir de 5 mM de D-gliceraldehido. La tabla 20 también muestra que la cantidad de equivalentes de hexosa convertidos a CO_2 es bastante parecida entre D-glucosa 3 mM y D-gliceraldehido 1 mM, mientras que la velocidad de oxidación de D-glucosa 20 mM es significativamente mayor que la oxidación de D-gliceraldehido 5 mM. Los resultados de esta tabla se encuentran expresados en pmol de equivalentes de hexosa para facilitar la comparación directa entre la velocidades de oxidación de glucosa y gliceraldehido.

TABLA 20. Velocidad de oxidación de D-gliceraldehido y D-glucosa a distintas concentraciones.

| D-[U- ^{14}C]Sustrato (mM) + otros modificadores | Velocidad de oxidación (pmol equivalente hexosa/islxh) | P |
|---|---|---------|
| D-Gliceraldehido (1) | 1.9 \pm 0.6 (4) | <0,02 |
| D-Gliceraldehido (5) | 5.0 \pm 0.4 (9) | control |
| D-Gliceraldehido (10) | 5.6 \pm 0.2 (4) | N.S. |
| D-Gliceraldehido (5) + IAA 1 mM | 2.3 \pm 0.1 (5) | <0,001 |
| D-Glucosa (3) | 2.7 \pm 0.2 (5) | <0,05 |
| D-Glucosa (20) | 10.9 \pm 0.9 (7) | <0,001 |

Los resultados representan el valor medio \pm su correspondiente S.E.M. El número de las diferentes preparaciones de islotes usadas para cada condición se encuentra entre paréntesis.

La velocidad de oxidación de D-gliceraldehido se correlaciona con su capacidad de estimular directamente la secreción de insulina como se observa en la tabla 21; esta estimulación depende de la concentración de D-gliceraldehido y alcanza un máximo a 5 mM que induce una secreción aproximadamente igual a la mitad de la máxima

inducida por glucosa (20 mM). Concentraciones mayores de la triosa, 10 o 20 mM, producen una respuesta secretora significativamente menor. Es por tanto razonable pensar que el D-gliceraldehido aumenta la secreción de insulina aumentando la producción mitocondrial de ATP según el argumento que sostiene la hipótesis metabólica de la secreción de insulina.

TABLA 21. Cantidad total de insulina liberada por islotes perifundidos estimulados con D-glucosa o D-gliceraldehido.

| Secretagogo (mM) | Secreción de insulina (ng / 30 min x 40 islotes) | P |
|-----------------------|---|---------|
| Glucosa (3) | 15.5 ± 2.5 (5) | control |
| Glucosa (20) | 111.0 ± 2.6 (6) *** | <0,001 |
| D-gliceraldehido (1) | 37.2 ± 3.0 (5)* | <0,01 |
| D-gliceraldehido (5) | 63.4 ± 4.9 (4) | <0,001 |
| D-gliceraldehido (10) | 47.8 ± 2.3 (3)** | <0,001 |
| D-gliceraldehido (20) | 34.6 ± 1.0 (3)* | <0,001 |

Grupos de 40 islotes fueron pre-perifundidos durante 30 minutos con D-glucosa 3 mM o en ausencia de sustratos. Tras este período de estabilización, se cambia el medio de perfusión a uno conteniendo D-glucosa o D-gliceraldehido durante 30 minutos. Las condiciones del período de pre-perifusión fueron restablecidas otra vez durante los últimos 25 minutos. La concentración de insulina en el perfusado fué medida a intervalos de 1 minuto. Los resultados representan el valor medio ± su correspondiente S.E.M. de la cantidad total de insulina liberada durante los minutos 31-60 de la perfusión. El número de las diferentes preparaciones de islotes usados para probar cada condición experimental se da entre paréntesis. (* P<0,01, ** P<0,05 y *** P<0,001 comparando con D-gliceraldehido 5 mM).

La figura 15 muestra la estimulación de la secreción de insulina producida por D-gliceraldehido 5 mM y glucosa 20 mM en un sistema dinámico de perfusión de islotes.

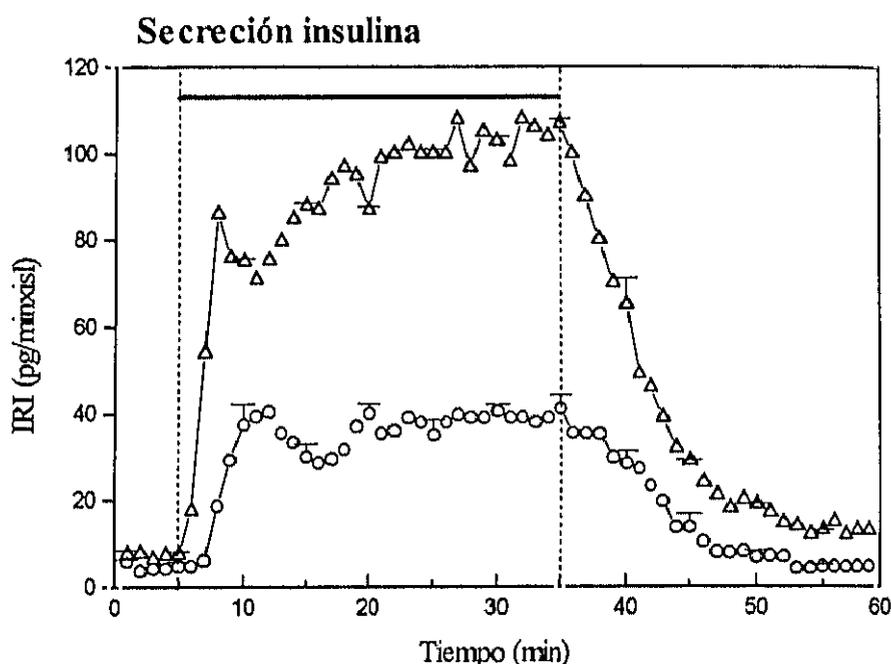


FIGURA 15. Secreción de insulina producida por glucosa 20 mM y D-gliceraldehído 5 mM. Grupos de 40 islotes fueron pre-perfundidos durante 30 minutos con D-glucosa 3 mM o en ausencia de sustratos. Tras este período de estabilización, se cambia el medio de perfusión a uno conteniendo D-glucosa 20 mM (Δ) o D-gliceraldehído 5 mM (\circ) durante 30 minutos. Las condiciones del período de pre-perfusión fueron restablecidas otra vez durante los últimos 25 minutos. El flujo fue recolectado después de 25 minutos de pre-perfusión (minuto 0 de la gráfica). El contenido de insulina fue medido a intervalos de 1 minuto. El número de diferentes preparaciones de islotes usados para probar cada condición experimental fue, al menos cinco.

El piruvato es sustancialmente oxidado por la células de los islotes de forma dependiente de su concentración (84) pero, paradójicamente, no estimula "per se" la secreción de insulina como lo hace el D-gliceraldehído o la propia glucosa. Pensando en una posible limitación de su metabolismo por su baja permeabilidad en la membrana plasmática, se ha utilizado recientemente su éster metílico que se transportaría más eficazmente y que se hidrolizaría generando piruvato en el citoplasma (120).

Ambos sustratos, D-gliceraldehído 5 mM y metil piruvato 10 mM se ensayaron

sobre la fosforilación de glucosa. La tabla 22 demuestra que ambos produjeron una disminución de la fosforilación no solo a concentraciones pequeñas (1 mM) sino también a concentraciones saturantes (20 mM) de glucosa. Un aspecto importante a destacar es que el porcentaje de inhibición (en torno a un 30%) fué constante, independiente de la concentración de sustrato (glucosa) utilizada. Ello es altamente sugestivo de una inhibición de la fosforilación (actividad hexoquinasa de bajo Km) por la producción mitocondrial de ATP (a través de la inhibición de la fosfofructoquinasa y secundariamente de la hexoquinasa por acumulación de su producto, glucosa-6-fosfato). El descenso absoluto de la fosforilación a glucosa 20 mM (14 pmol glucosa/islxh) es casi idéntico a la velocidad de detritiación ($13,68 \pm 0,46$ (25) pmol glucosa/islxh) obtenida a una concentración de glucosa (3 mM) que puede considerarse saturante de la actividad hexoquinasa (ver tabla 22).

TABLA 22. Efecto de D-gliceraldehido 5 mM y de metil piruvato 10 mM sobre la velocidad de fosforilación de 1, 7 y 20 mM de glucosa.

| Sustrato | Fosforilación Glucosa (pmol glucosa /islxh) | P |
|---------------------------------------|--|---------|
| Glucosa 1 mM (control) | $5,94 \pm 0,27$ (8) | control |
| Glucosa 1 mM + D-gliceraldehido 5 mM | $4,03 \pm 0,18$ (8) | <0,001 |
| Glucosa 1 mM + Metilpiruvato 10 mM | $4,38 \pm 0,34$ (4) | <0,01 |
| Glucosa 7 mM (control) | $23,84 \pm 1,63$ (4) | control |
| Glucosa 7 mM + D-gliceraldehido 5 mM | $15,78 \pm 0,81$ (4) | <0,01 |
| Glucosa 7 mM + Metilpiruvato 10 mM | $16,17 \pm 1,75$ (4) | <0,02 |
| Glucosa 20 mM (control) | $54,05 \pm 0,7$ (6) | control |
| Glucosa 20 mM + D-gliceraldehido 5 mM | $39,96 \pm 2,57$ (6) | <0,001 |
| Glucosa 20 mM + Metilpiruvato 10 mM | $40,24 \pm 1,89$ (6) | <0,001 |

Cada resultado está expresado como el valor medio \pm su correspondiente S.E.M. obtenido en un número de preparaciones de islotes que se representa entre paréntesis. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre cada valor y su correspondiente control.

Otros sustratos mitocondriales como el piruvato 10 mM y la glutamina 10 mM o la leucina 10 mM, solas o en combinación, fueron incapaces de modificar significativamente la velocidad de fosforilación de glucosa 20 mM, como se resume en la tabla 23. Tampoco la combinación de glutamina 10 mM y leucina 10 mM modificó la velocidad de fosforilación de glucosa 3 o 7 mM (tabla 23).

TABLA 23. Efecto de sustratos mitocondriales sobre la fosforilación de glucosa 20 mM.

| [Glucosa] (mM) + otros modificadores | Fosforilación glucosa (pmol glucosa/islxh) | P |
|---|---|---------|
| 20 mM | 44.54 ± 0.95 (45) | control |
| 20 mM + glutamina 10 mM | 44.46 ± 3.98 (5) | N.S. |
| 20 mM + leucina 10 mM | 46.97 ± 2.89 (5) | N.S. |
| 20 mM + glutamina 10 mM + leucina 10 mM | 48.25 ± 1.49 (4) | N.S. |
| 20 mM + metilsuccinato 10 mM | 42.73 ± .0.79 (3) | N.S. |
| 3 mM | 13.68 ± 0.46 (25) | control |
| 3 mM + glutamina 10 mM + leucina 10 mM | 14.33 ± 1.14 (3) | N.S. |
| 7 mM | 23.84 ± 1.63 (4) | control |
| 7 mM + glutamina 10 mM + leucina 10 mM | 27.39 ± 1.33 (3) | N.S. |

Cada resultado está expresado como el valor medio ± su correspondiente S.E.M. obtenido en un número de preparaciones de islotes que se representa entre paréntesis. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre cada valor y su correspondiente control.

OXIDACIÓN DE OTROS SUSTRATOS

Buscando una explicación de por qué estos sustratos no afectan la fosforilación de glucosa, utilizada como una sonda sensible a las posibles variaciones citosólicas de ATP, se estudió su velocidad de oxidación mitocondrial (producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir del correspondiente sustrato radioisotópicamente marcado), investigando su sensibilidad

a rotenona (inhibidor específico de la cadena respiratoria) y a oligomicina (dependencia de la oxidación con respecto a la fosforilación oxidativa).

La tabla 24 muestra las velocidades de oxidación de todos los sustratos en comparación con la de la glucosa. Hay que tener en cuenta que, para poderlas comparar desde el punto de vista energético (producción de ATP), habría que expresarlas todas en relación al número de carbonos. La oxidación de glutamina es ligeramente superior a la de la glucosa y como esta, se inhibe en un 70% aproximadamente por rotenona 10 μ M. Sorprendentemente, a diferencia de la oxidación de glucosa, que es inhibida por oligomicina 2 μ g/ml en un 60%, la de glutamina no es significativamente modificada.

TABLA 24. Efecto de rotenona y oligomicina sobre la velocidad de oxidación de diferentes sustratos.

| [¹⁴ C]Sustratos | Velocidad de Oxidación (pmol sustrato oxidado/islxh) | | | | |
|-----------------------------|--|--------------------------|--------|---------------------|--------|
| | Control | Oligomicina 2 μ g/ml | P | Rotenona 10 μ M | P |
| Glucosa 3 mM | 2.55 \pm 0.14 (20) | 1.08 \pm 0.17 (7) | <0,001 | 1.17 \pm 0.30 (4) | <0,001 |
| Glucosa 20 mM | 9.27 \pm 0.46 (28) | 3.97 \pm 0.39 (9) | <0,001 | 2.77 \pm 0.19 (7) | <0,001 |
| Glutamina 10 mM | 10,9 \pm 0,74 (11) | 10,39 \pm 10,87 (7) | N.S. | 3,69 \pm 0,39 (5) | <0,001 |
| Leucina 10 mM | 4.82 \pm 0.39 (18) | 2.39 \pm 0.20 (5) | <0,01 | 1.84 \pm 0.14 (5) | <0,001 |
| Piruvato 1 mM | 1,18 \pm 0,137 (9) | 0,928 \pm 0,006 (6) | N.S. | 0,5 \pm 0,008 (6) | <0,01 |
| Piruvato 10 mM | 6,98 \pm 0,25 (10) | 4,82 \pm 0,22 (11) | <0,001 | 2,35 \pm 0,16 (5) | <0,001 |
| Piruvato 20 mM | 8,62 \pm 0,67 (5) | | | | |

Cada resultado está expresado como el valor medio \pm su correspondiente S.E.M. obtenido en un número de preparaciones de islotes que se representa entre paréntesis. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre cada valor y su correspondiente control.

El piruvato se oxida de forma dependiente de su concentración, alcanzando un máximo por encima de 10 mM. En relación con la oxidación de glucosa (hexosa), la velocidad máxima de oxidación de piruvato (derivado de una triosa) representa menos de un 50%. La oxidación de piruvato 1 y 10 mM es inhibida por rotenona 10 μ M en un 58 y 66% respectivamente. Por el contrario, mientras que la oxidación de piruvato 1 mM

no fué significativamente disminuida por oligomicina (2 $\mu\text{g/ml}$), ésta redujo la oxidación de piruvato 10 mM sólo en un 30%. La velocidad de oxidación de leucina 10 mM representa un 50% aproximadamente de la de glucosa 20 mM y es, similarmente a la de glucosa, inhibida por rotenona y oligomicina.

Para obtener una mayor evidencia experimental de que la oxidación de estos sustratos es fundamentalmente mitocondrial, se ensayaron conocidos inhibidores del ciclo de Krebs, como el fluoro-acetato (inhibidor de la citrato sintasa) y el ácido malónico (inhibidor de la succínico dehidrogenasa). Como muestra la tabla 25, ni el fluoroacetato 10 mM ni el malonato 5 y 10 mM fueron capaces de reducir significativamente la oxidación de glucosa o de glutamina. Ello sugiere que las células de los islotes son poco permeables a estos inhibidores.

TABLA 25. Efecto del fluoroacetato y ácido malónico sobre la velocidad de oxidación de glucosa 20 mM y glutamina 10 mM.

| $[^{14}\text{C}]$ sustrato (mM) + otros modificadores | Velocidad oxidación (pmol sustrato oxidado/islxh) | P |
|--|--|---------|
| Glucosa 20 mM | 10.35 \pm 1.18 (6) | control |
| Glucosa 20 mM + fluoroacetato 10 mM | 11.03 \pm 0.94 (4) | N.S. |
| Glucosa 20 mM + ácido malónico 5 mM | 11.21 \pm 1.12 (4) | N.S. |
| Glucosa 20 mM + ácido malónico 10 mM | 10.22 \pm 0.88 (4) | N.S. |
| Glutamina 10 mM | 12.96 \pm 0.7 (3) | control |
| Glutamina 10 mM + fluoroacetato 10 mM | 13.47 \pm 0.83 (3) | N.S. |

Cada resultado está expresado como el valor medio \pm su correspondiente S.E.M. obtenido en un número de preparaciones de islotes que se representa entre paréntesis. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre cada valor y su correspondiente control.

Se descartó que el piruvato o la glutamina tuvieran un metabolismo fundamentalmente anaerobio midiendo su conversión a lactato. Como se representa en la tabla 26, ni el piruvato (30 mM) ni la glutamina (10 mM) fueron significativamente convertidos a lactato.

TABLA 26. Conversión a lactato de piruvato 30 mM y glutamina 10 mM.

| Sustrato | Producción de lactato (pmol eq. glucosa /islxh) |
|-----------------|---|
| Piruvato 30 mM | 4,74 ± 1,29 (7) |
| Glutamina 10 mM | 3,79 ± 0,64 (4) |

Los resultados representan el valor medio \pm su correspondiente S.E.M. El número de las diferentes preparaciones de islotes usadas para cada condición se encuentra entre paréntesis.

La secreción de insulina (tabla 27) fue estimulada fundamentalmente por glucosa y en mucho menor grado por leucina cuyo efecto fué significativamente potenciado por glutamina que carece de este efecto con la glucosa. Ni la glutamina, ni el piruvato o el metilpiruvato estimularon significativamente por si mismos la secreción de insulina.

TABLA 27. Efecto de distintos sustratos sobre la secreción de insulina.

| Sustratos | Secreción de insulina (pg/minxisl) | P |
|----------------------------------|---------------------------------------|---------|
| Glucosa 3 mM | 8,8 ± 1,4 (8) | Control |
| Glucosa 7 mM | 59 ± 5,6 (8) | <0,001 |
| Glucosa 20 mM | 91 ± 15 (7) | <0,001 |
| Piruvato 10 mM | 2,27 ± 0,24 (5) | <0,001 |
| Piruvato 20 mM | 2,29 ± 0,33 (5) | <0,001 |
| Glutamina 10 mM | 5,68 ± 0,83 (8) | N.S. |
| Leucina 10 mM | 13,05 ± 1,04 (16) | <0,001 |
| Metilpiruvato 10 mM | 9,64 ± 1,4 (8) | N.S. |
| Glutamina 10 mM+ Leucina 10 mM | 73,4 ± 6,3 (13) | <0,001 |
| Glutamina 10 mM + Piruvato 10 mM | 15 ± 4,9 (8) | p<0,01 |
| Glucosa 20 mM + Piruvato 10 mM | 106 ± 14 (8) | p<0,001 |
| Glucosa 3 mM + Piruvato 10 mM | 12,3 ± 1,4 (8) | N.S. |
| Glucosa 7 mM + Piruvato 10 mM | 63 ± 10 (8) | p<0,001 |
| Leucina 10 mM + Piruvato 10 mM | 11,3 ± 2,4 (8) | N.S. |

Los resultados representan el valor medio ± su correspondiente S.E.M. El número de las diferentes preparaciones de islotes usadas para cada condición se encuentra entre paréntesis.

Estudiamos de la velocidad de oxidación de otros sustratos como la L-alanina, L-lisina y L-prolina y su capacidad para estimular la secreción de insulina. Observamos que estos aminoácidos no son prácticamente oxidados y son incapaces de estimular la secreción de insulina por si solos. La velocidad de oxidación de estos sustratos no difiere significativamente de su correspondiente blanco (valor de oxidación en ausencia de sustrato) (tabla 28).

TABLA 28. Velocidad de oxidación y secreción de insulina de distintos aminoácidos.

| Sustrato | Velocidad oxidación [¹⁴ C]sustrato (pmol/islxh) | Secreción insulina (pg/minxisl) |
|-----------------|---|------------------------------------|
| L-alanina 10 mM | 0.91 ± 0.2 (12) | 5.06 ± 1.1 (10) |
| L-lisina 10 mM | 0.1 ± 0.0 (6) | 8.2 ± 1.0 (10) |
| L-prolina 10 mM | 1.12 ± 0.03 (4) | 3.1 ± 0.54 (6) |
| D-Glucosa 3 mM | 2.55 ± 0.14 (20) | 8.8 ± 1.4 (8) |
| D-Glucosa 20 mM | 9.27 ± 0.46 (28) | 91 ± 15 (7) |

Los resultados representan el valor medio ± su correspondiente S.E.M. El número de las diferentes preparaciones de islotes usadas para cada condición se encuentra entre paréntesis.

Al observar la potenciación de la D-glutamina sobre la secreción de insulina inducida por L-leucina, estudiamos el efecto de L-leucina sobre la velocidad de oxidación de D-glutamina y biceversa. La L-leucina no incrementa la velocidad de oxidación de la D-glutamina, pero la D-glutamina desciende la producción de ¹⁴CO₂ a partir de L-[U-¹⁴C]leucina.

Tabla 29. Efecto de L-leucina sobre la oxidación de D-[U-¹⁴C]glutamina y D-glutamina sobre la oxidación de L-[U-¹⁴C]leucina.

| Sustrato | Velocidad de oxidación (pmol sustrato oxidato/islxh) | P |
|--|---|---------|
| D-[U- ¹⁴ C]glutamina 10 mM | 10.99 ± 0.74 (11) | Control |
| D-[U- ¹⁴ C]glutamina 10 mM + L-leucina 10 mM | 10.64 ± 1.05 (5) | N.S. |
| L-[U- ¹⁴ C]leucina 10 mM | 5.82 ± 0.39 (28) | Control |
| L-[U- ¹⁴ C]leucina 10 mM + D-glutamina 10 mM | 2.59 ± 0.091 (5) | <0,001 |

Cada resultado está expresado como el valor medio ± su correspondiente S.E.M. obtenido en un número de preparaciones de islotes que se representa entre paréntesis. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre cada valor y su correspondiente control.

Discusión

DISCUSIÓN

La relación entre la concentración de glucosa y la producción de lactato en los islotes de Langerhans, muestra una saturación a concentraciones bajas de glucosa. La producción de lactato llega a su máximo a una concentración de glucosa 3 mM y a la mitad de su máximo a una concentración 0,5 mM. Esta curva dosis-respuesta está significativamente más desplazada hacia la izquierda que las descritas anteriormente (8,97,98). Estas diferencias pueden ser debidas a los diferentes métodos empleados para la determinación del lactato: conversión enzimática del lactato a piruvato por la lactato deshidrogenasa y NAD⁺ en un equilibrio desfavorable (rango nanomolar) (97), frente al presente método directo, basado en la separación por cromatografía líquida de alta resolución de un derivado del lactato (rango picomolar) (113). El método usado en este trabajo es más sensible que cualquiera de los métodos enzimáticos, con la ventaja añadida de no tener que tratar con la inespecificidad relativa de la lactato deshidrogenasa que se ha observado que sobreestima la conversión de glucosa a lactato en islotes (82). *Zawalich y Matschinsky*, usando un método enzimático con amplificación del NADH por ciclación enzimática, obtuvieron resultados más próximos a los presentados en este trabajo (valor de la K_m aparente alrededor de 2 mM de glucosa) (99). Las velocidades máximas de producción de lactato en presencia de glucosa varían mucho entre los distintos estudios publicados anteriormente, con un rango de variación entre 30 y 120 pmol de lactato por islote y hora (8,82,97,98,99,101 revisión 7). Las variaciones encontradas en los niveles de lactato pueden ser atribuibles al tamaño variable de los islotes; nuestros resultados se encontrarían en el límite inferior de este rango. El hecho de que los islotes de ratón *ob/ob* (más del 90% de sus células son β) muestren niveles similares de producción de lactato a los de nuestros islotes, sugieren fuertemente que nuestros datos son representativos de las células β de los islotes (121).

La utilización de glucosa por los islotes de rata presenta una marcada dependencia de la concentración extracelular de glucosa. Al contrario que la producción de lactato, la velocidad de utilización sigue aumentando al incrementar de 3 a 20 mM la concentración de glucosa en el medio de incubación; este incremento es de 2,25 veces. Este aumento es significativamente menor que los presentados anteriormente en otros trabajos, pero coincide con estudios recientes de otros grupos investigadores (121). Estos resultados parecen indicar que a concentraciones subestimuladoras de glucosa, el metabolismo de los islotes pancreáticos es predominantemente anaerobio. En la

cuantificación de la velocidad de oxidación de glucosa, observamos que al incrementar su concentración a 20 mM se produce un incremento preferencial de la oxidación de la glucosa, ya que la producción de lactato permanece constante.

Los presentes resultados confirman estudios anteriores del efecto inhibitor de la β -iodoacetamida o iodoacetato sobre la utilización de glucosa y caracterizan con más detalle el efecto sobre la producción de lactato (65,91,122,127). Demostramos que tanto la utilización de glucosa 20 mM como su respuesta secretora son más sensibles a la β -iodoacetamida que la producción de lactato: 0,1 mM del inhibidor produce un descenso significativo de la secreción de insulina y de la velocidad de utilización de glucosa 20 mM, pero no tiene efecto en la producción de lactato de 3 ni de 20 mM de glucosa, así como sobre la velocidad de utilización de glucosa 3 mM. Esto parece indicar que la reducción de la actividad de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa causada por β -iodoacetamida 0,1 mM, restringe la capacidad glicolítica máxima de los islotes pero no limita la glicolisis a concentraciones de glucosa subsaturantes. Este hecho también apoyaría la idea de que la formación de lactato no se incrementa sustancialmente a altas concentraciones de glucosa y que es el destino predominante de la glucosa a bajas concentraciones. La disminución en paralelo de la utilización de glucosa y de la formación de lactato hasta niveles muy bajos, demuestra el potente efecto de altas concentraciones de β -iodoacetamida sobre la glicolisis de los islotes.

La inhibición dependiente de la concentración de D-manoheptulosa sobre la secreción de insulina inducida por glucosa 20 mM encontrada en este trabajo es similar a la relación descrita en trabajos anteriores (62,122). Una relación similar también se puede aplicar a la inhibición del metabolismo de glucosa 20 mM por D-manoheptulosa: A la máxima concentración efectiva (5 o 20 mM), el inhibidor provoca un descenso de la utilización y de la oxidación de glucosa 20 mM hasta niveles ligeramente por encima de los obtenidos en glucosa 3 mM. Esta relación entre la concentración de D-manoheptulosa y la utilización (122) o la oxidación de glucosa 20 mM (8,62) ya ha sido descrita anteriormente. Aunque en alguno de estos trabajos (117,98) se encontraros contradicciones entre la capacidad de la D-manoheptulosa para inhibir la utilización (122) o la oxidación (62) y su ausencia de efecto sobre la producción de lactato, la cual aumentaba al aumentar la concentración de glucosa en un rango estimulante de la secreción (3 a 27,5 mM) (62,65,122). En nuestro trabajo se demuestra que la producción de lactato a partir de glucosa 3 o 20 mM es solo ligeramente afectada por D-

manoheptulosa en comparación con otros parámetros metabólicos a 20 mM de glucosa. De acuerdo con este hallazgo, la D-manoheptulosa no inhibe, o afecta ligeramente, tanto la velocidad de utilización como la de oxidación de glucosa 3 mM.

La D-manoheptulosa compite con la glucosa por el transporte a través de la membrana en las células β (62) y actúa como un inhibidor competitivo de la fosforilación de glucosa en homogenizados de islotes (65,123) o del isoenzima de glucoquinasa purificada cromatográficamente (97) con unos valores de K_i de 0,25 (35) o 0,7 mM (97). Por otra parte, en homogeneizados de islotes de ratones *ob/ob* se ha demostrado que la D-manoheptulosa inhibe la actividad de la fosforilación de la glucosa de alto K_m pero no la de bajo K_m (63). La inhibición máxima del metabolismo de la glucosa 20 mM por D-manoheptulosa 5 mM es compatible con el bajo valor de su K_i por la glucoquinasa (97,65). La ausencia de efectos potentes sobre el metabolismo a bajas concentraciones de glucosa podría también explicarse por una inhibición preferencial de la glucoquinasa frente a la hexoquinasa de bajo K_m en islotes (63).

En resumen, los presentes resultados muestran que la producción de lactato está prácticamente saturada a bajas concentraciones de glucosa, lo que sugiere que es el principal producto final de la glicolisis catalizada por la hexoquinasa de bajo K_m . Con respecto al posible mecanismo, es posible que la LDH de los islotes además de estar poco expresada en las células β (124), tenga un K_m para el piruvato que es menor que el correspondiente valor del sistema de transporte mitocondrial. Independientemente del posible mecanismo, la restricción de la producción de lactato a altas concentraciones de glucosa, es otro factor importante que probablemente contribuya a la estimulación preferencial del metabolismo oxidativo de los islotes, que acompaña la activación de la secreción de insulina en las células β .

El estudio en paralelo de los distintos parámetros metabólicos nos ha permitido estudiar la contribución cuantitativa de la oxidación y de la producción de lactato a la velocidad global de utilización de glucosa por los islotes. Mientras que a concentraciones bajas de glucosa (3 mM, no estimulante de la secreción) casi toda se transforma en lactato (90%), a concentraciones altas (20 mM, estímulo máximo para la secreción) se produce un aumento de su oxidación mitocondrial aunque no de la producción de lactato. Este aumento de la oxidación sólo justifica cuantitativamente un 50% del incremento de la utilización global de glucosa (producción de $^3\text{H}_2\text{O}$) que tiene lugar por el cambio de

su concentración de 3 a 20 mM. El 50% restante de esta respuesta metabólica de los islotes a la glucosa podría deberse a un aumento del flujo en otras vías diferentes a la glicolisis (vía pentosa fosfato?) o deberse a la conversión de piruvato en aminoácidos o lípidos. El flujo de glucosa a través de la vía de las pentosas ha sido evaluado en este trabajo y confirma resultados anteriores: esta vía no parece ser cuantitativamente importante, ni depender de la concentración de glucosa (21). El aumento de la concentración de glucosa de 3 a 20 mM produce una disminución del porcentaje de glucosa utilizada que se metaboliza por esta vía pasando del 2,5 al 1%. Se pensó que la ausencia de un mayor flujo metabólico a través de esta vía podría ser debido a la inhibición de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa por niveles altos de NADPH (68, 118). Por ello utilizamos el tratamiento con menadiona la cual se reduce oxidando el NADPH, disminuyendo por tanto sus niveles. Este tratamiento, a pesar de incrementar seis veces el flujo de la vía de las pentosas fosfato a glucosa 3 mM y el doble a glucosa 20 mM, no presenta una relación positiva dependiente de la concentración de glucosa como ocurre en el proceso de secreción de insulina, la cual aumenta al incrementarse la glucosa extracelular.

La búsqueda de una respuesta nos llevó a estudiar la salida de piruvato al medio extracelular. El estudio exhaustivo de esta posibilidad demostró que no se observa salida de piruvato al medio extracelular. La síntesis *de novo* de lípidos no parece tampoco ser cuantitativamente importante (125). Por tanto, sería interesante investigar en un futuro si la síntesis de aminoácidos podría justificar ese 50% de aumento del metabolismo global de la glucosa que ocurre a concentraciones de la misma que son estimulantes de la secreción.

En relación con aspectos reguladores, la inhibición de la función mitocondrial con inhibidores de la cadena respiratoria (antimicina A, rotenona), de la respiración (oligomicina) o agentes desacoplantes (dinitrofenol) produce, paradójicamente, una inhibición de la velocidad global de utilización de glucosa 20 mM. Esta inhibición no se acompaña de una disminución de la producción de lactato que permanece inalterada y es independiente de que la oxidación de la glucosa no sea modificada (agentes desacoplantes) o inhibida (rotenona, oligomicina). La disminución de la concentración intracelular de ATP era de esperar que produjera una aceleración de la glicolisis por desinhibición de la fosfofructoquinasa y, consecuentemente de la hexoquinasa al disminuir los niveles de glucosa-6-fosfato. Esta ausencia de efecto Pasteur, evidenciada

previamente en ausencia de oxígeno (75), parece ser una característica de las células β de los islotes que las diferencia de otras células del organismo y que ni siquiera comparten algún tipo de célula β tumoral que no segrega insulina en respuesta a glucosa: las células RIN5mF responden a la anoxia (76) o a la inhibición de sus mitocondrias (124) con una aceleración de su velocidad de utilización y de la producción de lactato de hasta casi 20 veces. Una de las hipótesis planteadas para explicar la inhibición de la utilización de la glucosa podría ser la falta de ATP para fosforilarla. El planteamiento experimental establecido fue el estudio del efecto de diferentes sustratos mitocondriales sobre la velocidad de fosforilación de glucosa en presencia de β -iodoacetamida. Al observar que ni la utilización ni la fosforilación de la glucosa se recuperaban bajo estas condiciones, nos hizo pensar en la posibilidad de que la β -iodoacetamida afectara a otros niveles además de la glicolisis. El estudio del efecto de la β -iodoacetamida sobre la oxidación del piruvato y de la glutamina confirmó que producía una inhibición inespecífica del metabolismo mitocondrial de los sustratos usados. Por lo tanto, no se puede utilizar la β -iodoacetamida como inhibidor específico de la glicolisis. Este hallazgo nos obligó a cambiar de estrategia.

Estudiamos el efecto del D-gliceraldehido y el metilpiruvato (sustratos mitocondriales) sobre la fosforilación de la glucosa. Elegimos el D-gliceraldehido al ser un sustrato glicolítico que es posiblemente fosforilado por una trioquinasa en los islotes y por tanto, no interfiere directamente con la fosforilación de la glucosa (119). El piruvato es sustancialmente oxidado por las células de los islotes de forma dependiente de su concentración (84) pero, paradójicamente, no estimula "per se" la secreción de insulina como lo hace el D-gliceraldehido o la propia glucosa. Pensando en una posible limitación de su metabolismo por la baja permeabilidad de la membrana plasmática, se ha utilizado recientemente su éster metílico que se transportaría más eficazmente y que se hidrolizaría generando piruvato en el citoplasma (120).

Nuestros resultados confirman que el D-gliceraldehido es un iniciador de la secreción de insulina en islotes aislados de rata (77). Observamos una respuesta significativa ya a una concentración de D-gliceraldehido 1 mM. La magnitud de la respuesta secretora parece que alcanza un máximo alrededor de 5 mM y decrece a mayores concentraciones de la triosa (10 y 20 mM). Esta respuesta secretora máxima inducida por el D-gliceraldehido es aproximadamente la mitad de la inducida por glucosa 20 mM, hecho que ya ha sido reseñado anteriormente (79). El estudio en detalle de la

relación entre la concentración de D-gliceraldehido y su velocidad de oxidación realizado por primera vez en este trabajo, en comparación con trabajos anteriores en los que solamente se realizó el estudio metabólico a una sola concentración de la triosa (77,78,79,80), nos ha llevado a observar una dependencia positiva entre la velocidad de oxidación de D-gliceraldehido en un rango de 1 a 5 mM y su capacidad estimuladora de la secreción de insulina. Una concentración superior de la triosa no produce un aumento de su velocidad de oxidación pero disminuye su capacidad secretora. Es posible que esta reducción de la respuesta secretora encontrada a concentraciones mayores de 5 mM de D-gliceraldehido en este trabajo o a concentraciones superiores en otros trabajos (79,126), sea debido a una acumulación de metabolitos ácidos como el D-lactato (hecho demostrado en nuestro laboratorio, datos no mostrados, 82) o el glicerato-1-fosfato (119). Estos compuestos inducirían una acidificación del citoplasma (frente a la alcalinización que induce el incremento de glucosa) que podría justificar por un efecto inespecífico el descenso de la concentración de ATP observado en islotes expuestos a altas concentraciones de triosa (77).

Según esto resultados, el D-gliceraldehido es oxidado en los islotes de forma dependiente de su concentración y esta dependencia es similar a la caracterizada en su actividad secretora. Probablemente imita el efecto de la glucosa entrando en la glicolisis y produciendo piruvato que entra en la mitocondria para generar ATP. Igualmente, el metilpiruvato parece ser que se transporta al interior de las células β más eficazmente que el compuesto no esterificado y que se hidroliza generando piruvato en el citosol (120). Ambos compuestos producen un descenso de un 30% de la velocidad de detritiación de la [2- 3 H]-glucosa 1 mM. A esta concentración de glucosa, la mayor parte (probablemente más del 90%) es convertida a lactato y su oxidación mitocondrial probablemente contribuya muy pobremente al incremento de ATP citosólico. De hecho, se ha visto que el contenido total de ATP de los islotes desciende a concentraciones inferiores a 3 mM y que el D-gliceraldehido 5 mM mantiene el contenido de ATP al mismo nivel que glucosa 20 mM (77). El pool de glucosa-6-fosfato probablemente no se incremente (la glucosa-6-fosfato marcada no se diluye) ya que los islotes carecen de los enzimas gluconeogénicos (23) por lo que el gliceraldehido-fosfato formado a partir del gliceraldehido exógeno, no puede ser convertido en glucosa-6-fosfato. Por tanto, es probable que la reducción de la detritiación de la [2- 3 H]glucosa observada, refleje una inhibición parcial de la actividad hexoquinasa de bajo Km de los islotes inducida por un incremento de los niveles de glucosa-6-fosfato, debido a la inhibición alostérica de

fosfofructoquinasa por un incremento de la concentración de ATP.

A juzgar por la detritiación de la [2-³H]glucosa, tanto el D-gliceraldehido 5 mM como el metil piruvato 10 mM producen una inhibición de la fosforilación en un porcentaje constante (aproximadamente un 30%), al incrementar la concentración de glucosa. Asumiendo que la glucoquinasa de los islotes no es sensible a glucosa-6-fosfato, estos resultados sugieren que la glucosa induce una inhibición progresiva de la actividad hexoquinasa de bajo Km al aumentar su concentración. Este hecho podría explicarse por el incremento de los niveles de glucosa-6-fosfato generado por la glucoquinasa y por la inhibición preestablecida de la fosfofructoquinasa-1 por el metabolismo oxidativo del D-gliceraldehido. Se conoce desde hace tiempo que la glucosa incrementa la concentración de glucosa-6-fosfato dependiendo de su concentración (8,37,128). A pesar de que la glucosa puede sustituir al D-gliceraldehido como sustrato mitocondrial, es curioso observar un descenso del 30% de la fosforilación de la glucosa a una concentración 20 mM a la que se piensa que se produce la máxima velocidad de metabolismo oxidativo. Esto probablemente indique que la generación de ATP no puede ser saturada por glucosa y que el D-gliceraldehido podría inducir un incremento adicional de la respiración. El descenso absoluto de la fosforilación de glucosa 20 mM inducido por D-gliceraldehido o metil piruvato (14 pmol/islxh) es casi idéntico a la velocidad de detritiación obtenida a glucosa 3 mM (13.7 pmol/islxh). Por tanto, podemos concluir que la actividad hexoquinasa de bajo Km no está regulada por retroalimentación cuando los islotes metabolizan glucosa solamente. Este hecho podría ser el resultado de un "efecto protector" de la fructosa-2,6-bifosfato sobre la fosfofructoquinasa-1 que antagonizaría su inhibición alostérica por ATP (72,129) cuya concentración aumenta cuando añadimos sustratos adicionales. Particularmente, si estos sustratos alternativos a la glucosa añadidos, como el D-gliceraldehido y el metil piruvato, no incrementan los niveles de fructosa-2,6-bifosfato.

Otros sustratos, como el piruvato y la glutamina, que son sustancialmente oxidados por los islotes, fallan en modificar la velocidad de detritiación de la [2-³H]glucosa. Se ha visto que estos sustratos son incapaces de mantener los niveles de ATP (77), el cociente ATP/ADP o la carga adenilica a los mismos niveles que la glucosa (84,130) incluso a pesar de que son oxidados a velocidades relativamente altas en relación con la glucosa. Ninguno de los dos sustratos fue capaz de incrementar la concentración de ATP en mitocondrias aisladas de islotes de *ob/ob* mantenidas con un

suministro constante de ADP (131). Esta discrepancia junto con el hecho demostrado de que tanto el piruvato (84) como la glutamina (130) son secretagogos muy débiles, ha sido atribuida a su fuerte acción inhibidora de la oxidación de nutrientes endógenos. Nuestros resultados ofrecen una explicación alternativa a esta discrepancia entre la velocidad de oxidación de estos sustratos y su capacidad de generar ATP mitocondrial y estimular la secreción de insulina. La oxidación de la glutamina no es sensible al tratamiento con oligomicina y por lo tanto, no está acoplada a la fosforilación oxidativa en las células de los islotes. Está podría ser la razón por la que la glutamina no estimula la secreción de insulina, pero podría permitir que fuera una fuente de nitrógeno continuo para la síntesis de aminoácidos (proteínas). La velocidad máxima de oxidación del piruvato es aproximadamente la mitad de la de la glucosa y es solo parcialmente sensible (30%) a oligomicina, lo cual refleja su acoplamiento parcial a la fosforilación oxidativa. Como resultado de esto, el metabolismo del piruvato exógeno probablemente no genera suficiente ATP para desencadenar completamente la secreción de insulina.

Esta selectividad que muestran las células de los islotes, entre el acoplamiento de la oxidación de un sustrato y la fosforilación oxidativa, genera nuevas preguntas. Una de ellas, es explicar por qué el piruvato exógeno es metabolizado de diferente manera que el generado a través de la glicolisis, cuya oxidación está acoplada a la fosforilación oxidativa. Otra diferencia metabólica entre el piruvato exógeno y el derivado de la glicolisis, es la incapacidad del primero para ser convertido a lactato. Una posibilidad podría ser que la glicolisis de los islotes "canalizara" el piruvato hacia la lactato deshidrogenasa o hacia las mitocondrias acopladas. Existen evidencias experimentales que apuntan la posibilidad de una organización subcelular específica de algunas de las enzimas de la glicolisis. Primero, se ha encontrado que las actividades glucoquinasa y hexoquinasa de bajo K_m , están parcialmente unidas a las proteínas mitocondriales (52,53). Segundo, la sobreexpresión de glucoquinasa en islotes de rata, no incrementa proporcionalmente la velocidad de utilización de la glucosa ni la secreción de insulina y se ha sugerido que el enzima tiene que ensamblarse en un complejo para ser funcionalmente competente (58). Tercero, *Malaisse y Bodur* (132) interpretaron la discrepancia encontrada entre la detritiación de $[2-^3\text{H}]$ -glucosa y $[5-^3\text{H}]$ -glucosa en los islotes, como una "canalización" de las hexosas-6-fosfato de un enzima a otro en las primeras etapas de la glicolisis.

La existencia de heterogeneidad en las mitocondrias de los islotes podría ayudar

a entender que la oxidación de la glutamina y leucina están opuestamente acopladas a la fosforilación oxidativa. La oxidación de leucina está bien acoplada a la fosforilación oxidativa, pero es incapaz de afectar la detritiación de la [2-³H]-glucosa y se comporta como un débil secretagogo en relación con su velocidad de oxidación. No sabemos como esta hipotética segregación funcional de las mitocondrias de los islotes podría afectar, no sólo el tipo de sustrato oxidado, sino también la localización subcelular y la eficacia secretora del incremento de ATP. La potenciación por la glutamina de la secreción inducida por leucina se piensa que es el resultado de un incremento de la oxidación de glutamina causado por la activación alostérica inducida por leucina de la glutamato deshidrogenasa (32). La leucina no incrementa la velocidad de oxidación de la glutamina, pero la glutamina desciende la producción de ¹⁴CO₂ a partir de [U-¹⁴C]leucina. Es posible que la activación de la oxidación de glutamina por leucina sea demasiado baja comparado con el alto flujo metabólico de la glutamina en los islotes. El incremento de ATP esperado es probablemente menor que el inducido por glucosa para estimular la secreción de insulina, a juzgar por sus respectivas respuestas secretoras.

En resumen, el efecto selectivo de la oligomicina sobre la oxidación de diferentes sustratos sugiere la existencia de una heterogeneidad mitocondrial en las células de los islotes. Un ejemplo de esta heterogeneidad funcional, podría ser la "canalización" del piruvato derivado de la glicolisis hacia mitocondrias "acopladas". Por otro lado, la "canalización" de la glutamina hacia mitocondrias "desacopladas", podría ser el mecanismo responsable de la disociación entre el metabolismo y la secreción de insulina mostrada por el aminoácido. La segregación funcional de la oxidación de los sustratos en los islotes, podría ser la estrategia utilizada por las células β para llegar a ser exclusivamente sensibles a la estimulación por glucosa.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1- La producción de lactato en los islotes está prácticamente saturada a concentraciones bajas de glucosa, lo que sugiere que es el principal producto final de la glicolisis catalizada por la hexoquinasa de bajo K_m . La restricción de la producción de lactato a altas concentraciones de glucosa, es otro factor importante que probablemente contribuye a la estimulación preferencial del metabolismo oxidativo mitocondrial que acompaña la activación de la secreción de insulina en las células β de los islotes.

2- El aumento de glucosa metabolizada a una concentración 20 mM podría tener lugar también por vías alternativas a la glicolisis, pues no es totalmente justificable por el incremento del metabolismo oxidativo más la producción de lactato. Estas vías no son ni la ruta de las pentosas fosfato, ni la salida de piruvato al medio extracelular. Por tanto, sería interesante investigar en un futuro si la síntesis de aminoácidos podría justificar ese aumento del 50% del metabolismo global de la glucosa que ocurre a concentraciones de la misma que son estimulantes de la secreción.

3- La actividad hexoquinasa de bajo K_m no está regulada por retroinhibición cuando los islotes metabolizan glucosa solamente. La inhibición de la hexoquinasa se consigue al añadir sustratos oxidables que producen ATP.

4- La oxidación mitocondrial de los sustratos no garantiza la estimulación de la secreción de insulina. Es necesario un acoplamiento entre la oxidación y la fosforilación oxidativa, tal y como indican el metabolismo de la glutamina y el piruvato que a pesar de que se oxidan a unas velocidades del mismo orden que la de la glucosa, no están (glutamina) o solo parcialmente (piruvato) acopladas a la fosforilación oxidativa, por lo que no generan ATP y por lo tanto no estimulan la secreción de insulina.

5- Esta selectividad de acoplamiento entre la oxidación del sustrato y la fosforilación oxidativa, sugiere la existencia de una heterogeneidad de mitocondrias en las células de los islotes. Esta segregación funcional de la oxidación de los sustratos, podría ser la estrategia utilizada por las células β para llegar a ser exclusivamente sensibles a la estimulación por glucosa.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Unger, R.H. The milieu interieur and the islets of Langerhans. *Diabetologia* 20:1-11, (1981).
2. Beltran del Rio, H., Schnedl, W., Ferber, S., Newgard, C.B. *In pancreatic Islet Transplantation*, ed. W.Chick, R. Lanza. 1:169-183. Austin: Landes, (1994).
3. Lacy, P.E., Scharp, D.W. Islet transplation in treating diabetes. *Annu. Rev. Med.* 37: 33-46, (1986).
4. Newgard, C.B. Cellular engineering for the treatment of metabolic disorders: Prospects for therapy in diabetes. *Bio-Technology* 10: 1112-20, (1992).
5. Johnson, J.H, Ogawa, A., Chen, L., Orci, L., Newgard, C.B., Alam, T., and Unger, R. H. Underexpression of beta cell high Km glucose transporters in non insulin-dependent diabetes. *Science* 250: 546-49, (1990).
6. Pfeiffer, M.A., Halter, J.B., Porte, D. Jr. Insulin secretion in diabetes mellitus. *Am. J. Med.* 70: 579-88, (1981).
7. Meglasson, M.D. and Matschinsky, F. M. Pancreatic Islet Glucose Metabolism and Regulation of Insulin Secretion. *Diabetes Metab. Reviews*, Vol. 2. N°3 & 4: 163-214, (1986).
8. Ashcroft, S. J., Hedeskov, C. J. and Randle, P. J.:Glucose Metabolism in Mouse Pancreatic Islets. *Biochem. J.* 118: 143-154, (1970).
9. Niki, A and Niki, H.: Hexose anomers insulin release and diabetes Mellitus. *Biomedical Research* 1: 189-206, (1980).
10. Niki, A., Niki, H., Miwa I., Okuda J. Insulin secretion by anomers of D-glucose. *Science* 186:150-151, (1974).
11. Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., and Sener, A. Anomeric specificity of hexose

- metabolism in pancreatic islets. *Physiological Rev.* **63** (3): 773-785 (1983).
12. Grodsky, G. M., Batts, A.A., Bennett, L.L., Vcella, C., Mc Williams, N. B. and Smith, D.C. Effects of carbohydrates on secretion of insulin from isolated rat pancreas. *Am. J. Physiol.* **205**: 638-644, (1963).
13. Coore, H. G. and Randle, P. J. Regulation of insulin secretion studie with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro. *Biochem. J.* **93**: 66-78, (1964).
14. Ashcroft, S.J.H. and Lowry, M.; β -cells recognition of stereoisomers of D-glucose. *Diabetologia* **17**: 165-168, (1979).
15. Ashcroft, S.J.H. *In the islets of Langerhans*, ed. S.J. Cooperstein, D. Watkins. pp. 117-48. London: Academic. (1981).
16. Mac Donald M.J., Fahier L.A. Insulin release in pancreatic islets by glycolytic and a Krebs cycle intermediate: contrasting patterns of glyceraldehyde phosphate and succinate. *Arch. Biochem. Biophys* **279**: 104-108, (1990).
17. Wollheim, C. B. and Biden, T. Signal transduction in insulin secretion: Comparison between fuel stimuli and receptor agonists. *Ann. N. Y. Acad. Sci. U.S.A* **488**: 317-333, (1986).
18. Malaisse, W.J., Sener, A., Koser, M., Ravazzola, M. and Malaisse-Lagae, F. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: insulin release due to glycogenolysis in glucose-deprived islets. *Biochem. J.* **146**: 447-454, (1977).
19. Sener, A., Malaisse, W. J.: The metabolism of glucose in pancreatic islets. *Diabetes Metab.* **4**: 127-133, (1978).
20. Verspohl, E.J., Handel, M., and Ammon, H.P.T. Pentosephosphate shunt activity of rat pancreatic islets: its dependence on glucose concentration. *Endocrinology* **105**: 1269-1274, (1979).
21. Ashcroft, S. J. H., Weerasinghe, L. C. C., Bassett, J. M. and Randle, P. J. The

pentose Cycle and Insulin Release in Mouse Pancreatic Islets. *Biochem. J.* **126**: 525-532, (1972).

22. Waddell, I. D. and Burchell, A. The microsomal glucose-6-phosphatase enzyme of pancreatic islets. *Biochem. J.* **255**: 471-476, (1988).

23. Mc Donald, M. J., Mc Kenzie, D. J., Walker, T. M. and Kaysen, T. M. Lack of gluconeogenesis in pancreatic islets: Expression of gluconeogenesis enzyme genes in islets. *Horm. Metab. Res.* **24**: 158-160, (1992).

24. Hellman, B., Sehlin J., and Taljedal, I-B. Evidence for mediated transport of glucose in mammalian pancreatic β -cells. *Biochem. Biophys. Acta.* **241**: 147-154, (1971).

25. Unger, R. H. Diabetic hyperglycemia: Link to impaired glucose transport in pancreatic β -cells. *Science* **251**: 1200-1205, (1991).

26. Hughes, S.D., Johnson, J., Quaade, C. and Newgard, C. B. Engineering of glucose-stimulated insulin secretion and biosynthesis in non-islet cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 688-92, (1992).

27. Newgard, C.B., and Mc Garry, J. D. Factors in pancreatic β -cell signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 689-719, (1995).

28. Meglasson, M.D., Burch, P. T., Berner, D. K., Najafi, H., Vogin, A. P. and Matschinsky, F. M.: Chromatographic resolution and kinetic characterization of glucokinase from islets of Langerhans. *Proc. Natl. Sci USA* **80**: 85-89 (1983)

29. Matschinsky, F.M., Ellerman, J.E. Metabolism of glucose in the islets of Langerhans. *J. Biol. Chem.* **243**: 2730-36. (1968).

30. Iynedjian, P.B., Pilot, P-R., Nospikel, T., Milburn, J. L., Quaade, C., et al. Differential expression and regulation of the glucokinase gene in liver and islets of Langerhans. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 7838-42 (1989).

31. Magnuson, M.A., Shelton, K.D. An alternate promoter in the glucokinase gene is

- active in the pancreatic beta cell. *J. Biol. Chem.* **264**: 15936-42 (1989).
32. Sener, A. and Malaisse, W. J. L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. *Nature* **288**: 187-189, (1980).
33. Liang, Y., Jetton, T. L., Zimmerman, E. C., Najafi, H., Matschinsky, F. M. and Magnuson, M. A. Effects of RNA splicing on glucokinase isoform activities in the pancreatic islets, liver and pituitary. *J. Biol. Chem.* **266**: 6999-7077, (1991).
34. Pilkis, S. J., Weber I. T., Harrison R. W., and Bell G. I. Glucokinase: structural analysis of a protein involved in susceptibility to diabetes. *J. Biol. Chem.* **269**: 21925-21928, (1994).
35. Ashcroft, S. J., and Randle, P. J. Enzymes of glucose metabolism in normal mouse pancreatic islets. *Biochem. J.* **119**: 5-15, (1968).
36. Malaisse, W. J., Sener, A., Levy, J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Fasting-induced adaptation of Key glycolytic enzymes in isolated islets. *J. Biol. Chem.* **251**: 1731-1737, (1976).
37. Giroix, M-H., Sener, A., Pipeleers, D.G., Malaisse, W.J. Hexose metabolism in pancreatic islets. Inhibition of Hexokinase. *Biochem. J.* **223**: 447-453, (1984).
38. Lenzen, S. and Panten, U. Signal recognition by pancreatic β -cells. *Biochem. Pharmacol* **37**: 371-378, (1988).
39. Trus, M.D., Zawalich, W.S., Burch, P.T., Berner, D.K., Weill, V.A. and Matschinsky, F.M. Regulation of glucose metabolism in pancreatic islets. *Diabetes* **30**: 911-22, (1981).
40. Malaisse, W. J., Malaisse-lagae, F., Davies, D. R., Vandercammer, A. and Van Schaftingen, E. Regulation of glucokinase by a fructose-1-phosphate sensitive protein in pancreatic islets. *Eur. J. Biochem.* **190**: 539-545, (1990).
41. Vandercammen A., and Van Schaftingen E. The mechanism by which rat liver

glucoquinase is inhibited by the regulatory protein. *Eur. J. Biochem.* 191: 483-489, (1990).

42. Van Schaftingen E., and Vandercammen A. Stimulation of glucose phosphorylation by fructose in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 179: 173-177, (1989).

43. Van Schaftingen E. A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose-6-phosphate and fructose-1-phosphate. *Eur. J. Biochem.* 179: 179-184, (1989).

44. Zawalich, W.J., Rognstad, R., Pagliara, A.S., and Matschinsky, F.M. A comparison of the utilization rates and hormone-releasing actions of glucose, mannose, and fructose in isolated pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* 252: 8519-8523, (1977).

45. Capito, K., Hedekov, C.J., Landt, J., Thams, P. Pancreatic islet metabolism and redox state during stimulation of insulin secretion with glucose and fructose. *Acta Diabetol. Lat.* 21: 365-374, (1984).

46. Sener, A., Giroix, M.H., Malaisse, W.J. Hexose metabolism in pancreatic islets: the phosphorylation of fructose. *Eur. J. Biochem.* 144: 223-226, (1984).

47. Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Davies, D. R., and Van Schaftingen, E. Presence of fructokinase in pancreatic islets. *FEBS lett.* 255: 175-178, (1989).

48. Van den Berghe, G. Fructose: metabolism and short-term effects on carbohydrate and purine metabolisc pathways. *Prog. Biochem. Pharmacol.* 21: 1-32, (1986).

49. Carpinelli, A.R., Sener, A., Malaisse, W. J. Positive feedback effect of ATP on glucose phosphorylation in pancreatic islets. *Med. Sci. Res.* 15: 481-482, (1987).

50. Malaisse, W.J., Sener, A. Glucose-induced changes in cytosolic ATP content in pancreatic islets. *Biochim. Biophys. Acta.* 927: 190-195, (1987).

51. Sener, A., Malaisse-Lagae, F., Giroix, M-H., Malaisse, W.J. Hexose metabolism in pancreatic islet. Compartmentation of hexokinase in islet cells. *Arch. Biochem. Biophys.*

251: 61-67, (1986).

52. Malaisse-Lagae, F, and Malaisse, W.J. Hexose metabolism in pancreatic islets: Regulation of mitochondrial hexokinase binding. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 39: 80-89, (1988).

53. Müller, G., Korndörfer, A., Kornak, U., and Malaisse, W.J. Porin protein in mitochondria from rat pancreatic islets cells and white adipocytes: Identification and regulation of hexokinase binding by sulfonylurea glimepiride. *Arch. Biochem. Biophys.* 308 (1): 8-23, (1994).

54. Rasschaert, J., Malaisse, W.J. Hexose metabolism in pancreatic islets: preferential utilization of mitochondrial ATP for glucose phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1015: 353-360, (1990).

55. Malaisse, W.J., Sener, A. Stimulation by D-glucose of mitochondrial respiration. *Experientia* 44: 610-611, (1988).

56. Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F. Anomeric specificity of D-glucose metabolism in rat brain cells. *Brain Res.* 419: 147-155, (1987).

57. Froguel, P., Vaxillaire, M., Sun, F., Vehlo, G., Zouali, H., Butel, M.O., Lesage, S., Vuonnet, N., Clément, K., Fougères, F., Tanizawa, Y., Weissenbach, J., Beckmann, J.S., Lathrop, G.M., Passa, Ph., Permutt, M.A. and Cohen, D. Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin dependent diabetes mellitus. *Nature* 356: 162-64, (1992).

58. Becker, T.C., Noel, R.J., Johnson, J.H., Lynch, R.M., Hirose, H., Takuyama, Y., Bell, G.I., and Newgard, C.B. Differential effects of overexpressed Glucokinase and hexokinase I in isolated islets: evidence for functional segregation of the high and low Km enzymes. *J. Biol. Chem.* 271: 390-394, (1996).

59. Becker, T.C., BeltrandelRio, H., Noel, R. J., Johnson, J. H., Newgard, C.B. Overexpression of hexokinase I in isolated islets of Langerhans recombinant adenovirus. *J. Biol. Chem.* 269: 21234-38, (1994).

60. Epstein, P.N., Boschero, A. C., Atwater, I., Cai, Z. G., Overbeek, P. A. Expression of yeast hexokinase in pancreatic beta cells of transgenic mice reduces blood glucose, enhances insulin secretion and decreases diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 12038-42, (1992).
61. Voss-Mc., Cowan, M. E., Xu, B., Epstein, P.N. Insulin synthesis, secretory, competence, and glucose utilization are sensitized by transgenic yeast hexokinase. *J. Biol. Chem.* 269: 15814-18, (1994).
62. Hellman, B., Idahl, L.-A., Sehlin, J., Simon, E. and Taljedal, I.-B. The pancreatic β -cell recognition of insulin secretagogues 1. Transport of mannoheptulose and the dynamics of insulin release. *Mol. Pharmacol.* 8: 1-7, (1972)
63. Lenzen, S., Tiedge, M and Panten, U. Glucokinase in pancreatic β -cells and its inhibition by alloxan. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 5: 21-29, (1987).
64. Mahler, H.R., and Cordes E.H. Biological Chemistry. Ed by Harper & Row pp 505, (1971).
65. Pagliara, A. S., Hover, B. A., Ellerman, J. and Matschinsky, F. M. Iodoacetate and iodoacetamide-induced alterations of pancreatic α and β -cell responses. *Endocrinology* 97: 698-708, (1975).
66. Malaisse, W.J., Sener, A., Koser, M., Herchuelz, A. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Metabolism of α - and β -D-glucose in isolated islets. *J. Biol. Chem.* 251: 5936-5943, (1976).
67. Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., and Sener, A. Presence of fructose-6-phosphate,2-kinase in pancreatic islets. *FEBS lett.* 135: 203-206, (1981).
68. Sener, A., Malaisse-Lagae, F., Malaisse, W. J. Glucose-induced accumulation of glucose-1,6-biphosphate in pancreatic islets: its possible role in the regulation of glycolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104: 1033-1040, (1982).
69. Malaisse, W. J., Malaisse-Lagae, F., Sener, A. The glycolytic cascade in pancreatic

- islets. *Diabetologia* **23**: 1-5, (1982).
70. Malaisse, W. J., Malaisse-Lagae, F., Sener, A. P., Van Schaftingen, E. and Hers, H. G. Is the glucose-induced stimulation of glycolysis in pancreatic islets attributable to activation of phosphofructokinase by fructose-2,6-bisphosphate. *FEBS lett.* **125**: 217-219, (1981).
71. Malaisse, W. J., Malaisse-Lagae, F., Sener, A. Glucose-induced accumulation of fructose-2,6-bisphosphate in pancreatic islets. *Diabetes* **31**: 90-93, (1982).
72. Sener, A., Van schaftingen, E., Van de Winkel, M., Pipeleers, D.G., Malaisse-Lagae, F., Malaisse, W.J., and Hers, H-G. Effects of glucose and glucagon on the fructose 2,6-bisphosphate content of pancreatic islets and purified pancreatic β -cells. *Biochem. J.* **221**: 759-764, (1984).
73. Burch, P.T., Berner, D.K., Najafi, H., Meglasson, M.D., and Matschinsky, F.M. Regulatory role of fructose-2,6-bisphosphate in pancreatic islet glucose metabolism remains unsettled. *Diabetes* **33**: 1014-1018, (1985).
74. Krebs, H.A. The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation. *Essays Biochem.*, vol. **8**: 1-34, (1972).
75. Hellman, B., Idahl, L A., Sehlin J., and Taljedal, I-B. Influence of anoxia on glucose metabolism in pancreatic islets: Lack of correlation between fructose-1,6-Diphosphate and apparent glycolytic flux. *Diabetologia* **11**: 495-500, (1975).
76. Malaisse, W. J., Raschaert, J. Zahner, D. and Sener, A. Hexose metabolism in pancreatic islets: The Pasteur effect. *Diab. res.* **7**: 53-58, (1988).
77. Ashcroft, S.J.H., Chatra, L., Weerasinghe, C. and Randle, P. J. Interrelationship of islet metabolism, adenosine triphosphate contents and insulin release. *Biochem. J.* **132**. (cellular aspects) 223-231, (1973).
78. Jain, K., Logothetopoulos, J., and Zucker, P. The effects of D- and L-glyceraldehyde on glucose oxidation, insulin secretion and insulin biosynthesis by pancreatic islets of

the rat. *Biochem. Biophys. Acta.* 399: 384-394, (1975).

79. Malaisse, W. J., Herchuelz, A., Levy, J., Sener, A., Pipeleers, D. G., Devis, G., Somers, G., and Van Obberghen, E. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release XIX: the insulinotropic effect of glyceraldehyde. *Mol. Cell. Endocrinol.* 4: 1-12, (1976).

80. Levy, J., Herchuelz, A., Sener, A., and Malaisse W. J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release XX. Fasting: a model for altered glucose recognition by the B-cell. *Metabolism.* 25: 583-591, (1976).

81. Zawulich, W.S., Dye, E.S., Rognstad, R. and Matschinsky, F.M. On the biochemical nature of triose- and hexose-stimulated insulin secretion. *Endocrinology* 103: 2027-2034, (1978).

82. Alcazar, O., Giné, E., Qiu-yue, Z and Tamarit-Rodriguez, J. The stimulation of insulin secretion by D-glyceraldehyde correlates with its rate of oxidation in islet cells. *Biochem. J.* 310: 215-220, (1995).

83. Malaisse, W.J., Kawazu, S. Herchuelz, A., Hutton, J.C., Sommers, G., Devis, G., and Sener, A. The stimulus secretion coupling of glucose-induced insulin release: effect of lactate upon islet function. *Arch. Biochem. Biophys* 194: 49-62, (1979).

84. Sener, A., Kawazu, S., Hutton, J. C., Boschero, A. C., Devis, G., Somers, G., Herchuelz, A., Malaisse, W. J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Effect of exogenous pyruvate on islet function. *Biochem. J.* 176: 217-32, (1978).

85. Dukes, I. D., Mc Intyre, M. S., Mertz, R. J., Philipson, L. H., Roe, M. W., Spencer, B., Worley III, J. F. Dependence on NADH produced during glycolysis for β -cell glucose signaling. *J. Biol. Chem.* 269: 10979-10982, (1994).

86. Prentki, M and Matschinsky, F. M. Ca^{2+} cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanism of insulin secretion. *Physiol. Rev.* 67: 1185-1248, (1987).

87. Mc Donald, M. J.: Perspectives in diabetes: Elusive proximal signals of β -cells for insulin secretion. *Diabetes* **39**: 1461-1466, (1990).
88. Mc Donald, M. J. High content of mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in pancreatic islets and its inhibition by diazoxide *J. Biol. Chem.* **256**: 8287-90, (1981).
89. Mc Donald, M. J. Evidence for the malate-aspartate shuttle in pancreatic islets. *Arch. Biochem. Biophys.* **213**: 643-49, (1982).
90. Klingenberg, M. Localization of the glycerol-phosphate dehydrogenase in the outer phase of the mitochondrial inner membrane. *Eur. J. Biochem.* **13**: 247-252, (1970).
91. Nicholls, D.G. in *Bioenergetics*. An Introduction to the Chemiosmotic theory. Academic Press, London (1982).
92. Sener, A., Rasschaert, J., Zähler, D., and Malaisse, W.J. Hexose metabolism in pancreatic islets. Stimulation by D-glucose of [2-³H]glycerol detritiation. *Int. J. Biochem.* **20**: 595-598, (1988).
93. Rasschaert, J., Malaisse, W.J. Hexose metabolism in pancreatic islets. Glucose-induced and Ca²⁺-dependent activation of FAD-glycerolphosphate dehydrogenase. *Biochem J.* **278**: 335-340, (1991).
94. Prentki, M. and Matschinsky, F.M. Ca²⁺, cAMP and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiological rev.* **67** n°4: 1185-1248, (1987).
95. Pralong, W-F, Bartley, C., Wollheim, C.B. Single β -cell stimulation by nutrients: relationship between pyridine nucleotides, cytosolic Ca²⁺ and secretion. *EMBO J* **9**: 53-60, (1990).
96. Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., and Sener, A. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: effect of aminooxyacetate upon nutrient-stimulated insulin secretion. *Endocrinology* **111**: 392-397, (1982).

97. Sener, A., Malaisse, W. J. Measurements of lactic acid in nanomolar amounts: reliability of such a method as an index of glycolysis in pancreatic islets. *Biochem. Med.* 15: 34-41, (1976).
98. Pace, C. S., Ellermam, J., Hover, B. A., Stillings, S. N. and Matschinsky, M. Multiple metabolic functions of glucose in rat pancreatic islets. *Diabetes* 24: 476-488, (1975).
99. Zawulich, W. S. and Matschinsky, F. M.: Sequential analysis of the releasing and fuel function of glucose in isolated perfused pancreatic islets. *Endocrinology* 100: 1-8, (1977).
100. Malaisse, W.J., Carpinelli, A.R., and Sener, A. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: timing of early metabolic, ionic and secretory events. *Metabolism* 30: 527-532, (1981).
101. Malaisse, W.J., Hutton, J.C., Kawazu, S., Sener, A. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: metabolic effects of menadione in isolated islets. *Eur. J. Biochem* 87: 121-130, (1978).
102. Sener, A., Malaisse, W. J. Stimulation by D-glucose of mitochondrial oxidative events in islet cells. *Biochem. J.* 246: 89-95, (1987).
103. Malaisse, W.J. and Sener, A. Hexose metabolism in pancreatic islets. Feedback control of D-glucose oxidation by functional events. *Biochim. et Biophys. Acta* 971: 246-254, (1988).
104. Sener, A., Raschaert, J. and Malaisse, W. J. Participation of Ca²⁺-sensitive 2-ketoglutarate dehydrogenase in the regulation of mitochondrial function. *Biochem. Biophys. Acta.* 1019: 42-50, (1990).
105. Mc Cormack, J. G., Longo, E. A. and Corkey, B. Glucose-induced activation of pyruvate dehydrogenase in isolated rat pancreatic islets. *Biochem. J.* 267: 527-530, (1990).

106. Denton, R.M. Randle, P. J. and Martin B.R. Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. *Biochem. J.* **128**: 161-163, (1972).
107. Denton, R.M and Mc Cormack, J.G. Physiological role of Ca^{2+} transport by mitochondria. *Nature* **315**: 635, (1985).
108. Mac Donald, M.J. Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in pancreatic islets. Further implication of cytosolic NADPH in insulin secretion. *J. Biol. Chem.* **270**: 20051-20058, (1995).
109. Mac Donald, M.J. Metabolism of the Insulin Secretagogue Methyl Succinate by Pancreatic Islets. *Arch. Biochem. Biophys* **300**: 201-205, (1993).
110. Mac Donald, M.J. Estimates of glycolysis, pyruvate (De)carboxylation, pentose phosphate pathway and methyl succinate metabolism in incapacitated pancreatic islets. *Arch. Biochem. Biophys* **305**: 205-214, (1993).
111. Lacy, P. E. and Kostianovsky, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* **16**: 35-39, (1961).
112. Katz, J. Wood, H. G.: The use of $^{14}\text{CO}_2$ yields from glucose-1- and -6- C^{14} for the evaluation of the pathways of glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* **238**: 517-523, (1963).
113. Simonides, W. S., Zaremba, R., van Hardeveld, C. and Van der Laarse, W. A non enzymatic method for the determination of picomole amounts of lactate using HPLC: Its application to signal muscle fibers. *J. Anal. Biochem.* **169**: 268-273, (1988).
114. Vytasek, R.: A sensitive assay for the determination of DNA. *Anal. Biochem.* **120**: 243-248, (1982).
115. Yalow, R.S. and Bergson, S.A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* **39**:1157, (1960).
116. Hunter, W. H and Greenwood, F.C. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* **194**: 495, (1962).

117. Herbert, V., Lau, K. S., Gottlieb, C. W. and Bleicher, S. J. Coated charcoal immunoassay of insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **25**: 1375-1384, (1965).
118. Levy, H.R. Glucose-6-phosphate dehydrogenases. *Adv. Enzymol* **48**: 97-192, (1979).
119. Mac Donald, M. J. Does glyceraldehyde enter pancreatic islet metabolism via both the triokinase and the glyceraldehyde phosphate dehydrogenase reactions?. *Arch. Biochem. Biophys.* **270**: 15-22, (1989).
120. Leclercq-Meyer, V., García-Martínez, J.A., Villanueva-Peñacarrillo, M.L., Valverde, I. and Malaisse, W.J. In vitro and in vivo insulinotropic action of methyl pyruvate. *Horm. Metab. Res.* **27**: 477-481, (1995).
121. Tamarit-Rodríguez, J. Idahl, L. A., Giné, E., Alcazar, O. and Sehlin, J. Islet glucose metabolism to lactate saturates at non-stimulatory sugar concentrations for insulin secretion (in press).
122. Zawulich, W. S., Pagliara, A. S. and Matschinsky, F. M.: Effects of iodoacetamide, mannoheptulose, and 3-O-methyl-glucose on the secretory function and metabolism of isolated pancreatic islets. *Endocrinology* **100**: 1276-1283, (1977).
123. Malaisse, W. J., Lea, M. A. and Malaisse-Lagae, F. The effect of mannoheptulose on the phosphorylation of glucose and the secretion of insulin by islets of langerhans. *Metab. Clin. Exp.* **17**: 126-132, (1968).
124. N. Sekine, V. Cirulli, R. Regazzi, L. J. Brown, E. Giné, J. Tamarit-Rodríguez, M. Girotti, S. Marie, M. J. Mac Donald, C. B. Wollheim, S. G. Rutter. Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol-phosphate dehydrogenase in pancreatic β -cells: Potential role in nutrient sensing. *J. Biol. Chem.* **269**: 4895-4902, (1994).
125. Berne, C. The metabolism of lipids in mouse pancreatic islets: the oxidation of fatty acids and Ketone bodies. *Biochem. J.* **152**: 661-666, (1975).
126. Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, R., Sehlin, J. and Taljedal, I.B. The pancreatic

β - cell recognition of insulin secretagogues: comparisons of glucose with glyceraldehyde isomers and dihydroxyacetone. *Arch. Biochem. Biophys.* **162**: 448-457, (1974).

127. Sener, A., Pipeleers, D. G., Levy, J. and Malaisse, W. J. the stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Are the secretory and fuel functions of glucose dissociable by iodoacetate. *Metab. Clin. Exp.* **27**: 1505-1517, (1978).

128. Trus, M., Warner, H. and Matschinsky, F. M. Effects of glucose on insulin release and on intermediary metabolism of isolated perfused pancreatic islets from fed and fasted rat *Diabetes* **29**: 1-14, (1980).

129. Hue, L. and Rider, M. H. Role of fructose-2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem J.* **245**: 313-324, (1987).

130. Malaisse, W. J., Sener, A., Carpinelli, A. R., Anjaneyulu, K., Lebrun, P., Herchuelz, A. and Christophe, J. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release physiological role of L-glutamine as a fuel for pancreatic islets. *Mol. Cell. Endocrinol.* **20**: 171-189, (1980).

131. Panten, U., Zielmann, S., Langer, J., Zunkler, B.-J. and Lenzen, S. Regulation of insulin secretion by energy metabolism in pancreatic β -cell mitochondria. *Biochem. J.* **219**: 189-196, (1984).

132. Malaisse, W. J. and Bodur, H. Hexose metabolism in pancreatic islets: enzyme-to-enzyme tunnelling of hexose 6-phosphates. *Int. J. Biochem.* **23**: 1471-1481, (1991).