

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE C.C. BIOLÓGICAS

Dpto. DE BIOLOGIA ANIMAL II (FISIOLOGIA ANIMAL)



**ACCION DE LAS SULFONILUREAS SOBRE
LA CAPTACION DE GLUCOSA POR
EL MUSCULO ESQUELETICO**

TESIS DOCTORAL

M^a NIEVES PULIDO MUÑOZ

1995



Fundación Jiménez Díaz

CLINICA DE NUESTRA SEÑORA DE LA CONCEPCION

Avda. de los Reyes Católicos, 2 (Ciudad Universitaria)
28040 - MADRID

Doña Adela Rovira Loscos, Doctora en Medicina por la Universidad Autónoma de Madrid.

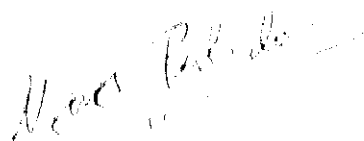
CERTIFICA

Que D^a Nieves Pulido Muñoz, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección los estudios necesarios para la realización de la presente Tesis Doctoral.

Y para que conste, firmo la presente en Madrid, a 11 de Septiembre de 1995.



Fdo. Director: Dra. Adela Rovira Loscos



Fdo. Doctorando: Nieves Pulido Muñoz

Este trabajo de Investigación se ha realizado en el Laboratorio de Endocrinología de la Fundación Jiménez Díaz y ha sido financiado por el Fondo de Investigaciones de la Seguridad Social y por los Laboratorios Servier.

Parte de este trabajo ha sido objeto de la siguiente publicación (actualmente en prensa):

- Pulido N., Casla A., Suárez A., Casanova B., Arrieta F.J, Rovira A.
"Sulfonylurea stimulates glucose uptake by rat through an ATP-sensitive K⁺ channel dependent mechanism". Diabetologia (Enero, 1996).

Así mismo, ha dado lugar a tres comunicaciones a Congresos Internacionales y a cuatro en Congresos Nacionales.

La experiencia más hermosa es la de lo misterioso. Esta es la verdadera fuente de todo arte y toda ciencia.

Einstein.

A: Julio, Teodora y Josemi

Hermanos y abuelos

Familia y amigos

Calzada y su gente

AGRADECIMIENTOS

Alguien dijo que a veces *sobran las palabras*, pero en este caso a mí me faltan. Estoy segura de que no tengo palabras para expresar mi gratitud a todas aquellas personas que me apoyaron y que hicieron posible la realización de esta tesis.

Quiero mostrar mi agradecimiento:

A la Fundación Jiménez Díaz, por permitirme el uso de sus instalaciones. A la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz, por concederme una beca de investigación para la realización de esta tesis. Al Fondo de Investigaciones de la Seguridad Social, por su aportación económica al laboratorio.

A Adela, directora de esta tesis, por abrirme las puertas del mundo fascinante de la Investigación, por sus enseñanzas, su confianza y su cariño durante todos estos años.

A la Dra. M^a Paz Nava, por facilitarme la presentación de esta tesis.

Al Dr. Herrera Pombo, por su colaboración y apoyo.

A Laboratorios Servier, por suministrarme el elemento esencial de estudio de esta tesis, por su ayuda y sus consejos, en especial a Dennis Ravel, Carmen Gorostiaga, Roberto y Mariano.

A mis compañeros de laboratorio, con quien compartí durante estos años aventuras y desventuras:

A Azucena, por su paciencia y sus valiosas enseñanzas en los primeros momentos, así como por su cariño y amistad.

A Francisco, siempre optimista, inundando el laboratorio de buen humor y haciendo que el desánimo se convirtiera en sonrisa. Gracias por esos buenos ratos, por tus sabios consejos y por tu amistad.

A Benito, por toda su ayuda, por sus sabias palabras en los momentos *claves*, por su maravillosa amistad y porque no hubiese podido soportar estar en el laboratorio sin nuestras *eternas discusiones*.

A Ana, mi cincuenta por ciento, porque me abrió los brazos desde que entré en el laboratorio y se convirtió en mi *inseparable*, en lo bueno y en lo malo. Gracias por estar siempre conmigo.

A Reme, por su cariño, sus consejos y porque sin su ayuda nunca hubiese podido ver la "capa sobre la sacarosa".

A Adeli, por su amistad y por devolverme el sosiego en los momentos difíciles con una mágica palabra *tranquila*.

A Angelines y Esther, por su cariño y por su ayuda.

A "tía Roci", porque me mimó y me cuidó como a una *auténtica sobrina*.

Al resto de mis compañeros de laboratorio: Beatriz, Pilar, Mari Cruz, Marina y Sira.

A los chicos de la Policlínica de Endocrinología (J. Ignacio, Inma, Alberto, M^a José, Cristina, Olga)

A la Dra. Isabel Valverde y a la Dra. Villanueva-Peñacarrillo por abrirme las puertas de su laboratorio.

Al Laboratorio de Nefrología por la paciencia con la que me han aguantado: Itziar, M^a José, Javi, Carmen G, Carmen B, Silvia, Silvia M, Marta, Eva, Antonio, Amparo, Inma, Mercedes, Raquel, Mónica, Miguel Angel ...

Al Laboratorio de Hormonas: Asun, Elena D, Carlos, Javier, David, Cristina, Marian, Almudena, Ana, Mónica, Elena M, Felipe, Luis, Juan, Miguel Angel, Nieves...

A Marisa y Marivi (Laboratorio de Fisiopatología Respiratoria) por escucharme siempre y por brindarme su amistad.

A las risueñas chicas del animalario Pili, Juani y M^a Luisa.

Al Servicio de Fotografía y Biblioteca (Valentin).

A mis amigos de la Fundación Jóvenes Degustadores, por todos los buenos ratos que hemos *saboreado* juntos.

Finalmente quiero agradecer a mi familia y a mis amigos, por todas las cosas buenas.

A mis padres, a mis hermanos y a Josemi, por su apoyo incondicional, por su entusiasmo y confianza en todos los proyectos (científicos y no científicos) que he emprendido en la vida.

A Calzada, mi pueblo, por darme la paz y la tranquilidad desde su infinito silencio.

ABREVIATURAS

ATP	Adenosin-5'-trifosfato
AMP	Adenosin-5'-monofosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CTP	Citosin-5'-trifosfato
DMNID	Diabetes mellitus no dependiente de insulina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
EEM	Error estándar de la media
EGTA	Acido tetracético N',N(bis-aminoetil eter) etilénglicol
HEPES	Acido N-2-hidroxiethylpiperacina-N'-2-etanosulfónico
PEG	Poliethylenglicol
Pm	Peso molecular
PMSF	Fenilmetil sulfonil fluoruro
SDS	Dodecil sulfato sódico
STZ	Estreptozotocina
TCA	Acido tricloroacético
TEMED	(N,N,N',N') tetrametyletilendiamina
TRIS	Tris (hidroximetil) amino metano
UDP	Uridin-5'difosfato
WGA	Aglutinina de germen de trigo

INDICE

INTRODUCCION	1
1. INSULINA	1
2. SECRECION DE INSULINA	2
3. RECEPTOR DE INSULINA	3
3.1 ESTRUCTURA DEL RECEPTOR	3
3.2 GEN DEL RECEPTOR	5
4. MECANISMO MOLECULAR DE ACCION DE LA INSULINA	5
4.1 PRIMER NIVEL DE ACCION DE LA INSULINA	5
4.2 SEGUNDO NIVEL DE ACCION DE LA INSULINA	6
4.3 TERCER NIVEL DE ACCION DE LA INSULINA	6
5. TRANSPORTE DE GLUCOSA	7
5.1 ESTRUCTURA DEL TRANSPORTADOR	8
5.2 TRANSLOCACION DEL TRANSPORTADOR GLUT4	9
6. CONCEPTO Y CLASIFICACION DE DIABETES MELLITUS	11
7. ANTI-DIABETICOS ORALES	11
8. SULFONILUREAS	12
8.1 ESTRUCTURA QUIMICA	12
8.2 FARMACOCINETICA	13
9. MECANISMO DE ACCION DE LAS SULFONILUREAS	16
9.1 ACCIONES PANCREATICAS	16
9.2 ACCIONES EXTRAPANCREATICAS	18
9.3 RECEPTOR DE SULFONILUREAS	19
10. GLICLACIDA	20

II. BIGUANIDAS	22
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y METODOS	27
I. MATERIALES	27
1.1 REACTIVOS	27
1.1.1 DETERMINACION DE GLUCOSA	27
1.1.2 DETERMINACION DE INSULINA	27
1.1.3 DETERMINACION DE PEPTIDO C	27
1.1.4 CAPTACION DE GLUCOSA EN MUSCULO PERFUNDIDO	27
1.1.5 TRANSLOCACION DE GLUCOTRANSPORTADORES	28
1.1.6 CARACTERIZACION ENZIMATICA	28
1.1.7 ELECTROFORESIS	29
1.1.8 TRANSFERENCIA	29
1.1.9 AUTORRADIOGRAFIA	29
1.1.10 PURIFICACION DE LOS RECEPTORES DE INSULINA	29
1.1.11 UNION DE LA ¹²⁵ I-INSULINA A LOS RECEPTORES	29
1.1.12 DETERMINACION DE PROTEINAS	30
1.1.13 AUTOFOSFORILACION DEL RECEPTOR DE INSULINA	30
1.1.14 FOSFORILACION DEL RECEPTOR DE INSULINA SOBRE UN SUSTRATO EXOGENO	30
1.2 TAMPONES	
1.2.1 Tampón de análisis para determinación de insulina	31
1.2.2 Tampón de análisis para determinación de péptido C	31
1.2.3 Tampón KREBS-HENSELEIT	31
1.2.4 Tampón de solubilización para la preparación de fracciones subcelulares de glucotransportadores	31

1.2.5	Tampón de suspensión de las fracciones subcelulares de glucotransportadores	32
1.2.6	Tampón de análisis de la actividad enzimática UDP-galactosiltransferasa	32
1.2.7	Mezcla de reacción de la actividad enzimática Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	32
1.2.8	Reactivo de color (Tausky-Shorr)	32
1.2.9	Tampón Tris-Glicina electroforesis	32
1.2.10	"Cocktail laemly"	33
1.2.11	Tampón tris salino (TBS)	33
1.2.12	Tampón de solubilización para aislamiento del receptor de insulina	33
1.2.13	Tampón WGA	33
1.2.14	Tampón fosfatos	34
1.2.15	"Cocktail" autofosforilación	34
1.2.16	Tampón para detener la reacción en la autofosforilación	34
1.2.17	Tampón de análisis para fosforilación exógena	34
1.2.18	"Cocktail" fosforilación exógena	34
1.3	ANIMALES DE EXPERIMENTACION	35
1.3.1	MODELO DE RATA NORMAL	35
1.3.2	MODELO DE RATAS DIABETICAS	36
1.3.2.1	Ratas macho Wistar de 150-175 g de peso, mantenidas con ciclo de luz/oscuridad de 12 h	36
1.3.2.2	Ratas macho Wistar de 150-175 g de peso, mantenidas con ciclo invertido de 12 h (oscuridad/luz)	38
2.	MÉTODOS	42
2.1	DETERMINACION DE GLUCOSA	42

2.2 DETERMINACION DE INSULINA	42
2.3 DETERMINACION DE PEPTIDO C	43
2.4 PERFUSION DE EXTREMIDADES INFERIORES	43
2.4.1 APARATO DE PERFUSION	43
2.4.2 PREPARACION Y PERFUSION DE EXTREMIDADES INFERIORES	46
2.4.3 CALCULO DE LA CAPTACION DE GLUCOSA POR LAS EXTREMIDADES INFERIORES	47
2.5 ANALISIS DEL GLUCOTRANSPORTADOR GLUT 4	49
2.5.1 CONTENIDO TOTAL DE GLUT4	49
2.5.2 TRANSLOCACION DE LA PROTEINA TRANSPORTADORA GLUT4	49
2.5.2.1 Caracterización enzimática de las fracciones	51
2.5.2.2 Western-blot	52
2.6 PURIFICACION PARCIAL DE LOS RECEPTORES DE INSULINA	52
2.6.1 ACOPLAMIENTO DE LA LECTINA A AGAROSA ACTIVADA CON CNBr (WGA-SEFAROSA)	52
2.6.2 RECEPTORES DE MUSCULO ESQUELETICO PARCIALMENTE PURIFICADOS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD	53
2.6.2.1 Unión de la ¹²⁵ I-insulina a los receptores	54
2.6.2.2 Autofosforilación del receptor de insulina	54
2.6.2.3 Fosforilación de un sustrato exógeno por el receptor de insulina.	55
2.7 ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS	56
RESULTADOS	57
I. EFECTO AGUDO DE LA GLICLACIDA SOBRE LA CAPTACION DE GLUCOSA EN EL MUSCULO ESQUELETICO DE RATAS NORMALES	57

1.1 Efecto de la glielacida sobre la captación de glucosa por el músculo esquelético	58
1.2 Captación de glucosa en presencia de insulina	61
1.3 Efecto de la glielacida combinada con la insulina sobre la captación de glucosa por el músculo esquelético	63
1.4 Efecto del diazóxido sobre la captación de glucosa estimulada por glielacida en el músculo esquelético	66
1.5 Efecto del diazóxido sobre la captación de glucosa estimulada por insulina en el músculo esquelético	70
1.6 Translocación de la proteína transportadora GLUT4	72
2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GLIELACIDA EN RATAS DIABÉTICAS POST-ESTREPTOZOTOCINA	80
2.1 Ratas macho Wistar diabéticas post-streptozotocina mantenidas con ciclo de luz oscuridad de 12 horas	80
2.1.1 Niveles séricos de glucosa	81
2.1.2 Niveles séricos de insulina	83
2.1.3 Captación de glucosa por las extremidades inferiores	84
2.1.4 Unión de la insulina a sus receptores de tejido muscular	89
2.1.5 Actividad tirosina quinasa	92
2.1.6 Análisis del contenido total del glucotransportador GLUT4	96
2.2 Ratas macho Wistar diabéticas post-estreptozotocina mantenidas con ciclo invertido (oscuridad/luz) de 12 horas	98
2.2.1 Niveles séricos de glucosa	99
2.2.2 Niveles séricos de péptido C	101
2.2.3 Captación de glucosa por las extremidades inferiores	102
DISCUSION	107

1. EFECTO AGUDO DE LA GLICLACIDA SOBRE LA CAPTACION DE GLUCOSA EN EL MUSCULO ESQUELETICO DE RATAS NORMALES	107
2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GLICLACIDA EN RATAS DIABETICAS POST-ESTREPTOZOTOCINA	112
CONCLUSIONES	122
BIBLIOGRAFIA	124

INTRODUCCION

INTRODUCCION

1. INSULINA

Al final del siglo XIX se pensaba en la posibilidad de que existiera relación entre alguna secreción de los islotes pancreáticos y la diabetes mellitus. Apoyaban esta teoría los experimentos de trasplantes, ya que en 1889 Mering y Minkoski (1), observaron que los perros pancreatomizados presentaban un cuadro clínico parecido a la diabetes, y en 1892 se demostró que era posible reducir o eliminar un estado diabético ocasionado por la extirpación del páncreas, transplantando un fragmento del mismo a una zona subcutánea, en la cual se dejaba después de haber establecido conexiones vasculares. No se sabía la importancia del páncreas y de la insulina en el metabolismo hidrocarbonado.

En los primeros años de este siglo, muchos investigadores se esforzaron en conseguir algún extracto del páncreas que aliviara los síntomas de la diabetes mellitus. Estaban tan convencidos de que los islotes segregaban alguna hormona, que en 1909 se le dio el nombre de insulina (insula, isla), mucho antes de su verdadero descubrimiento.

En 1920 Banting y Best (2) prepararon el extracto pancreático tan largo tiempo esperado, con lo cual se demostraba la existencia de una hormona de los islotes, para la que se adoptó inmediatamente el nombre de insulina. Finalmente, el 11 de enero de 1922 se administraron con éxito extractos pancreáticos a pacientes diabéticos en el Hospital General de Toronto.

La insulina es una importante hormona reguladora del metabolismo de carbohidratos, lípidos, aminoácidos e iones en numerosas células diana. Debido a su importancia fisiológica ha sido una de las proteínas más estudiadas. Así, fue la primera en ser secuenciada (3) y la primera en ser sintetizada químicamente (4). Ha sido la primera proteína recombinante para su uso clínico (5).

2. SECRECIÓN DE INSULINA

La glucosa es el regulador fisiológico más importante de la función de la célula beta pancreática (6). Aunque los mecanismos por los que la glucosa estimula la secreción de insulina son complejos y no del todo conocidos, hay un consenso general de que la regulación de ciertos sucesos iónicos por cambios en el metabolismo de la célula β son esenciales para estimular la secreción de insulina.

La aceleración del metabolismo de la célula β que sigue a un incremento de la concentración de glucosa provoca el cierre de los canales de K^+ ATP dependientes (7,8) probablemente mediados por un aumento en la concentración de ATP en los compartimentos submembrana (9,10). El cierre de estos canales provoca despolarización de la membrana plasmática de la célula β (11), disminuyendo la permeabilidad de la membrana al K^+ (12) y aumentando el flujo de calcio a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (13), incrementándose la concentración de calcio intracelular y desencadenándose la secreción de insulina (14).

Aunque en los años setenta hubo trabajos que sugerían que el aumento de calcio intracelular era debido a una movilización de calcio desde los compartimentos intracelulares (15), hoy está aceptado que este aumento de calcio se produce por un aumento del flujo de calcio desde el medio extracelular (16,17) al citosol; se ha observado que en ausencia de calcio extracelular la secreción de insulina estimulada por glucosa es inhibida (18). Se ha demostrado que el flujo de calcio se produce a través de canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L (19), ya que en presencia de verapamilo (bloquea los canales L de calcio) la secreción de insulina es inhibida al no aumentar la concentración de calcio intracelular.

En 1992 Henquin y colaboradores sugirieron que otros canales iónicos (además de los canales de K^+ ATP dependientes) contribuían a la regulación de la actividad eléctrica de la célula beta por glucosa (20).

Otros autores han referido que la glucosa estimula la secreción de insulina de dos maneras (21), una sería a través de los canales de K^+ ATP dependientes, responsable de la primera fase de secreción de insulina, mientras que habría otro camino independiente de los canales de K^+ ATP dependientes, aunque también necesitaría un aumento del calcio

intracelular para provocar el acoplamiento de otro efector o efectores que desencadenarían el proceso de exocitosis de gránulos de insulina, responsable de la segunda fase de secreción de insulina.

Por otro lado los estudios de Dukes y colaboradores (22) sugieren que la producción de NADH procedente de la glucólisis es un paso crítico para que la glucosa estimule la secreción de insulina, ya que este NADH se utilizará en la mitocondria para producir ATP, necesario para bloquear los canales de K^+ ATP dependientes.

En el futuro más investigaciones nos ayudarán a conocer el mecanismo o mecanismos a partir del cual/es la glucosa y otros secretagogos promueven la secreción de insulina.

3. RECEPTOR DE INSULINA

3.1. ESTRUCTURA DEL RECEPTOR

El primer paso en la acción de la insulina a nivel celular es la unión de la hormona a su receptor de membrana (23,24).

El receptor de insulina es una glicoproteína heterotetramérica integrada en la membrana plasmática de la célula y está constituida por dos subunidades α (con un Pm de 135 Kda) y dos subunidades β (con un Pm de 95 Kda) unidas entre sí por enlaces covalentes de tipo disulfuro (25), dando lugar a una estructura $\alpha_2\beta_2$ (26-28).

Cada subunidad del receptor está especializada en una función determinada. Así la subunidad α es la encargada de unir insulina con alta afinidad, y la subunidad β se encarga de la transducción de la señal.

La subunidad α es una proteína extracelular (Figura 1) constituida por un dominio amino-terminal encargado del reconocimiento de la insulina, un dominio rico en cisteínas, un dominio implicado en las uniones disulfuro entre ambas subunidades α , y un último dominio implicado en las uniones disulfuro entre las subunidades α - β .

La subunidad β es una proteína transmembrana que contiene un dominio extracelular

de 193 aa, un dominio transmembrana de 23 aa, y un dominio intracelular de 402 aa. El dominio extracelular glicosilado contiene residuos de cisteína implicados en la unión entre las cadenas α y β . El dominio transmembrana es un segmento α -helicoidal que une el dominio extracelular e intracelular de la subunidad β y tiene un papel crítico en la transducción de la señal. La región intracelular de la subunidad β se divide fundamentalmente en los cuatro dominios siguientes: el dominio yuxtamembrana que contiene secuencias necesarias para la interacción con sustratos intracelulares y para la fosforilación de los mismos, así como para el internamiento del receptor de insulina (29-31); un dominio catalítico con la región de unión del ATP; un dominio rico en tirosinas que se autofosforilan y están implicadas en la regulación de la actividad quinasa (32); y un dominio carboxilo terminal que contiene dos tirosinas adicionales de autofosforilación, así como algunas serinas y treoninas que se fosforilan (33).

Otra de las funciones de la subunidad α es suprimir la actividad quinasa presente en la subunidad β . De este modo, si la subunidad α es destruída o modificada por proteólisis (34) o por mutagénesis *in vitro* (35,36), la actividad tirosina quinasa de la subunidad β es activada.

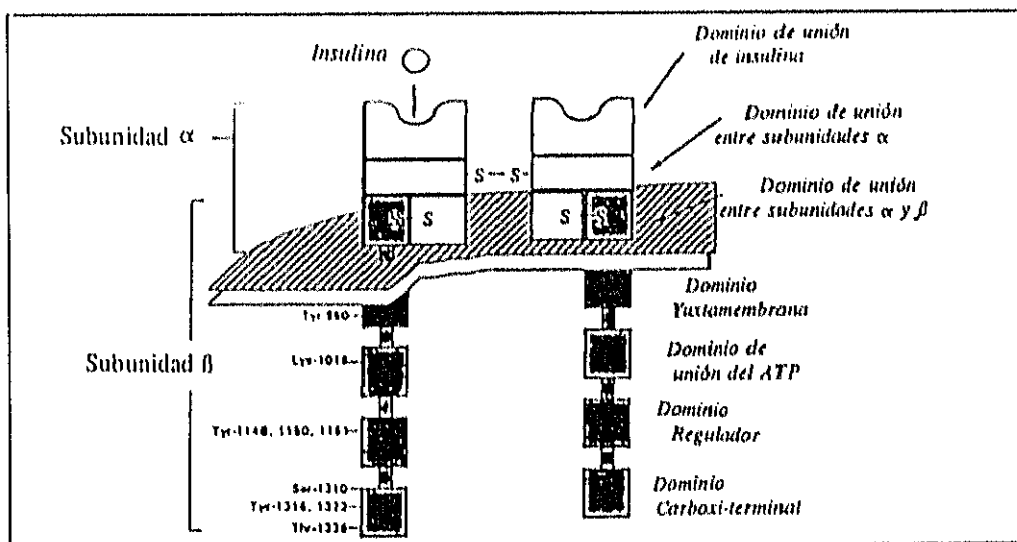


Figura 1. Esquema de la estructura del receptor de insulina en la membrana plasmática. La numeración empleada en la figura corresponde a la secuencia sin el exón 11 (HIR-A).

3.2. GEN DEL RECEPTOR

El gen del receptor de insulina se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 19 (37). Este gen está formado por unas 150 Kb y consta de 22 exones separados por 21 intrones (38,39). Los 11 primeros exones ocupan unas 90 Kb y codifican la subunidad α , y los exones 12 al 22 ocupan unas 30 Kb y codifican la subunidad β . El gen del receptor de insulina, mediante procesamiento alternativo del exón 11, da origen a dos isoformas que difieren en la longitud de la subunidad α . El receptor que contiene el exón 11 (HIR-B ó EX11+) tiene 12 aa más en el extremo carboxilo terminal de la subunidad α , tras la arginina de la posición 723, comparada con la otra isoforma (HIR-A ó EX11-). Estas isoformas se expresan en distinta proporción, en los diferentes tejidos (40) y especies (41) y muestran algunas propiedades bioquímicas y funciones fisiológicas similares y distintas entre sí (42-44).

4. MECANISMO MOLECULAR DE ACCION DE LA INSULINA

Se puede pensar que a nivel celular la acción de la insulina transcurre a tres niveles.

4.1. PRIMER NIVEL DE ACCION DE LA INSULINA

Este primer nivel lo compondrían todos los procesos relacionados con la actividad tirosina quinasa del receptor, los sustratos del receptor de insulina y las moléculas que interaccionan con estos sustratos.

Aunque los cambios moleculares exactos que conducen a la activación del receptor de insulina después de la unión de la insulina son inciertos, muchos datos sugieren que el receptor de insulina se comporta como una clásica enzima alostérica pasando por cambios conformacionales y modificaciones por fosforilación.

Cuando la insulina se une a la subunidad α del receptor, se produce un cambio conformacional y se estimula la actividad tirosina quinasa del receptor de insulina (45,46). Esto permite la transferencia de grupos fosfatos desde el ATP a múltiples residuos tirosina

del propio receptor, así como la fosforilación de proteínas sustrato intracelulares (47,48). Los datos indican que el receptor tiene, al menos, seis residuos tirosina susceptibles de ser fosforilados: un residuo tirosina en posición 960, un grupo de residuos tirosina que ocupan las posiciones 1146, 1150 y 1152, y las tirosinas en las posiciones 1316 y 1322 del dominio COOH-terminal (49,50). El receptor de insulina tiene además residuos tirosina y treonina que cuando se fosforilan, pueden disminuir o inhibir la actividad quinasa del receptor (51).

Uno de los principales sustratos endógenos de la actividad tirosina quinasa del receptor es el IRS-1 o también llamado pp185 (52,53). El IRS-1 es una proteína citoplásmica de 131 Kda que es fosforilado sobre múltiples residuos tirosina (54); se expresa en muchos tejidos y está muy conservado en las diferentes especies.

4.2. SEGUNDO NIVEL DE ACCION DE LA INSULINA

Este nivel comprendería una cascada de reacciones de fosforilación y defosforilación en residuos serina centradas en una enzima llamada MAP quinasa (proteína mitógeno-activadora).

Esta familia de enzimas MAP quinasa (55,56) parece ser la pieza central de la acción de la insulina en este segundo nivel por sus efectos sobre otras enzimas y proteínas, se cree que conduce a la activación de enzimas como S6 quinasa, las cuales, activan a fosfatasas que defosforilan y activan enzimas como la glucógeno sintetasa (57). Esta cascada además lleva a la regulación de quinasas que permiten la fosforilación de proteínas nucleares (58,59), permitiendo cambios en la expresión de otras enzimas dependientes de insulina a nivel transcripcional (60).

4.3. TERCER NIVEL DE ACCION DE LA INSULINA

En el tercer nivel incluiríamos a los efectores biológicos finales de la cascada de insulina; aquí se incluirían las moléculas transportadoras de glucosa, las enzimas implicadas en la síntesis de glucógeno y de lípidos, y las proteínas implicadas en la acción de la insulina a nivel de expresión genética y crecimiento celular.

5. TRANSPORTE DE GLUCOSA

El transporte de la glucosa a través de la membrana celular reviste más complejidad de lo que podría sospecharse. Debido a la configuración de la membrana plasmática (doble capa lipídica que repele el agua y las moléculas que, como la glucosa se disuelven en ella), las células no pueden absorber glucosa por difusión simple. La glucosa es transportada al interior de las células por difusión facilitada gracias a una proteína específica (de aproximadamente 55 Kda) que se halla anclada en la membrana plasmática.

Los transportadores de glucosa forman una familia con un estrecho parecido en su estructura y función, aunque sean producto de distintos genes y se expresen en diferentes tejidos (61). Hasta ahora se han identificado siete glucotransportadores, cinco de ellos han sido ampliamente estudiados, conociéndose su distribución tisular y su secuencia de aminoácidos (Tabla I); cada uno consta de una cadena polipeptídica de unos 500 aminoácidos.

TABLA I. Transportadores de glucosa humanos.

ISOFORMA	AMINOACIDOS	LOCALIZACION CROMOSOMICA	EXPRESION EN TEJIDOS Y CELULAS
GLUT1	492	1p35 — p31,3	Placenta, cerebro, adiposo, músculo, fibroblastos
GLUT2	524	3q26,1 — q26,3	Hígado, células β , riñón e intestino (membrana basolateral)
GLUT3	496	12p13,3	Cerebro, hígado, corazón, nervios y células nerviosas
GLUT4	509	17p13	Músculo esquelético, adiposo y corazón
GLUT5	501	1p32 — p22	Intestino (membrana apical)

5.1 ESTRUCTURA DEL TRANSPORTADOR

El primer transportador de glucosa (GLUT1) fue aislado en 1977 (62), a partir de eritrocitos humanos. Esta proteína consiste en una cadena de 492 aminoácidos (63), organizada en 25 segmentos (Figura 2). Trece de ellos extensamente hidrofílicos, muestran inclinación por los medios acuosos del interior y del exterior celular; estos segmentos se alternan con otros doce fundamentalmente hidrofóbicos, que prefieren el medio lipídico de la membrana. Existen dos grandes bucles entre las hélices 1 y 2, y entre las hélices 6 y 7. Este último bucle divide la estructura en el dominio N-terminal y el dominio C-terminal.

En los segmento transmembrana 3, 5, 7, 8 y 11, los grupos serán hidrofílicos a un lado e hidrofóbicos en el otro. Estos cinco segmentos podrían formar un poro cuya superficie interna podría enlazarse con la glucosa.

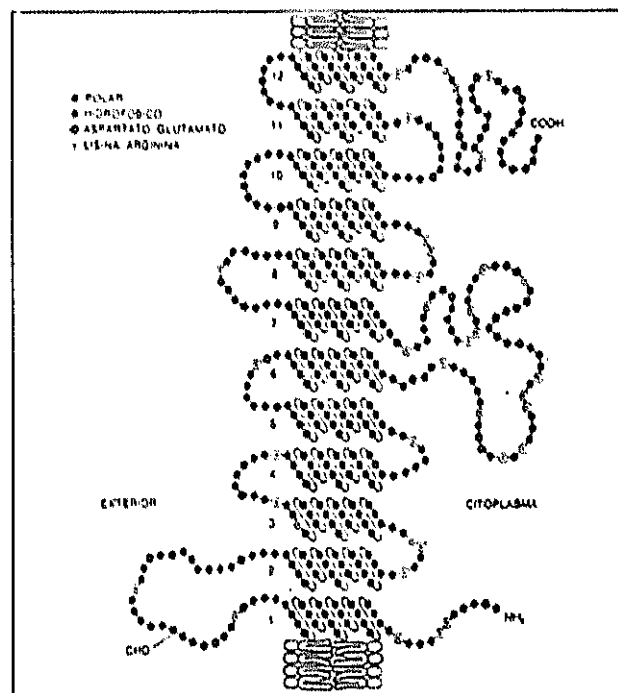


Figura 2. Estructura propuesta para los 492 aminoácidos del transportador. Una cadena plegada atraviesa la membrana lipídica en doce segmentos. Los aminoácidos que tienen grupos cargados aparecen con los signos (+) o (-).

5.2 TRANSLOCACION DEL TRANSPORTADOR GLUT4

La isoforma GLUT4 sólo se expresa en células que se caracterizan por tener transporte de glucosa estimulado por insulina. La insulina promueve el transporte de glucosa en estas células por desencadenar el movimiento del GLUT4 desde un compartimento intracelular a la superficie celular (64,65). Luego, cuando disminuyen los niveles de glucosa en sangre y con ello la secreción de insulina, se invierte el proceso y el GLUT4 se sitúa nuevamente en el interior.

El transportador GLUT4 se localiza fundamentalmente en microdominios tubulares en los endosomas próximos al aparato de Golgi o en vesículas separadas en el citoplasma, frecuentemente cerca de la superficie celular. Aunque también se ha demostrado la existencia de vesículas intracelulares para GLUT1 en diferentes células sensibles a insulina, la proporción total de GLUT1 que está en la superficie celular en ausencia de insulina es mucho mayor que para la isoforma GLUT4. De hecho la insulina incrementa los niveles de GLUT4 en la superficie celular aproximadamente 30 veces en células musculares y adiposas, mientras que GLUT1 los aumenta sólo de 3 a 5 veces en células adiposas. Existen evidencias de que ambas isoformas se localizan en diferentes vesículas en células adiposas (66) y musculares (67).

Parece ser que cuando la insulina se une a la célula, desencadena una serie de procesos moleculares que acaban por redistribuir los transportadores de glucosa en la membrana celular.

Existen dos teorías para explicar la translocación del transportador GLUT4 promovida por insulina: el modelo de exocitosis regulada y el modelo de reciclaje regulado (Figura 3).

Actualmente hay un modelo consenso (que agrupa los dos modelos anteriores) según el cual la retención del GLUT4 (en ausencia de insulina) dentro de microdominios tubulares del endosoma y del retículo de Golgi, o de vesículas separadas, estaría mediado por un suceso específico, incluyendo una interacción directa entre el GLUT4 y una proteína seleccionada, que produciría la retirada del transportador de la vía de reciclaje (68).

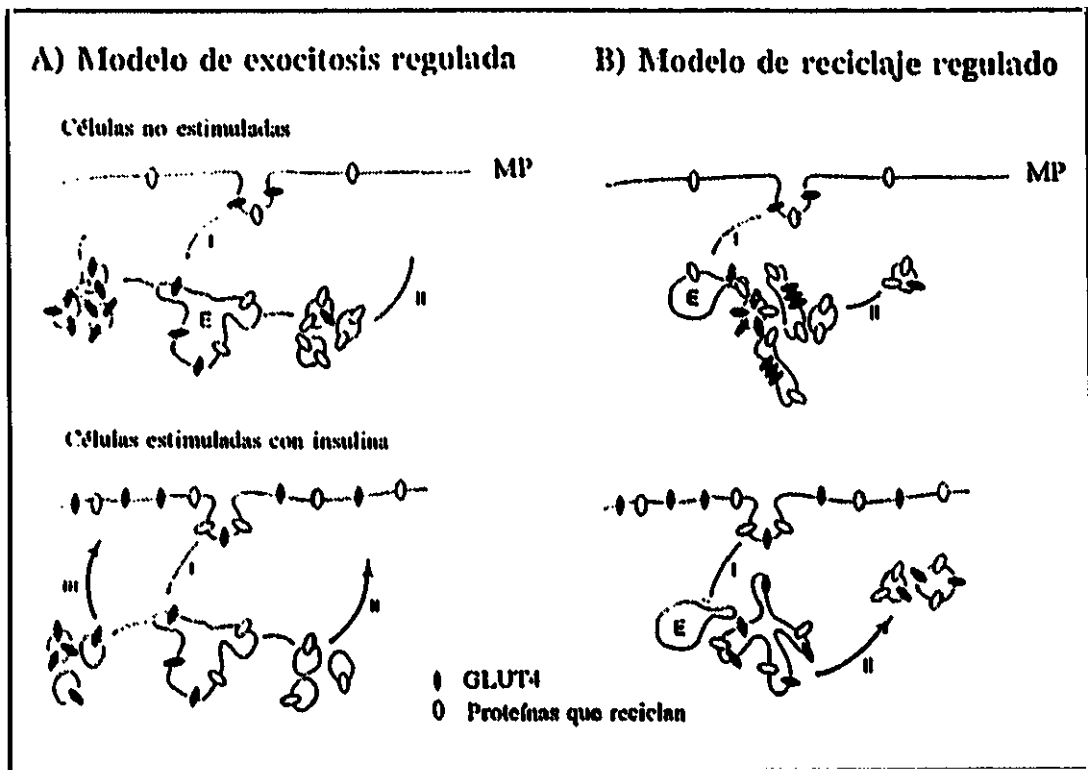


Figura 3. Modelo de exocitosis regulada y Modelo de reciclaje regulado para orientar al transportador GLUT4 hacia la membrana plasmática en células no estimuladas y estimuladas por insulina. En ambos modelos el GLUT4 está retenido en el interior de la célula por una eficiente internalización (I) desde la membrana plasmática (MP) a través de vesículas recubiertas de clatrina y por una eficiente retención intracelular después de seleccionar el endosoma (E). De este modo, la proporción de GLUT4 que se internaliza es, bajo estas condiciones de ensayo, pequeña comparada con otras proteínas que reciclan. La mayor diferencia entre los dos modelos, es que en el modelo de exocitosis regulada el GLUT4 está seleccionado dentro de una única población de vesículas distintas de las de otras proteínas que también reciclan. La insulina tiene que estimular la exocitosis de las vesículas que contienen otras proteínas que se reciclan (II) y de las vesículas donde sólo se ubica el GLUT4 (III). En el modelo de reciclaje regulado el compartimento que se recicla contiene microdominios, en los cuales, la proporción de GLUT4 reciclado con respecto a otras proteínas que reciclan, variará considerablemente. Estos microdominios representarían simplemente diferentes afinidades de varias proteínas por una proteína seleccionada contenida en el endosoma que recicla.

6. CONCEPTO Y CLASIFICACION DE DIABETES MELLITUS

En el siglo I, Areato de Capadocio (69) introdujo el término de diabetes mellitus para describir un desorden crónico caracterizado por polidipsia, polifagia y poliuria, que a lo largo de los meses provocaría la muerte del paciente.

En 1939 Himsworth (70) vio que existían dos tipos de pacientes diabéticos, unos que respondían bien a la insulina, y otros que no respondían correctamente a la insulina, clasificando la diabetes en dos grupos según la sensibilidad a esta hormona, postulándose la posibilidad de que no todos los diabéticos tuvieran una disminución en los niveles insulínicos, sino que su alteración primaria fuera debida a una pobre utilización de la insulina por los tejidos periféricos.

Actualmente es difícil dar una definición clara de diabetes. La mayoría de los autores aceptan que la diabetes es un síndrome caracterizado por trastornos del metabolismo hidrocarbonado, lipídico y proteico, debido a la falta parcial o total de insulina, o a una alteración de la acción biológica de la insulina.

En 1979 por iniciativa de la National Data Diabetes Group (71), debido a la gran confusión existente en la designación de las distintas formas de diabetes, se sentaron las bases para la clasificación actual de diabetes mellitus. Podemos distinguir tres clases de diabetes mellitus:

- * Diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID), Tipo I
- * Diabetes mellitus no insulino-dependiente (DMNID), Tipo II
- * Diabetes asociada a ciertos síndromes y condiciones, tales como enfermedad pancreática, drogas o productos químicos tóxicos, anormalidades del receptor de insulina o síndromes genéticos.

7. ANTIDIABETICOS ORALES

Actualmente se considera como tratamiento de elección para la diabetes mellitus tipo II el seguimiento de una dieta y ejercicio adecuado, no obstante, en los casos en que estas

medidas no sean suficientes por sí solas se establece la adición de antidiabéticos orales o insulina.

Comprenden los antidiabéticos orales aquellas drogas que se emplean por vía oral en el tratamiento de la diabetes mellitus de determinados pacientes, cuyos principales representantes son las sulfonilureas y biguanidas.

8. SULFONILUREAS

Durante la 2ª Guerra Mundial (1942), el doctor francés Marcel Janbon observó que numerosos pacientes con fiebres tifoideas tratados con una nueva sulfonamida (2254RP), desarrollaron en muchos casos frecuentes episodios de hipoglucemia (72).

Después de la guerra se llevaron a cabo diversas investigaciones y en 1946 Augusto Loubatières sugirió que las sulfonamidas disminuyan la glucosa en sangre estimulando la secreción de insulina del páncreas (73).

En 1955 aparecieron en el mercado dos antidiabéticos orales, carbutamida (BZ55) y tolbutamida (D860). La tolbutamida fue la primera sulfonilurea que no tenía ninguna acción antibacteriana.

Hoy en día, las sulfonilureas constituyen la familia de hipoglucemiantes orales más ampliamente utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus no insulino dependiente (74).

8.1 ESTRUCTURA QUIMICA

Son arilsulfonilureas (Figura 4), derivan de un núcleo común (benceno-sulfonil-urea), por sustitución de los grupos benceno (R_1) y urea (R_2).

Se dividen en sulfonilureas de primera y de segunda generación, siendo estas últimas las de más reciente aparición y superior potencia farmacológica, dando a la molécula original mayor potencia hipoglucemiante (75) al poseer en su estructura sustituyentes más lipofílicos.

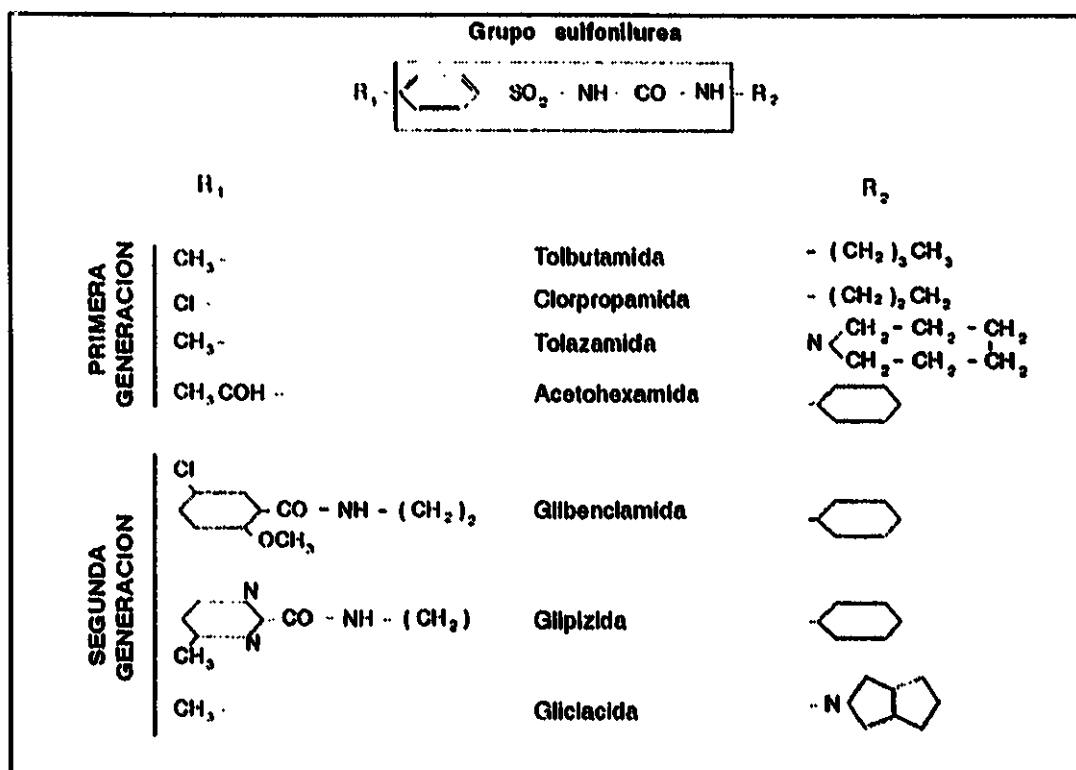


Figura 4. Estructura química de las sulfonilureas. Principales sulfonilureas de primera y segunda generación.

8.2 FARMACOCINETICA

Estos medicamentos se absorben por vía intestinal, algunos de forma rápida como la glipizida, ligándose posteriormente a proteínas plasmáticas, fundamentalmente a la albúmina (en porcentajes oscilantes del 88% al 99%). Por su unión a proteínas, algunas drogas pueden ejercer un papel competitivo con las sulfonilureas, potenciando su actividad hipoglucemiante, al originar una mayor cantidad de fracción libre de las mismas. Este fenómeno es menos manifiesto con las sulfonilureas de segunda generación, cuya unión a proteínas se realiza por fuerzas de carácter no iónico, a diferencia de las sulfonilureas de primera generación, en que intervienen fuerzas iónicas (76).

Las características farmacocinéticas principales de las sulfonilureas de primera y segunda generación se reflejan en la tabla 2.

TABLA II. Farmacocinética de las principales sulfonilureas.

	Vida media	Metabolización	Excreción	Tiempo efecto
TOLBUTAMIDA	7 h	Hepática (carboxilación) Metabolitos inactivos	Renal (100%)	6-12 h
CLORPROPAMIDA	24-48 h	Hepática (hidroxilación y ruptura cadena lateral) Metabolitos activos e inactivos	Renal (6-60%)	60 h
TOLAZAMIDA	7 h	Hepática Metabolitos activos débiles o inactivos	Renal (95%)	12-14 h
ACETOHEXAMIDA	3-11 h	Hepática (hidroxilación) Metabolitos activos e inactivos	Renal (60%)	12-18 h
GLIBENCLAMIDA	10-16 h	Hepática Metabolitos inactivos	Renal (50%) Biliar escasa	> 24 h
GLIPIZIDA	3-7 h	Hepática Metabolitos inactivos	Renal (68%)	> 24 h
GLICLACIDA	12 h	Hepática Metabolitos inactivos	Renal (60-70%)	> 24 h

TOLBUTAMIDA

Disponible desde 1956. Su principal característica es su corta vida media y su transformación hepática en metabolitos inactivos que se secretan por el riñón. Esto hace que sea menos potente pero más segura que otras sulfonilureas. Puede ser útil en pacientes con un leve daño renal.

CLORPROPAMIDA

Introducida en 1957, con mayor efecto hipoglucemiante que tolbutamida, con una vida media larga y una duración del efecto hipoglucémico de días. Se absorbe lentamente y al ser más hidrófila se liga menos a la albúmina.

La clorpropamida tiene acción antidiurética, así la retención de agua y la hiponatremia son complicaciones derivadas de su uso.

TOLAZAMIDA

Disponibile desde el año 1966. Con una vida media corta, es metabolizada por el hígado a numerosos metabolitos con poca actividad hipoglucémica. Puede usarse en pacientes con lesiones en la función renal. Posee una actividad diurética similar a la acetohexamida, pero no comparte la actividad uricosúrica.

ACETOHEXAMIDA

Más potente que tolbutamida, se introdujo en 1963. Es metabolizada por el hígado a 1-hidroxihexamida, que es un hipoglucemiante dos veces más potente que la propia acetohexamida. Este metabolito es excretado en la orina, por lo que esta sulfonilurea está contraindicada en pacientes con enfermedad renal.

La acetohexamida aumenta la excreción de agua y es un potente agente uricosúrico.

GLIBENCLAMIDA

En Estados Unidos denominado gliburide, usada en Europa desde 1969. Es 50 ó 100 veces más potente que las sulfonilureas de primera generación. Aunque la vida media es corta, la duración de su efecto es aproximadamente de 24 horas. Se une a la albúmina y se metaboliza con ligera actividad hipoglucemiante que se elimina fundamentalmente por el riñón y vía biliar.

Esta sulfonilurea tiene un efecto más agudo y prolongado sobre las células beta del páncreas que el resto, siendo la mayor causa adversa de su uso la incidencia de severas hipoglucemias.

GLIPICIDA

Introducida en 1973, con una potencia comparable a glibenclamida. Con un tiempo de acción de 18 a 24 horas. Es la que más rápidamente se absorbe, metabolizándose totalmente a metabolitos inactivos que se eliminan fundamentalmente por vía renal.

GLICLACIDA

Disponible desde 1971, con una potencia hipoglucémica intermedia entre glibenclamida y las sulfonilureas de primera generación. Se absorbe rápidamente, se liga a la albúmina y se metaboliza completamente a metabolitos inactivos que se eliminan fundamentalmente por los riñones aunque parcialmente por la bilis.

El mayor interés de esta droga respecto al resto es su actividad antiagregante plaquetaria (previene o retarda la retinopatía diabética y otras complicaciones vasculares de la diabetes mellitus).

9. MECANISMO DE ACCION DE LAS SULFONILUREAS

9.1 ACCIONES PANCREATICAS

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que las sulfonilureas estimulan la secreción de insulina (77,78). Las sulfonilureas estimulan la liberación de insulina *in vitro* en ausencia de otros secretagogos.

No hay evidencias de que ninguna de las sulfonilureas difieran en su modo de acción (79,80), ni de que incrementen la síntesis de insulina por la célula β pancreática (81).

El principal mecanismo a través del cual las sulfonilureas desencadenan la secreción de insulina (Figura 5) se inicia por su unión a receptores en la superficie de las células β pancreáticas (82). Esto permite el cierre de los canales de K^+ ATP dependientes (83,84), hay una disminución del flujo de K^+ (85) provocando la despolarización de la membrana plasmática y la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje, aumentando el flujo de Ca^{2+} hacia el interior celular (86). El incremento de la concentración de calcio intracelular activa el sistema de microtúbulos y microfilamentos que moviliza los gránulos de secreción hacia los lugares de exocitosis de la membrana celular.

Aunque este mecanismo representa, indudablemente, el mayor camino para que las sulfonilureas estimulen la secreción de insulina, existen todavía hechos sin aclarar. Por ejemplo, las sulfonilureas modifican el pH intracelular, además se ha visto que las

sulfonilureas aumentan el contenido de sodio de los islotes, lo que provocaría un aumento del flujo de calcio hacia el interior celular y contribuiría a la secreción de insulina (87); por otro lado, continúan estimulando la secreción de insulina a altas concentraciones de glucosa cuando la inhibición de la actividad del canal de K^+ es casi completa (88).

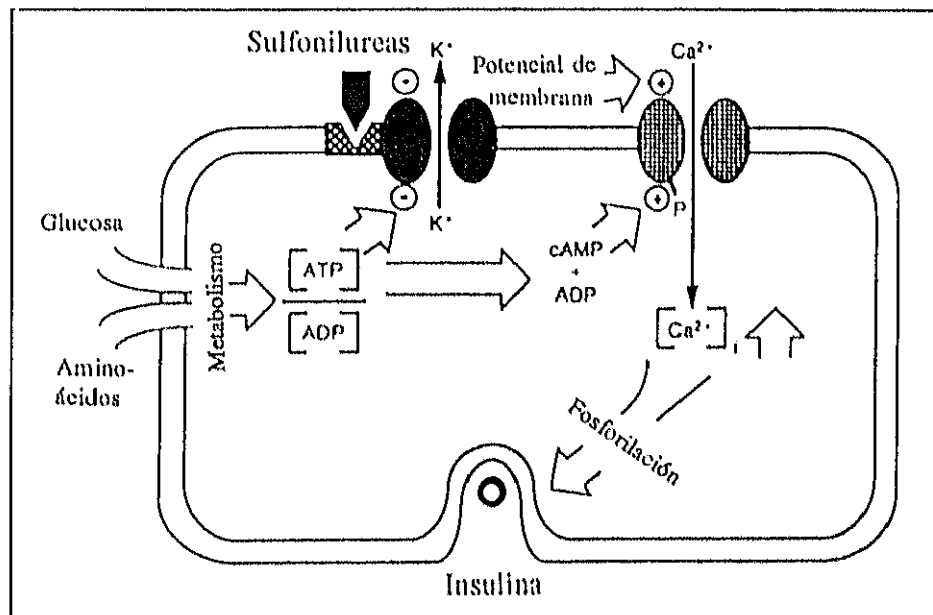


Figura 5. Mecanismos propuestos para la acción de las sulfonilureas sobre la secreción de insulina. Las sulfonilureas al igual que la glucosa y otros secretagogos inhiben los canales de K^+ ATP dependientes, el cierre de estos canales provoca la secreción de insulina.

Se ha referido que las sulfonilureas pueden inhibir la liberación de glucagón *in vitro* (89-91). En pacientes con diabetes mellitus tipo II se ha observado una reducción de los niveles de glucagón después de tratamientos crónicos con sulfonilureas (92,93). Sin embargo, en otros estudios este efecto ha sido cuestionado (94,95). La acción de las sulfonilureas sobre la secreción de glucagón podría ser causado por el mejor funcionamiento de la célula β pancreática.

9.2 ACCIONES EXTRAPANCREATICAS

Las acciones extrapancreáticas de las sulfonilureas, han sido durante más de 30 años, y, hoy en día siguen siendo motivo de controversia.

Aunque las sulfonilureas no reducen la glucemia en animales cuyas células β -pancreáticas han sido destruídas o en animales pancreatomizados (96,97), ni tampoco en pacientes con diabetes mellitus tipo I (98,99), hay evidencias de que estas drogas reducen la hiperglucemia en pacientes con DMNID por otros mecanismos diferentes al aumento de la secreción insulínica. En pacientes tratados con sulfonilureas se ha observado como con el paso del tiempo persistía el efecto hipoglucemiante de las mismas, a la vez que la liberación pancreática de insulina descendía a los valores previos al tratamiento (100,101). Estos datos abogan por el hecho, de que la acción hipoglucemiante de estas drogas a largo plazo, radica fundamentalmente en un mecanismo extrapancreático (102-103).

Parece, no obstante, que por lo que a la acción hipoglucemiante se refiere, se admiten en la actualidad dos mecanismos fundamentales a nivel extrapancreático:

1) Potenciación de la acción periférica insulínica, favoreciendo la utilización de glucosa en músculo y tejido adiposo.

El tratamiento con sulfonilureas se asocia con un aumento de la sensibilidad a la insulina por parte de los tejidos periféricos (104,105). Diversos estudios han demostrado que las sulfonilureas aumentan la utilización de la glucosa mediada por insulina en el músculo esquelético (106) y en células musculares cultivadas (107,108). Además, se han referido diversos efectos directos de estas drogas sobre la captación de glucosa por el músculo esquelético (109,110).

Por otro lado, se ha visto que las sulfonilureas en presencia de insulina potencian el transporte de hexosas en adipocitos (111). En líneas celulares adiposas como 3T3-L1, se ha referido un aumento de la captación de glucosa en presencia sólo de sulfonilureas (112) o un aumento del transporte de glucosa estimulado por insulina (113).

2) Reducción de la liberación hepática de glucosa.

Algunos estudios han demostrado una disminución de la producción hepática de glucosa en pacientes con DMNID después del tratamiento crónico con sulfonilureas (114), reduciendo de ese modo los niveles de glucemia en ayunas.

Se ha observado que las sulfonilureas inhiben la liberación de glucosa hepática por inhibición de la gluconeogénesis y aceleración de la glucogenólisis en el hígado perfundido de ratas (115,116). Así, parte de este efecto estaría mediado por un aumento en el contenido hepatocitario de fructosa 2,6 difosfato (117,118) y por inhibición de la oxidación de ácidos grasos de cadena larga (119).

9.3 RECEPTOR DE SULFONILUREAS

Como hemos visto las sulfonilureas inhiben los canales de K^+ ATP-dependientes al unirse a receptores de alta afinidad presentes en la membrana plasmática de la célula β -pancreática. La capacidad de unión de las diferentes sulfonilureas a estos receptores refleja su habilidad para estimular la secreción de insulina (120,121).

Estudios de unión y experimentos de *patch clamp* sugieren que los canales de K^+ ATP-dependientes están controlados por cuatro sitios separados: un sitio de unión para ATP (y nucleótidos relacionados), un segundo sitio de unión para complejos MgADP, un tercero para sulfonilureas y otro para diazóxido. El ATP y otros nucleótidos relacionados, así como las sulfonilureas provocan el cierre de los canales de K^+ ATP dependientes, mientras que los compuestos de MgADP, algunos nucleótidos, el diazóxido y otros fármacos provocan la apertura de estos canales (122-124). Los canales de K^+ ATP-dependientes están modulados por proteínas G y proteínas quinasas (125). Los canales de K^+ ATP-dependientes y los receptores de sulfonilureas parecen estar funcionalmente unidos, aunque no está claro si constituyen una sola entidad o si el receptor de sulfonilureas es una proteína distinta que modula la actividad del canal (83,126).

Han sido identificados y caracterizados receptores de alta afinidad para sulfonilureas en células secretoras de insulina (HIT, RINm5F) y en membranas de islotes pancreáticos (127,128). En células HIT, mediante el análisis de Scatchard se ha demostrado la existencia

de dos sitios de unión para sulfonilureas, un sitio de alta afinidad y una segunda población de sitios de baja afinidad.

El receptor de sulfonilureas ha sido purificado a través de análogos (derivados) de sulfonilureas que se unen covalentemente a la proteína, y ha sido parcialmente secuenciado utilizando librerías complementarias de DNA (129).

El receptor de sulfonilureas forma parte de la familia de proteínas que unen ATP, y es una proteína de membrana con un Pm de 140-170 Kda (129), además se han detectado proteínas de 65 y 43 Kda (130). Análisis de Northern blot de poli-A mRNA aislado de células secretoras de insulina, que expresan receptores de sulfonilureas y canales de K⁺ ATP-dependientes, han mostrado que tienen un transcripto de aproximadamente 5000 nucleótidos (129).

También se han encontrado sitios de alta afinidad para sulfonilureas en músculo cardíaco, músculo liso, músculo esquelético y adenohipófisis (131-133), similares a los de las células secretoras de insulina. En el cerebro se ha identificado un péptido de 38 Kda que une sulfonilureas con alta afinidad y parece estar acoplado a una proteína de 160-170 Kda (134). En las células α pancreáticas se han identificado dos receptores de alta afinidad con un Pm de 140 y 150 Kda (135), lo que apoyaría una acción directa de las sulfonilureas sobre estas células, incluyendo la regulación de la secreción de glucagón.

Se ha demostrado la existencia de mutaciones en el gen del receptor de sulfonilureas en familias con persistente hiperinsulinemia e hipoglucemias en niños (136).

El receptor de sulfonilureas, tendría por tanto, un papel central en la regulación de la secreción de insulina, por lo que el hipoinsulinismo de la diabetes mellitus podría estar relacionado también con mutaciones en el receptor de sulfonilureas.

10. GLICLACIDA

La glielacida es una sulfonilurea de segunda generación usada en el tratamiento de la DMNID, ya que mejora los defectos de la secreción insulínica y puede revertir la resistencia insulínica observada en estos pacientes.

La gliclacida al igual que el resto de las sulfonilureas se une a receptores específicos de membrana y estimula la secreción de insulina. La glucosa estimula la secreción de insulina de una manera bifásica, con una primera fase muy rápida y una segunda fase de secreción más lenta. Muchos estudios han referido que la mayoría de las sulfonilureas no tienen ningún efecto sobre la primera fase de secreción de insulina en pacientes con DMNID (137,138). En contraposición a estos estudios, se ha demostrado que la gliclacida estimula la primera fase de secreción de insulina (139,140). El efecto estimulador de la gliclacida sobre la primera fase de secreción de insulina es similar después de largos y cortos periodos de tratamiento con esta droga (141,142). El hecho de que esta droga tenga un efecto menor sobre la fase lenta de secreción de insulina podría explicar la menor incidencia de hipoglucemias.

Algunos estudios han referido una reducción de la glucemia con tratamientos con gliclacida a pesar de no aumentar los niveles de insulina circulantes (143). Esto sugiere que el efecto de la gliclacida sobre la glucosa sería mediado, en parte, por efectos extrapancreáticos, tales como un incremento en la respuesta periférica o en la sensibilidad a la insulina.

Diversos investigadores han observado una disminución en la producción hepática de glucosa, así como un mayor aclaramiento de glucosa después de la administración de gliclacida en pacientes con DMNID (144).

Investigaciones *ex vivo* han aportado evidencias de que la gliclacida tiene un efecto directo sobre la captación de glucosa (145), y un efecto potenciador sobre la captación de glucosa estimulada por insulina en el músculo esquelético (146). Se ha demostrado que el tratamiento con gliclacida activa la enzima glucógeno sintetasa (147,148), enzima clave del metabolismo de la glucosa en el músculo esquelético.

La falta de efectos directos de esta droga sobre los receptores de insulina *in vivo* (149) o *in vitro* (150), sugieren que los efectos de esta droga sobre la acción de la insulina estarían mediados a nivel post-receptor.

Uno de los aspectos claves de esta droga sobre el resto de las sulfonilureas son sus efectos hemobiológicos. Se ha demostrado que, en animales y humanos, la gliclacida decrece la agregación y adhesión plaquetaria, normaliza el metabolismo de las

prostaglandinas e incrementa la actividad fibrinolítica vascular.

En animales se ha visto que la glielacida inhibe la trombina y el colágeno (151). Además se ha observado que la glielacida administrada en pacientes con DMNID reduce el colágeno, sin embargo este efecto no se ha encontrado en pacientes tratados con glibenclamida (152).

Parece que la glielacida actúa eliminando los radicales libres (152,153), de esta manera se activaría la prostaciclina sintetasa y se inhibiría la ciclooxigenasa, sintetizándose más prostaglandinas (154) e inhibiéndose la formación de tromboxanos (155).

En pacientes con DMNID tratados con glielacida se ha confirmado la existencia de niveles marcadamente bajos o normales del activador de plasminógeno (156), incrementándose la actividad fibrinolítica vascular.

11. BIGUANIDAS

Las biguanidas tienen una historia que se remonta a la Edad Media, cuando Galega officinalis (rica en biguanida) fue usada como tratamiento de la diabetes en el sur y este de Europa (157). En 1918, Watanabe comprueba el efecto normoglucemiante de la guanidina (158). En 1926, el doctor Frank utiliza por primera vez en clínica un derivado guanidínico (Sintalina A) como agente anti-hiperglucémico, teniendo que abandonarlo posteriormente por sus efectos hepatotóxicos.

Es a partir de 1957, cuando van a comenzarse a emplear regularmente en el tratamiento de la diabetes determinados derivados biguanídicos: metformina (159), fenformina (160) y butformina (161).

Químicamente son derivados de la guanidina. La metformina es un derivado dimetilado, mientras que la fenformina y butformina son monosustituídos por un radical más largo.

11.1 FARMACOCINETICA

Las biguanidas tienen un comportamiento farmacocinético variable por su diferente composición química. Estos fármacos presentan una absorción intestinal rápida. La fenformina se une a proteínas plasmáticas y sufre en parte metabolización hepática (40%). La butformina, no ligada a proteínas se elimina inmodificada por vía renal. La metformina se absorbe fundamentalmente (70-80%) en el intestino, no se liga a proteínas plasmáticas, ni es metabolizada y se elimina por vía urinaria; se acumula en gran cantidad en la pared intestinal (162).

La aparición de acidosis láctica con una mortalidad del 25%, asociada con las biguanidas, especialmente con fenformina (163), hizo que esta droga y butformina se retiraran del mercado en Estados Unidos y otros países. Actualmente la metformina es la única biguanida recomendada para el tratamiento de diabéticos no insulino-dependientes, debido a los pocos casos de acidosis láctica que se asocian con esta droga.

11.2 MECANISMO DE ACCION

Las biguanidas son drogas normoglucemiantes o antihiperoglucemiantes (normalizan los niveles elevados de glucemia). Para ejercer su acción requieren cierta cantidad de insulina, (de origen exógeno o endógeno) y a diferencia de las sulfonilureas no estimulan su secreción (164,165), por esto probablemente no reducen la glucemia en individuos no diabéticos (166).

El mecanismo de acción de las biguanidas no es bien conocido. La metformina se une por sus radicales lipofílicos a la membrana plasmática, la acumulación de cargas positivas genera un potencial de superficie de membrana que puede ser la señal desencadenante de los acontecimientos celulares.

Aunque en presencia de metformina la unión de la insulina al receptor está aumentada (167,168), se ha demostrado que esta droga mejora la actividad de la insulina a nivel post-receptor (169,170).

Se ha visto que las biguanidas aumentan la captación periférica de glucosa del 20 al 30% predominando según los tejidos el aumento del metabolismo oxidativo, en el músculo (171) o no oxidativo en el intestino. Parece que el efecto de la metformina no requiere nueva síntesis de proteínas, y se asocia con un incremento de la translocación del glucotransportador GLUT4 en músculo (172).

A nivel de tejido adiposo las acciones son menos evidentes, así parece aumentar la captación de glucosa y su oxidación (173), modificándose muy ligeramente el equilibrio lipogénesis-lipólisis (174), dando como resultado una ligera disminución de los ácidos grasos libres (175). Se ha referido un incremento de la translocación de glucotransportadores inducido por insulina en adipocitos (176).

Como ha sido expuesto previamente, la mejoría del metabolismo de la glucosa se produce por una mejor acción periférica de la insulina, sin modificarse la capacidad secretora de la misma, que puede aumentar ligeramente como consecuencia indirecta de la disminución de la glucemia y de la glucotoxicidad sobre la célula beta.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Este estudio está dirigido a conocer acciones extrapancreáticas de las sulfonilureas, concretamente a nivel de músculo esquelético.

La primera parte del trabajo se ha centrado en el estudio del efecto agudo de la glielacida, una sulfonilurea de segunda generación, sobre la utilización de la glucosa por el músculo esquelético en ratas normales, así como su mecanismo de acción.

Los objetivos concretos han sido:

1. Conocer si la glielacida en ausencia de insulina estimula la captación de glucosa por el músculo esquelético.
2. Comprobar si la glielacida tiene un efecto aditivo o potenciador de la insulina sobre la captación de la glucosa en el músculo esquelético.
3. Conocer si el efecto de la glielacida está mediado por canales de K^+ ATP dependientes.
4. Conocer si la glielacida promueve la translocación del glucotransportador GLUT4 a la membrana plasmática en el músculo esquelético.

La segunda parte del trabajo se ha diseñado para estudiar el efecto del tratamiento oral con glielacida sobre la utilización de la glucosa por el músculo esquelético de ratas con diabetes post-estreptozotocina.

Los objetivos concretos han sido:

1. Conocer si el tratamiento oral con glielacida produce una mejoría en el control glucémico, así como un aumento de la captación de glucosa por el músculo esquelético.
2. Conocer si este efecto se produce a nivel receptor o post-receptor de insulina.

3. Conocer el efecto del tratamiento con glielacida sobre el contenido total del glucotransportador GLUT4 en el músculo esquelético.
4. Conocer si la adición de glielacida al tratamiento insulínico reduce la insulinoresistencia que tienen estas ratas.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIALES

1.1 REACTIVOS

1.1.1 DETERMINACION DE GLUCOSA

- Reactivo de glucosa (Beckman)

1.1.2 DETERMINACION DE INSULINA

- Kit comercial (Novo Research Institute)
- Fosfato disódico monohidratado (Merck)
- Fosfato monosódico dihidratado (Merck)
- Cloruro sódico (Merck)
- Albúmina humana (ICN Hubber)
- Etanol absoluto (Scharlau)

1.1.3 DETERMINACION DE PEPTIDO C

- Kit comercial (DRG Instruments GmbH)

1.1.4 CAPTACION DE GLUCOSA EN MUSCULO PERFUNDIDO

- Cloruro potásico (Merck)
- Sulfato magnésico heptahidratado (Panreac)
- Cloruro cálcico (Merck)
- Fosfato monopotásico (Scharlau)
- Bicarbonato sódico (Merck)
- Pentotal sódico (Palex)
- D-Glucosa anhidra (Scharlau)
- Acido pirúvico (Sigma Chemical Company)
- Albúmina sérica bovina (BSA) Fracción V (Sigma Chemical Company)

- Insulina porcina (Novo Research Institute)
- Gliclacida (Laboratorios Servier)
- Diazóxido (Hiperstat, Schering-Plough)
- Dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical Company)

1.1.5 TRANSLOCACION DE GLUCOTRANSPORTADORES

- TRIS (Bio-Rad)
- EDTA Titriplex III (Merck)
- Sacarosa (Merck)
- Benzamidina (Sigma)
- Fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) (Sigma Chemical Company)
- Aprotinina (Boehringer Mannheim)
- Bacitracina (Sigma Chemical Company)
- Pirofosfato sódico (Sigma Chemical Company)
- Ortovanadato sódico (Sigma Chemical Company)
- Fluoruro sódico (Sigma Chemical Company)

1.1.6 CARACTERIZACION ENZIMATICA

* Actividad UDP-galactosiltransferasa

- Cacodilato sódico (Sigma Chemical Company)
- Cloruro de manganeso (Merck)
- β -mercaptoetanol (Sigma Chemical Company)
- N-acetilglucosamina (Sigma Chemical Company)
- UDP-galactosa (Sigma Chemical Company)
- UDP-[¹⁴C]-galactosa (Amersham Life Science)
- Columnas Dowex 2x8 Cl⁻ (Bio-Rad)

* Actividad Na⁺/K⁺ ATPasa

- Cloruro de magnesio (Merck)
- Imidazol (Sigma Chemical Company)
- Azida sódica (Merck)
- EGTA (Sigma Chemical Company)

- Molibdato amónico (Merck)
- Sulfato ferroso (Merck)

1.1.7 ELECTROFORESIS

Todos los reactivos y aparatos usados para electroforesis, fueron de la firma Bio-Rad:

- TRIS
- Glicina
- SDS
- Azul de bromofenol
- DTT
- Persulfato amónico
- TEMED
- Acrilamida
- Bis acrilamida

1.1.8 TRANSFERENCIA

- Membranas de nitrocelulosa (Immobilon P, MILLIPORE)
- Cubeta de transferencia (Bio-Rad)

1.1.9 AUTORADIOGRAFIA

- Kit ECL (Amersham Life Science)
- Películas de rayos X: X-Omat 20,3 x 25,4 cm (Kodak)
- Cassete de exposición de películas con pantalla

1.1.10 PURIFICACION DE LOS RECEPTORES DE INSULINA

- Triton X-100 (Bio-Rad)
- Leupeptina (Sigma Chemical Company)
- Pestatina (Sigma Chemical Company)
- Aglutinina de germen de trigo (Pharmacia LKB Biotechnology)
- Sefarosa CNBr activada (Pharmacia LKB Biotechnology)

1.1.11 UNION DE LA ¹²⁵I-INSULINA A LOS RECEPTORES

- Polietilenglicol 6000 (Merck)
- Gamma-globulina humana (Behring)

1.1.12 DETERMINACION DE PROTEINAS

- Reactivo de Bradford (Bio-Rad)

1.1.13 AUTOFOSFORILACION DEL RECEPTOR DE INSULINA

- Anticuerpo monoclonal anti-receptor de insulina AB-3 (Oncogene Science)
- Anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (Oncogene-Science)
- Proteína A-agarosa (Oncogene-Science)

1.1.14 FOSFORILACION DEL RECEPTOR DE INSULINA SOBRE UN SUSTRATO EXOGENO

- Poly Glu⁸⁰ - Tyr²⁰ (Sigma Chemical Company)
- Gamma-[³²P]-ATP (ICN Biomedicals)
- ATP y CTP (Sigma Chemical Company)

1.2 TAMPONES

1.2.1 TAMPON DE ANALISIS PARA DETERMINACION DE INSULINA:

- A) Fosfatos 0,04 M, con 1 mM de NaCl y 5,9% de albúmina de suero humano, pH 7,4
- B) Fosfatos 0,04 M, con 0,1% albúmina humana, pH 7,4

1.2.2 TAMPON DE ANALISIS PARA DETERMINACION DE PEPTIDO C:

- Fosfatos 0,05 M, con 0,025 M de EDTA y 1% BSA, pH 7,4

1.2.3 TAMPON KREBS-HENSELEIT:

- NaCl 130 mM
- KCl 4,7 mM
- MgSO₄·7H₂O 1,2 mM
- CaCl₂ 2,5 mM
- KH₂PO₄ 1,2 mM
- NaHCO₃ 25 mM

pH 7,4

1.2.4 TAMPON DE SOLUBILIZACION PARA LA PREPARACION DE FRACCIONES SUBCELULARES DE GLUCOTRANSPORTADORES:

- TRIS 0,2 M
- EDTA 10 mM
- Sacarosa 255 mM
- PMSF 1 mM
- Bacitracina 0,2 mg/ml
- Aprotinina 1000 Unidades/ml
- PMSF 1 mM
- Benzamidina 0,2 mg/ml
- NaF 100 mM
- Na₂H₂P₂O₇ 10 mM
- Na₃VO₄ 1mM

pH 7,4

1.2.5 TAMPON DE SUSPENSION DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES DE GLUCOTRANSPORTADORES (TES):

- Tris 0,2 M
- EDTA 10 mM
- Sacarosa 255 mM
- PMSF 1 mM

pH 7,4

1.2.6 TAMPON DE ANALISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA UDP-GALACTOSILTRANSFERASA:

- Cacodilato sódico 0,2 M, pH 6,5
- $MnCl_2$ 1M
- Mercaptoetanol 1 M
- Tritón X-100, 10%
- N-acetilglucosamina 1 M
- UDP galactosa 10 mM
- UDP- ^{14}C -galactosa 1 $\mu Ci/\mu mol$

1.2.7 MEZCLA DE REACCION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA Na^+/K^+ ATPasa:

- Imidazol 30 mM, pH 7,5
- NaCl 110 mM
- KCl 15 mM
- NaN_3 0,2 M
- NaEGTA 0,02 M, pH 7,0
- $MgCl_2$ 4mM

1.2.8 REACTIVO DE COLOR (Tausky-Shorr):

- $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 10% en H_2SO_4 10 N
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5%

1.2.9 TAMPON TRIS-GLICINA ELECTROFORESIS:

- TRIS 25 mM
- Glicina 190 mM
- SDS 0,1%

1.2.10 "COCKTAIL" LAEMLY:

- TRIS 116 mM
- SDS 3,4%
- DTT 3%
- Azul de Bromofenol 13,3 $\mu\text{g/ml}$
- Glicerol 16,7%

1.2.11 TAMPON TRIS SALINO (TBS):

- NaCl 9%
- Tris HCl 1 M, pH 7,4

1.2.12 TAMPON DE SOLUBILIZACION PARA AISLAMIENTO DEL RECEPTOR DE INSULINA:

- Hepes 50 mM
 - NaCl 50 mM
 - PMSF 1 mM
 - Triton X-100 1%
 - Leupeptina 2 μM
 - Pestatina 2 μM
 - Aprotinina 1000 Unidades/ml
 - Bacitracina 1 mg/ml
 - $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM
 - EDTA 8 mM
 - Na_3VO_4 1mM
 - NaF 100 mM
- pH 7,4

1.2.13 TAMPON WGA:

- Hepes 50 mM
 - NaCl 150 mM
 - PMSF 0,1 mM
 - Triton X-100 0,1%
- pH 7,4

1.2.14 TAMPON FOSFATOS:

- $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ 0,1 M

- NaPO_4H_2 0,1 M

pH 7,4

1.2.15 "COCKTAIL" AUTOFOSFORILACION:

- MgCl_2 5 mM

- MnCl_2 10 mM

- ATP 50 μM

- CTP 500 μM

- Gamma- ^{32}P -ATP 40 $\mu\text{Ci}/50 \mu\text{l}$

en Hepes 50 mM, pH 7,4

1.2.16 TAMPON PARA DETENER LA REACCION EN LA AUTOFOSFORILACION:

- EDTA 10 mM

- NaI 100 mM

- $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 20 mM

- ATP 4 mM

en Tampón WGA con NaCl 0,5 M

1.2.17 TAMPON DE ANALISIS PARA FOSFORILACION EXOGENA:

- MgCl_2 10 mM

- MnCl_2 0,5 mM

- Poli Glu 4:Tyr 1, 2,5 mg/ml

en Hepes 50 mM, pH 7,4

1.2.18 "COCKTAIL" FOSFORILACION EXOGENA:

- Gamma- ^{32}P -ATP 2,5 μCi ; 100 μM

- ATP 100 μM

1.3 ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

1.3.1 Modelo de rata normal

Ratas macho Wistar de 180-200 g de peso. Mantenido en jaulas con ciclo de luz/oscuridad de 12 h, en una habitación con humedad relativa del aire del 45-50%, y temperatura de 22-24°C. Los animales tuvieron acceso libre a la comida y al agua.

En estas ratas se llevaron a cabo los siguientes estudios:

A) PERFUSION DE EXTREMIDADES INFERIORES

Los animales estuvieron 14 horas en ayunas antes de realizar la perfusión muscular.

* Captación de glucosa en presencia de gliclacida.

La perfusión duró 60 minutos. Tras 30 minutos de periodo de equilibrio (considerado como captación basal de glucosa) se añadieron al medio de perfusión diferentes concentraciones de gliclacida (5, 10, 25, 50, 100, 300, 700 y 1000 $\mu\text{g/ml}$), manteniéndose la perfusión durante otros 30 minutos.

* Captación de glucosa en presencia de insulina.

La duración total de la perfusión fue de 90 minutos y comprendió tres partes: 30 min de captación basal de glucosa, 30 min con insulina 10^{-9} M y 30 min con insulina 10^{-7} M. En el minuto 60 se añadió glucosa al medio de perfusión para alcanzar una concentración de 100 mg/dl.

* Captación de glucosa en presencia de gliclacida e insulina.

Tras 30 min de captación basal, la perfusión se mantuvo otros 30 min con gliclacida a las concentraciones de 50, 100 ó 300 $\mu\text{g/ml}$ más insulina 10^{-9} M.

* Captación de glucosa en presencia de diazóxido y gliclacida.

Se siguieron dos protocolos de ensayo:

1) La perfusión se mantuvo durante 85 min, tras 30 min de periodo de equilibrio, se añadió gliclacida (100 $\mu\text{g/ml}$) en el min 35 y posteriormente diazóxido (100 $\mu\text{g/ml}$) en los minutos 60 y 70.

2) La duración de la perfusión fue de 85 min, se añadió diazóxido (100 $\mu\text{mol/l}$) en los minutos 30, 45, 55, 65 y 75; la gliclacida (100 $\mu\text{g/ml}$) se añadió en el minuto 35.

*** Captación de glucosa en presencia de diazóxido e insulina.**

La duración de la perfusión fue de 85 min, se añadió diazóxido (100 $\mu\text{mol/l}$) en los minutos 30, 45, 55, 65 y 75, e insulina 10^{-9} M en el minuto 35.

B) TRANSLOCACION DE LA PROTEINA TRANSPORTADORA GLUT4

Para conocer si la gliclacida promovía la translocación del glucotransportador GLUT4, se midió el contenido de GLUT4 en fracciones subcelulares del músculo esquelético en ausencia y presencia de gliclacida a la concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$, en presencia de insulina (10^{-9} y 10^{-7} M) y de la combinación de gliclacida (300 $\mu\text{g/ml}$) e insulina (10^{-9} M).

1.3.2 Modelo de ratas diabéticas

1.3.2.1.- Ratas macho Wistar de 150-175 g de peso, mantenidas con ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Se indujo diabetes mediante una inyección única de estreptozotocina a la dosis de 65 mg/kg en una vena de la cola. La estreptozotocina se disolvió en buffer citrato (pH 4,5) y se inyectó inmediatamente un volumen de 100 $\mu\text{l}/100$ g.

Tres días después de la administración de la STZ se verificó la inducción de diabetes por análisis de la glucemia en una muestra de sangre de la cola. Sólo las ratas que presentaron glucemias entre 200-400 mg/dl fueron seleccionadas para proseguir el estudio. Durante doce días se siguieron cuatro modalidades de tratamiento.

*** Ratas diabéticas sin tratar (Grupo D)**

Se estudió un grupo de 11 ratas diabéticas post-estreptozotocina a las que se administró placebo (NaOH 0,02 N) dos veces al día por vía oral a través de una sonda rígrida gástrica a lo largo de los 12 días de seguimiento.

*** Ratas diabéticas tratadas con gliclacida (Grupo G)**

A un grupo de 10 ratas diabéticas post-estreptozotocina se les administró gliclacida a la dosis de 5 mg/kg dos veces al día (9 de la mañana y 8 de la tarde) disuelta en NaOH 0,02 N (200 μ l/100 g) mediante una sonda rígida gástrica, durante 12 días.

*** Ratas diabéticas tratadas con insulina (Grupo I)**

Un grupo de 11 ratas diabéticas post-estreptozotocina fue tratado con una inyección subcutánea diaria de insulina NPH a las 8 de la tarde. La dosis de insulina osciló entre 4-7 unidades/día durante los 12 días.

*** Ratas diabéticas tratadas con gliclacida e insulina (Grupo G+I)**

Un grupo de 9 ratas diabéticas post-estreptozotocina fue tratado con insulina y gliclacida según los apartados anteriores.

En estas ratas diabéticas se realizaron los siguientes estudios:

A) DETERMINACIONES ANALITICAS

A todas las ratas diabéticas se les realizó determinaciones de glucemia en muestras de sangre venosa (de la cola) cada dos días. A las 72 horas de la administración de la estreptozotocina y a los 13 días de iniciado el tratamiento se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca para análisis posterior de insulina.

B) PERFUSION DE EXTREMIDADES INFERIORES

Al final del tratamiento, 36 horas después de la última dosis de insulina, tras 14 horas de ayuno y de la administración de la última dosis de gliclacida o placebo, se realizó la perfusión de extremidades inferiores para medir la captación de glucosa en ausencia (captación basal) y presencia de cantidades crecientes de insulina (10^{-9} y 10^{-7} M).

Una vez terminada la perfusión muscular los músculos gastrocnemius fueron rápidamente extraídos, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -70°C , para utilizarse en estudios posteriores.

C) PURIFICACION PARCIAL DE LOS RECEPTORES DE INSULINA

En los receptores parcialmente purificados de los músculos gastrocnemius se realizaron los estudios de los apartados posteriores (D,E,F).

D) UNION DE LA ¹²⁵I-INSULINA A LOS RECEPTORES

E) AUTOFOSFORILACION DEL RECEPTOR DE INSULINA

F) FOSFORILACION DE UN SUSTRATO EXOGENO POR EL RECEPTOR DE INSULINA

G) ANALISIS DEL CONTENIDO DEL GLUCOTRANSPORTADOR GLUT4

Este estudio se realizó también en un grupo de ratas no diabéticas (Grupo C).

1.3.2.2.- Ratas macho Wistar de 150-175 g de peso, mantenidas con ciclo invertido de 12 h (oscuridad/luz). Se indujo diabetes según el apartado anterior. Durante 12 días se siguieron dos modalidades de tratamiento:

*** *Ratas diabéticas tratadas con insulina (Grupo I)***

Ratas diabéticas post-estreptozotocina tratadas con una inyección diaria subcutánea de insulina NPH a las 8 de la mañana. La dosis de insulina fue de 3 unidades/día.

*** *Ratas diabéticas tratadas con gliclacida e insulina (Grupo G+I)***

Ratas diabéticas post-estreptozotocina tratadas durante 12 días con 3 unidades de insulina NPH por vía subcutánea y gliclacida a la dosis de 5 mg/kg por vía oral y dos veces al día (Fotografía 1) .

En ambos grupos se llevaron a cabo los siguientes estudios:

A) DETERMINACIONES ANALITICAS

Se determinó la glucemia de estos dos grupos de ratas diabéticas en muestras de sangre de la cola (Fotografía 2) con un autoanalizador (ONE TOUCH, LIFESCAN) cuatro veces al día, cada cuatro horas (8 y 12 de la mañana, 4 y 8 de la tarde). Además se realizaron

determinaciones de péptido C tres días después de la administración de STZ (día de inicio del tratamiento) y el día 13 (día en que las ratas fueron perfundidas).

B) PERFUSION DE EXTREMIDADES INFERIORES

Realizada según el apartado anterior (1.3.2.1.B)



Fotografía 1. Tratamiento con gliclacida por vía oral a través de una sonda rígida gástrica.



Fotografía 2. Determinación de la glucemia en una muestra de sangre de la cola.

2. METODOS.

2.1 DETERMINACION DE GLUCOSA.

La concentración de glucosa fue determinada en suero por el método de glucosa oxidasa, utilizando el autoanalizador de glucosa Beckman 2 (Beckman Instruments España, S.A.).

2.2 DETERMINACION DE INSULINA.

La concentración de insulina sérica se determinó por radioinmunoensayo (Kit comercial), utilizando como curva patrón insulina de rata.

Las muestras de la curva de insulina de rata (liofilizadas) se reconstituyeron en el tampón descrito en el apartado 1.2.1.A a las siguientes concentraciones finales: 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4 y 10 ng/ml. La solución ^{125}I -insulina y el suero antiinsulina (ambos liofilizados) se reconstituyeron en el tampón descrito en el apartado 1.2.1.B. El suero de insulina antiporcina había sido preparado por inmunización de cobaya con insulina porcina.

Procedimiento:

Todas las incubaciones y centrifugaciones se realizaron a 4°C.

La curva patrón se analizó por triplicado y las muestras por duplicado. Las muestras y la curva (0,1 ml) se incubaron 1 día con 0,1 ml de anticuerpo antiinsulina (1:18.000). Posteriormente se añadió la insulina porcina marcada (50 pg) y se incubó nuevamente durante 4 horas. Una vez finalizado el periodo de incubación, se procedió a la separación de la hormona libre de la ligada al anticuerpo, añadiendo 1,6 ml de etanol al 95%. Seguidamente los tubos fueron vorteados y centrifugados a 1.000 g durante 10 min. Se contó la radiactividad presente en el sobrenadante (hormona libre) y la del precipitado (hormona unida al anticuerpo) en un contador gamma.

La degradación de la insulina se determinó por precipitación con TCA, siendo inferior al 10% en estas condiciones de ensayo.

2.3 DETERMINACION DE PEPTIDO C

Los niveles séricos de péptido C se determinaron mediante radioinmunoensayo (Kit comercial) utilizando péptido C de rata como curva patrón.

Procedimiento:

Todas las incubaciones y centrifugaciones se realizaron a 4°C.

Se analizó la curva patrón por triplicado y las muestras por duplicado. Las muestras y la curva (0,1 ml) se incubaron con 0,1 ml de anticuerpo antipéptido C porcino y 0,1 ml de tampón de ensayo (1.2.2) durante 24 h. Posteriormente se añadió el péptido C de rata marcado con ¹²⁵I y fue incubado durante 24 h. Tras este periodo de incubación se añadió 1 ml de polietilenglicol para separar la hormona libre de la ligada al anticuerpo y los tubos se centrifugaron a 2.500 g durante 15 min. Se decantó el sobrenadante y se contó la radiactividad del precipitado en un contador gamma.

2.4 PERFUSION DE EXTREMIDADES INFERIORES DE RATA

2.4.1 APARATO DE PERFUSION

La cámara de perfusión (Figura 6) es una modificación de la descrita por Hems y colaboradores (177) para la perfusión de hígado.

El medio de perfusión, que está continuamente agitándose mediante un agitador magnético (1), es bombeado desde el reservorio (2) por una bomba peristáltica (3), en la que se ajusta el volumen bombeado por unidad de tiempo. Seguidamente el medio de perfusión pasa a través de un tubo de oxigenación Silastic (4), de 7 m de longitud, 1 mm de diámetro y 0,2 mm de grosor de pared, suspendido en otro tubo gaseado (5) con O₂ + CO₂ (95:5) (6) que es humedecido al pasar a través de agua (7). El tubo de oxigenación Silastic está conectado a una jeringa (8) con un filtro (9) de 3,5 cm de diámetro, para impedir el paso de posibles coágulos al interior del animal. Ajustado al filtro hay un cateter

de goma elástica (10) que a través de una llave de tres vías está conectado, por una de las vías, a otro cateter que termina en una aguja del nº 16 (11), con la que se canula la aorta, y por la otra vía (12), a un manómetro (13) para medir y controlar la presión arterial.

Con otro cateter terminado en una aguja del nº 18 (14) se canula la vena cava y este cateter va directamente al reservorio que contiene el medio de perfusión, estableciéndose un circuito cerrado.

Encima de la cámara de perfusión hay un impulsor de aire caliente (15), conectado a un termostato (16) para mantener constante la temperatura durante toda la perfusión.

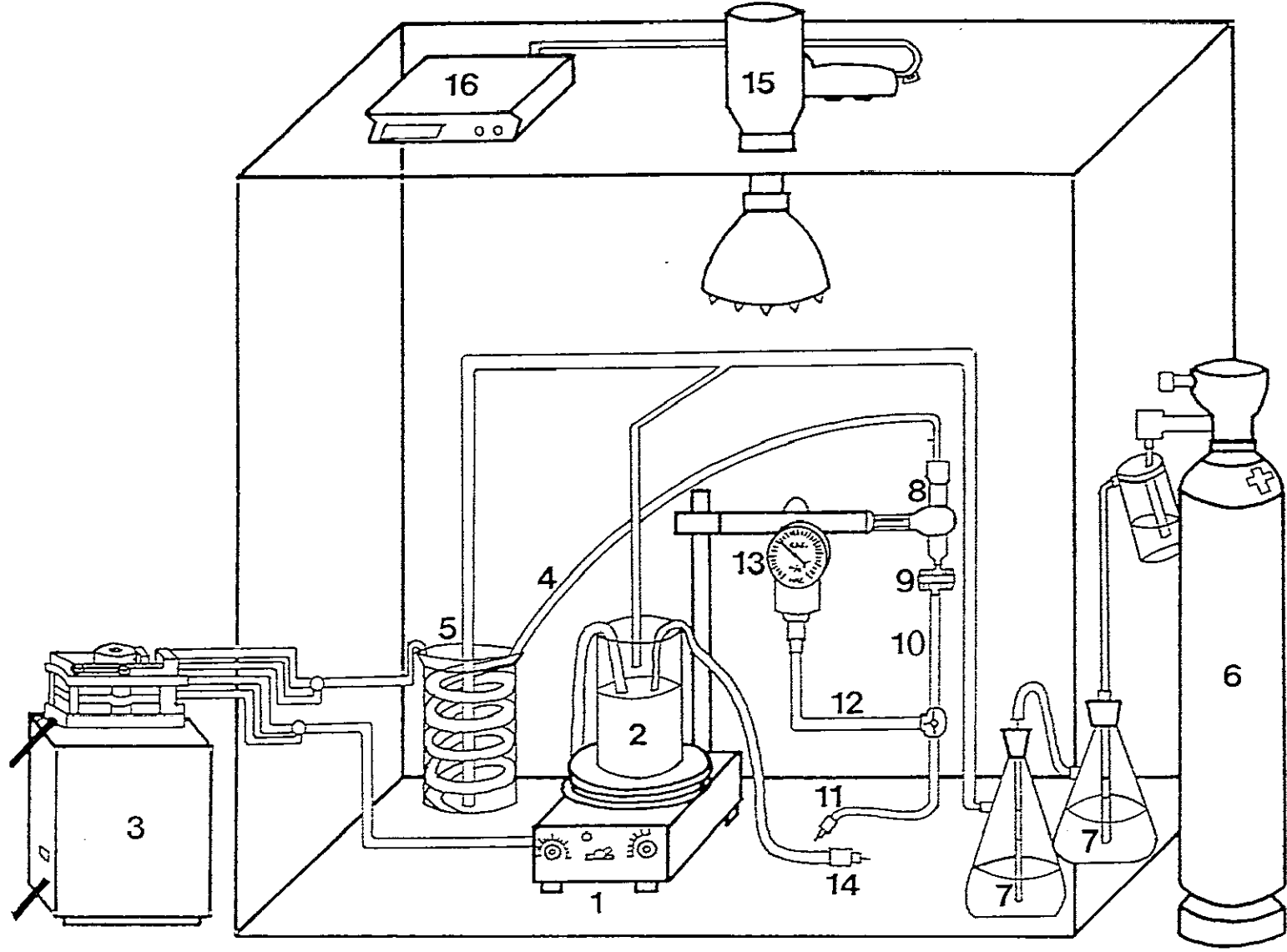


Figura 6. Cámara de perfusión de extremidades inferiores de ratas.

2.4.2 PREPARACION Y PERFUSION DE EXTREMIDADES INFERIORES DE RATA

La perfusión muscular se ha realizado según el método descrito por Ruderman y colaboradores (178), modificado por Dohm y colaboradores (179).

Tras anestesiar al animal con pentobarbital sódico intraperitonealmente (50 mg/kg), se realizó una incisión abdominal media. En la figura 7 se muestra un esquema del procedimiento quirúrgico para la preparación del hemicuerpo inferior de la rata. El colón descendente fue ligado (1) y posteriormente cortado. Los siguientes vasos fueron ligados: iliolumbar y deferente (2), renal izquierda (3), epigástrica superficial (4) e hipogástrica (5). También se ligaron las venas espermáticas internas (6) y los testículos fueron escindidos. Se procedió a separar cuidadosamente la aorta y la vena cava y, justo antes del origen de las venas iliolumbares se colocaron dos ligaduras sueltas, una alrededor de la aorta y otra alrededor de la cava (7,8). Seguidamente, alrededor de la aorta y de la vena cava, por debajo de las venas renales se colocó una ligadura (9,10) que fue fuertemente cerrada y el animal fue seccionado inmediatamente por encima de ella. El hemicuerpo del animal se transfirió a la cámara de perfusión (mantenida a 37°C) y se canularon aorta y cava (Fotografía 3). La perfusión se inició lo más rápidamente posible y la interrupción de la oxigenación del hemicuerpo fue inferior a 2 minutos desde la ligadura de la aorta hasta que se reinstauró el flujo. Las extremidades inferiores fueron perfundidas con 150 ml de tampón Krebs-Henseleit (1.2.3), conteniendo glucosa 5,5 mM, piruvato 0,15 mM, albúmina sérica bovina al 4% y 30% de eritocitos bovinos lavados (20-25% hematocrito). Después de un periodo de lavado de 50 ml, un volumen de 100 ml de perfusión fue reciclado y estuvo oxigenado durante toda la perfusión (Fotografía 4). El flujo se mantuvo a 12 ml/min y la presión del sistema estuvo entre 80-110 mm Hg. Se tomaron alícuotas del medio de perfusión cada 5 minutos para determinar el contenido de glucosa.

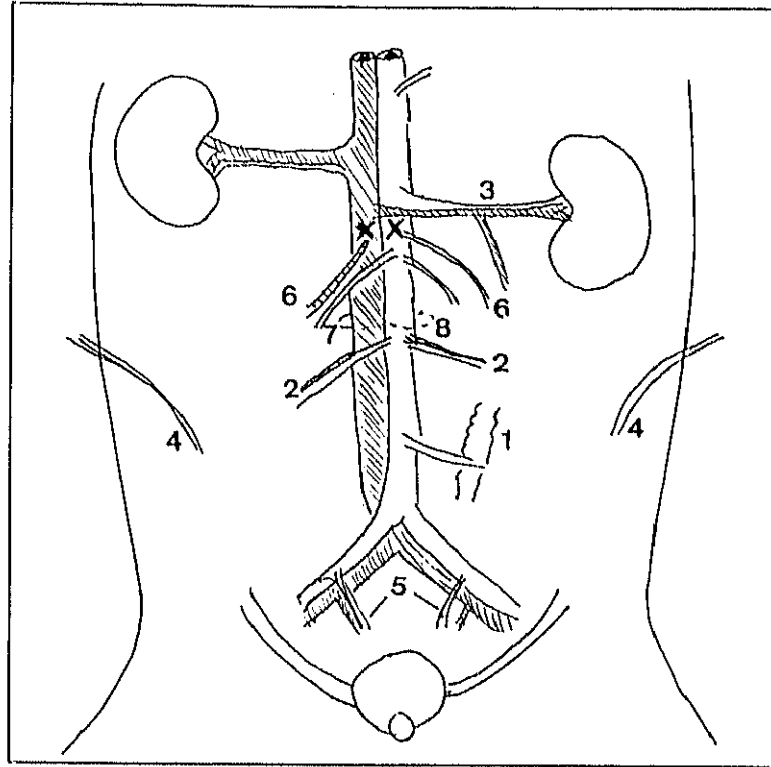


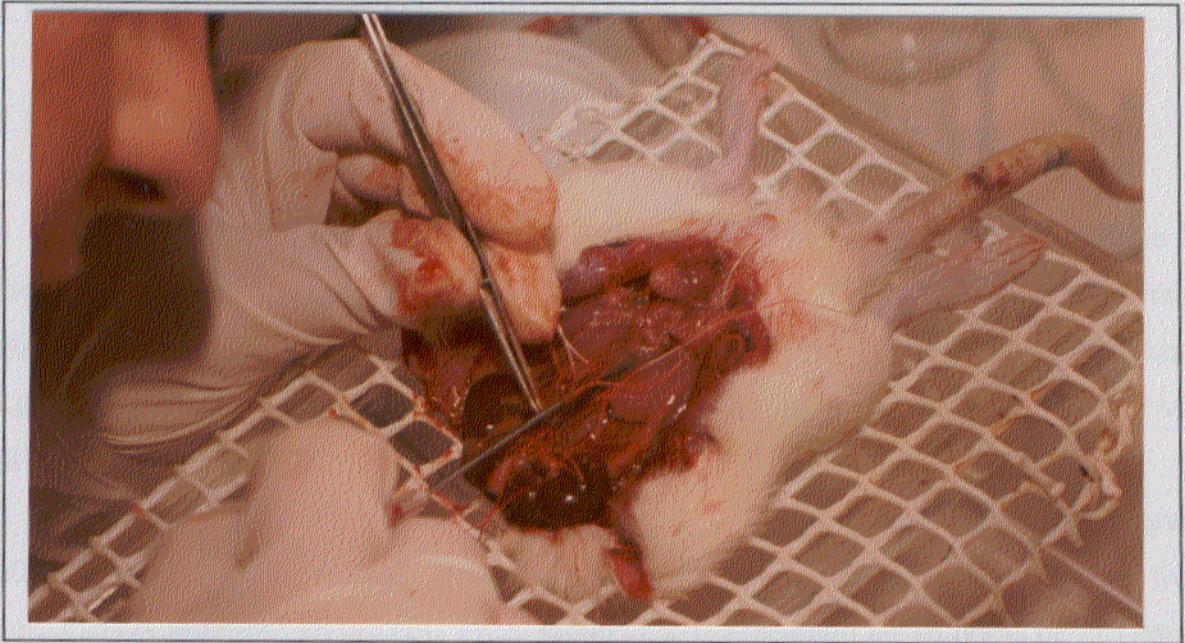
Figura 7. Cirugía de la rata antes de realizar la perfusión muscular.

2.4.3 CALCULO DE LA CAPTACION DE GLUCOSA POR LAS EXTREMIDADES INFERIORES

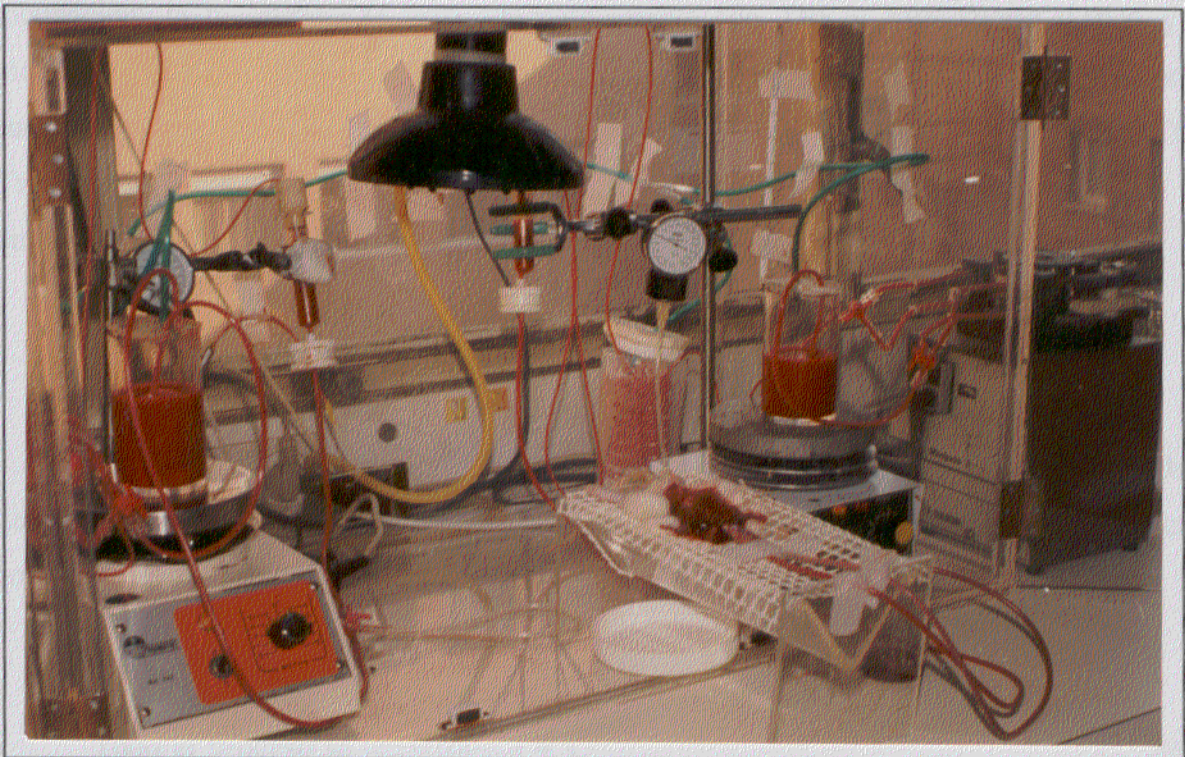
La captación de glucosa por el músculo se calculó determinando el aclaramiento fraccional de glucosa por el método de mínimos cuadrados y se expresó como μmol por gramo de tejido perfundido por hora.

$$\mu\text{mol/g/h} = \frac{\text{pendiente (mg/dl/min)}}{180 (\text{Pm glucosa}) \times \text{Peso rata} \times 17,2 \%} \times 60 \text{ min}$$

En esta fórmula se considera que la musculatura del hemicuerpo inferior representa un 17,2% del peso corporal total.



Fotografía 3. Detalle de la canulación de la aorta y de la vena cava.



Fotografía 4. Detalle global de la perfusión de extremidades inferiores.

2.5 ANALISIS DEL GLUCOTRANSPORTADOR GLUT4

2.5.1 CONTENIDO TOTAL DE GLUT4

Para análisis de Western-blot, el sobrenadante (obtenido del homogenado de los músculos gastrocnemius) conteniendo los transportadores de glucosa de membranas plasmáticas y las fracciones microsomales (50 μg de proteínas), se incubó con "cocktail" Laemly (1.2.10) durante 16 horas. Las proteínas se separaron por electroforesis SDS-PAGE (8%), según el método de Laemly (180).

Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 20 voltios durante 60 min, posteriormente dicha membrana fue bloqueada durante 2 horas con 5% de leche desnatada (Carnation) en tampón TRIS salino (1.2.11), seguido de 16 horas de incubación a 4°C con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de un anticuerpo policlonal de conejo, específico para un péptido de 12 aminoácidos de la región carboxi-terminal de GLUT4 (181). Tras este periodo de incubación, la membrana se lavó alternativamente con TBS y TBS-Tween 0,05% y se incubó en TBS con 5% de Carnation durante 2 horas con 10 μCi de ^{125}I -IgG de cabra contra suero de conejo. Seguidamente la membrana se lavó alternativamente con TBS y TBS-Tween y se expuso la autorradiografía. La banda obtenida correspondiente a GLUT4 fue densitometrada en un densitómetro MD 400 A.

2.5.2 TRANSLOCACION DE LA PROTEINA TRANSPORTADORA GLUT4

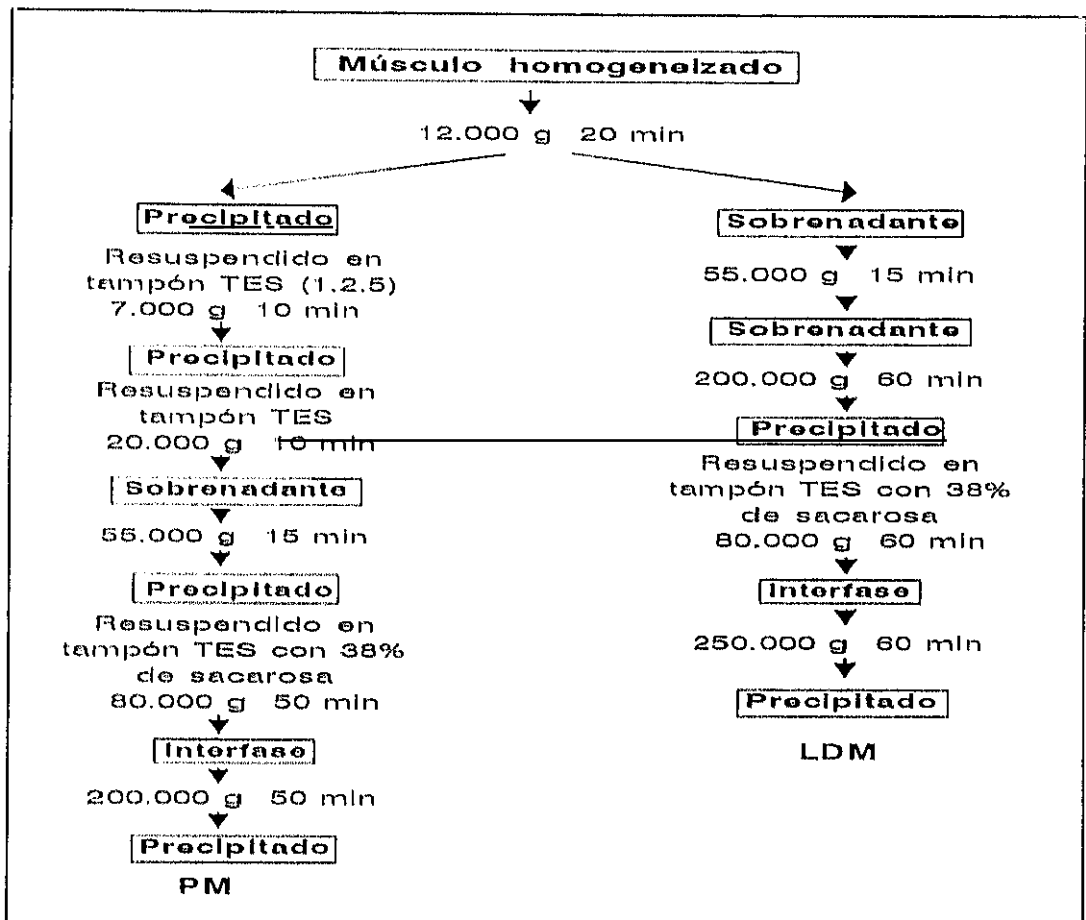
La separación de las membranas plasmáticas (PM) y de los microsomas de baja densidad (LDM) enriquecidas en GLUT4 se ha realizado según el método de Bader y colaboradores (182).

Procedimiento:

Todo el proceso se desarrolló a 4°C.

Los músculos gastrocnemius (2,5-3 g) fueron homogeneizados en 15 ml de tampón de solubilización (1.2.4) en un polytron (posición 2) cuatro veces durante 30 seg.

Seguidamente la separación de las fracciones se llevó a cabo por sucesivas centrifugaciones como se indica a continuación:



Una vez obtenidas ambas fracciones (PM y LDM) se llevaron a cabo los siguientes estudios:

- Determinación de proteínas por el método de Bradford (183).
- Caracterización enzimática de las fracciones subcelulares.
- Western blot.

2.5.2.1 CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LAS FRACCIONES

Para determinar la pureza de las fracciones se midieron marcadores enzimáticos en el homogenado y en cada fracción.

A. Actividad UDP-galactosiltransferasa

Realizada según el método de Fleischer y colaboradores (184). Un volumen equivalente a 20 μg de proteínas se incubó con tampón de análisis (1.2.6) a 37°C durante 1 hora. Tras este periodo de incubación, se paró la reacción en hielo con 17 μl de EDTA, pH 7,4. Por cromatografía de intercambio iónico (Cl⁻) se separó: UDP-galactosa que no había reaccionado (quedó unida a la columna), y se eluyó galactosa libre y ¹⁴C-lactosamina, que se contó en un contador beta.

A todos los tubos se les descontó la actividad enzimática no específica obtenida en ausencia de N-acetilglucosamina.

B. Actividad Na⁺/K⁺ ATPasa

La actividad enzimática Na⁺/K⁺ ATPasa se realizó según el método de Schimmel y colaboradores (185). Un volumen equivalente a 4 μg de proteína se incubó a 37°C con 0,8 ml de la mezcla de reacción (1.2.7) y en presencia o ausencia de ouabaina 1 mM. Se disparó la reacción con 10 μl de ATP 4 mM, incubándose a 37°C con agitación durante 30 min. Se paró la reacción en hielo con 50 μl de TCA al 50%. Tras añadir 1 ml de reactivo de color (1.2.8), el fósforo inorgánico fue cuantificado por medida de su absorbancia a 740 nm extrapolando en una curva patrón.

A todos los tubos se les descontó la actividad enzimática no específica obtenida en ausencia de ouabaina.

2.5.2.2 WESTERN-BLOT

Para análisis de Western-blot, 9 μg de proteínas de las fracciones PM y LDM se incubaron con "cocktail" Laemly (1.2.10), conteniendo 5% de DTT, durante 16 horas. Las proteínas se separaron por electroforesis SDS-PAGE (8%), según el método de Laemly (180).

El proceso de determinación de GLUT4 en ambas fracciones fue igual que en el apartado anterior (2.5.1), pero como segundo anticuerpo se usó una IgG de burro anticonejo marcado con peroxidasa (1:2000). Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente la membrana se reveló con el sistema ECL, se expuso la placa sensible a quimioluminiscencia durante 5 segundos, y se densitómetró la banda correspondiente a GLUT4.

2.6 PURIFICACION PARCIAL DE LOS RECEPTORES DE INSULINA

Básicamente el procedimiento seguido consta de dos partes:

2.6.1 ACOPLAMIENTO DE LA LECTINA A AGAROSA ACTIVADA CON CNBr (WGA-Sefarosa).

Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente.

Procedimiento:

La agarosa una vez hidratada se lava a vacío con HCl 1 mM (200 ml/ 1 mg de agarosa). La aglutinina de germen de trigo se disuelve en NaHCO_3 0,1 M/ NaCl 0,5 M, pH 8,8 (0,7 ml/ 1 mg de lectina).

La agarosa se pone en contacto con la lectina en proporción de 1 g/ 7,15 mg, respectivamente. La mezcla se mantiene en rotación durante 2 horas, después de lo cual se lava dos veces el exceso de lectina con NaHCO_3 0,1 M/ NaCl 0,5 M, pH 8,8. A continuación, se bloquean los posibles grupos activos restantes por tratamiento con 20 ml de glicina 0,2 M, pH 8,0, durante 2 h y en rotación.

Para finalizar, el gel se lava tres veces en vacío, utilizando de forma alterna las soluciones:

a) CH_3COOH 0,1 M/ NaOH 0,5 M, pH 4

b) NaHCO_3 0,1 M/ NaCl 0,5 M, pH 8,3

Por último se almacena el gel a 4°C en tampón WGA (1.2.13), concluyendo el proceso de acoplamiento.

2.6.2 RECEPTORES DE INSULINA DE MUSCULO ESQUELETICO PARCIALMENTE PURIFICADOS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.

El método seguido se basó en el de Hedo JA y col (186). Todo el proceso se desarrolló a 4°C.

Procedimiento:

Los dos músculos gastronemius fueron homogeneizados con tampón de solubilización (1.2.12) en proporción 3,5 ml por gramo de músculo utilizando un polytron (posición 6) durante 30 sg, con descanso de 30 sg durante 3 veces. El homogeneizado resultante se centrifugó a 10.000 g durante 20 min, se decantó el sobrenadante y se solubilizó durante 60 min con agitación. A continuación, para eliminar el material insoluble se centrifugó a 100.000 g, durante 90 min. El sobrenadante se diluyó cinco veces en tampón WGA (1.2.13), y se incubó rotando toda la noche con 4 ml de WGA-Sefarosa. Tras lavar con 40 ml de tampón WGA, el receptor de insulina se eluyó con N-acetil glucosamina 0,3 M en tampón WGA.

En las preparaciones que contenían los receptores purificados se determinó:

- Determinación de proteínas por el método de Bradford.
- Unión específica de ^{125}I -insulina.
- Actividad tirosina quinasa: Autofosforilación del receptor y fosforilación de un sustrato exógeno por el receptor de insulina (en ausencia y presencia de insulina).

2.6.2.1 UNION DE LA ^{125}I -INSULINA A LOS RECEPTORES

En preparaciones del receptor parcialmente purificado correspondientes a 15 μg de proteínas de receptor de músculo se midió la unión de insulina siguiendo el método de Caro JF y col (187).

Procedimiento:

Todos los pasos se realizaron a 4°C.

Un determinado volumen de receptor (15 μg de proteínas), se incubó durante 16 h con 25 μl ^{125}I -insulina (10^{-10} M) y concentraciones crecientes de insulina fría (10^{-10} - 10^{-6} M). La separación de la insulina unida al receptor, de la insulina libre, se realizó por precipitación de la fracción unida con 500 μl de PEG al 25% (p/p) usando como proteína transportadora 500 μl de gamma-globulina humana al 0,1% en tampón fosfatos (1.2.14); tras 15 min de incubación, se centrifugó a 4.000 g, durante 45 min. Después de aspirar el sobrenadante y para disminuir la unión inespecífica se lavó el precipitado con 1 ml de PEG al 12,5% y se centrifugó a 4.000 g, 30 min. Nuevamente se aspiró el sobrenadante y se contó el precipitado en un contador gamma. A todos los tubos se les descontó la unión inespecífica obtenida en presencia de insulina 10^{-6} M. La afinidad entre el receptor y la insulina, se calculó como la concentración de la hormona necesaria para desplazar el 50% de la unión específica (ED_{50}), y la máxima capacidad de unión de los receptores de alta afinidad (B_1 max) y de baja afinidad (B_2 max), se analizaron mediante la representación de Scatchard (188).

Se determinó la degradación de la insulina por precipitación con TCA, siendo inferior al 10% en estas condiciones de ensayo.

2.6.2.2 AUTOFOSFORILACION DEL RECEPTOR DE INSULINA.

En receptores de músculo parcialmente purificados se midió la autofosforilación de la subunidad β del receptor de insulina en ausencia y presencia de insulina, según Grunberger G y col (189).

Procedimiento:

Todas las incubaciones y centrifugaciones se realizaron a 4°C.

Un determinado volumen correspondiente a 15 μg de receptor de músculo fue incubado 16 h en ausencia y presencia de insulina 10^{-7} M. La reacción de fosforilación comenzó con la adición de 50 μl de "cocktail" de autofosforilación (1.2.15). Después de incubar 1 h, se añadió 150 μl de tampón para detener la reacción (1.2.16), 10 μl de anticuerpo monoclonal antirreceptor de insulina (AB_3) y 15 μl de proteína A-agarosa acoplada con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón. La mezcla se incubó 16 h, centrifugándose posteriormente a 2.500 g, 15 min. Seguidamente, el inmunoprecipitado obtenido se lavó 3 veces, primero con 1 ml de tampón WGA, después con 1 ml de NaCl 0,5 M en tampón WGA, y por último con 1 ml de Hepes 50 mM con SDS al 0,01%. El precipitado obtenido se resuspendió con 100 μl de "cocktail" Laemly (1.2.10) y 100 μl de tampón TRIS-glicina electroforesis (1.2.9), se hirvió 5 min y se centrifugó a 4.000 g, 30 min. El sobrenadante resultante de esta centrifugación se sometió a electroforesis en geles de SDS-Poliacrilamida (7,5%). La subunidad β del receptor de insulina se localizó por autorradiografía, y su peso molecular (P_m) se determinó por comparación con proteínas de P_m conocido sometidas a electroforesis en el mismo gel. La intensidad de la banda fosforilada se cuantificó por densitometría de la autorradiografía obtenida.

2.6.2.3 FOSFORILACION DE UN SUSTRATO EXOGENO POR EL RECEPTOR DE INSULINA

En receptores de insulina de músculo parcialmente purificados se determinó la capacidad de fosforilar un sustrato exógeno, siguiendo el método de Grunberger G y col (189). Para este estudio se utilizó el sustrato Poli Glu4-Tyr1.

Procedimiento:

Mientras no se mencione lo contrario, todo el proceso se desarrolló a temperatura ambiente.

Alícuotas correspondientes a 15 μg de proteínas de receptor de insulina fueron

incubadas con insulina 10^{-7} M o tampón WGA durante 16 h a 4°C . Tras este periodo de incubación se añadió $80\ \mu\text{l}$ de tampón de análisis para fosforilación exógena (1.2.17) y $20\ \mu\text{l}$ de "cocktail" fosforilación exógena (1.2.18) y fue incubado nuevamente durante 30 min; se tomaron $100\ \mu\text{l}$ de los tubos y se aplicaron sobre papel de filtro Wathman 3M de 2,4 cm de diámetro. Se dejó absorber y se sumergieron en TCA al 10% con pirofosfato sódico 10 mM, para detener la reacción. Transcurridos 10 min se procedió a lavar de la misma forma, 5 veces más, y una última con etanol al 95%. Una vez seco el filtro se contó, en contador beta, con 3,5 ml de líquido de centelleo.

2.7 ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS

El análisis estadístico de los resultados fue realizado mediante los programas Sigma Horus 90 e Instat 90-93.

Los resultados se expresan en forma de valores medios \pm error estándar de la media. Se comparó la homogeneidad de más de dos grupos utilizando ANOVA completado con el test de Newman-Keuls. Para comprobar la homogeneidad de dos grupos se utilizó la t de Student. El nivel de significación se estableció cuando el coeficiente de probabilidad (p) obtenido fue menor de 0,05, según Snedecor GW y Cochran WG (190).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. EFECTO AGUDO DE LA GLICLACIDA SOBRE LA CAPTACION DE GLUCOSA EN EL MUSCULO ESQUELETICO DE RATAS NORMALES.

Como decíamos en la introducción, la gliclacida es una sulfonilurea de segunda generación muy usada en el tratamiento de pacientes con diabetes mellitus no insulino dependiente. Además de su acción sobre las células β pancreáticas (78) estimulando la secreción de insulina, diversos estudios han propuesto mecanismos extrapancreáticos para estas drogas (102-104).

El músculo esquelético es el tejido principal en la utilización de la glucosa estimulado por insulina (191), por lo que el estudio de los efectos de la gliclacida sobre el músculo esquelético es de especial interés.

En este modelo de ratas normales quisimos estudiar los posibles efectos agudos de la gliclacida en el músculo esquelético y su mecanismo de acción. Para ello, utilizamos la técnica de perfusión de extremidades inferiores, puesto que con este sistema se descarta la posible acción de esta droga sobre las células β pancreáticas al eliminarse el páncreas.

Las ratas normales (180-200 g) presentaron unos niveles de glucemia en ayunas de 100 ± 5 mg/dl y post-prandiales de 109 ± 3 . La concentración de insulina sérica en ayunas fue de $0,7 \pm 0,1$ ng/ml. Los valores medios de la captación basal de glucosa entre los diferentes protocolos ensayados fueron similares (mínimo: $2,7 \pm 0,4$, máximo: $4,2 \pm 0,6$ μ mol/g/h). En este sistema de perfusión el consumo de glucosa por los eritrocitos bovinos oxigenados fue indetectable durante el tiempo en el que las ratas fueron perfundidas, por tanto, el aclaramiento fraccional de glucosa en el medio de perfusión en situación basal debe ser atribuido a la captación de glucosa por los tejidos presentes en las preparaciones perfundidas. La captación de glucosa no se modificó con el DMSO (0,25%) utilizado para disolver la gliclacida.

1.1 EFECTO DE LA GLICLACIDA SOBRE LA CAPTACION DE GLUCOSA POR EL MUSCULO ESQUELETICO.

Para estudiar el efecto agudo de la gliclacida sobre el músculo esquelético se añadieron diferentes concentraciones de esta droga en el medio de perfusión. La gliclacida se añadió después de los 30 minutos de perfusión basal.

La gliclacida a la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ no indujo un incremento en la captación muscular de glucosa (Tabla III), mientras que a 10 $\mu\text{g/ml}$ ya se observó un incremento ($p < 0,05$) en el aclaramiento fraccional de la glucosa en el medio de perfusión.

Tabla III. Captación de glucosa por el músculo esquelético en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de gliclacida. Los datos se muestran como media \pm EEM. El número de determinaciones para cada concentración de gliclacida aparece entre paréntesis.

GLICLACIDA $\mu\text{g/ml}$	BASAL $\mu\text{mol/g/h}$	ESTIMULO $\mu\text{mol/g/h}$	INCREMENTO $\mu\text{mol/g/h}$	p vs basal
5 (n=6)	3,3 \pm 0,5	3,8 \pm 0,4	0,5 \pm 0,3	n.s.
10 (n=4)	2,8 \pm 0,5	3,8 \pm 0,6	1,0 \pm 0,2	<0,05
25 (n=6)	3,3 \pm 0,4	4,9 \pm 0,6	1,6 \pm 0,4	<0,05
50 (n=5)	2,7 \pm 0,4	4,6 \pm 0,8	1,9 \pm 0,5	<0,05
100 (n=8)	3,3 \pm 0,4	6,1 \pm 0,4	2,8 \pm 0,4	<0,001
300 (n=6)	3,8 \pm 0,7	7,4 \pm 0,6	3,6 \pm 0,7	<0,01
700 (n=11)	4,0 \pm 0,4	7,7 \pm 0,4	3,7 \pm 0,6	<0,001
1000 (n=6)	4,2 \pm 0,6	8,0 \pm 0,4	3,8 \pm 0,4	<0,01

El incremento de la captación de glucosa sobre el valor basal inducido por gliclacida fue dosis-dependiente (Figura 8) alcanzando un "plateau" a la concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$; la droga a las concentraciones de 300, 700 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ produjo un aumento de la captación de glucosa de aproximadamente dos veces respecto del valor basal. La mitad del máximo efecto se obtuvo entre las concentraciones de 25 y 50 $\mu\text{g/ml}$ de gliclacida.

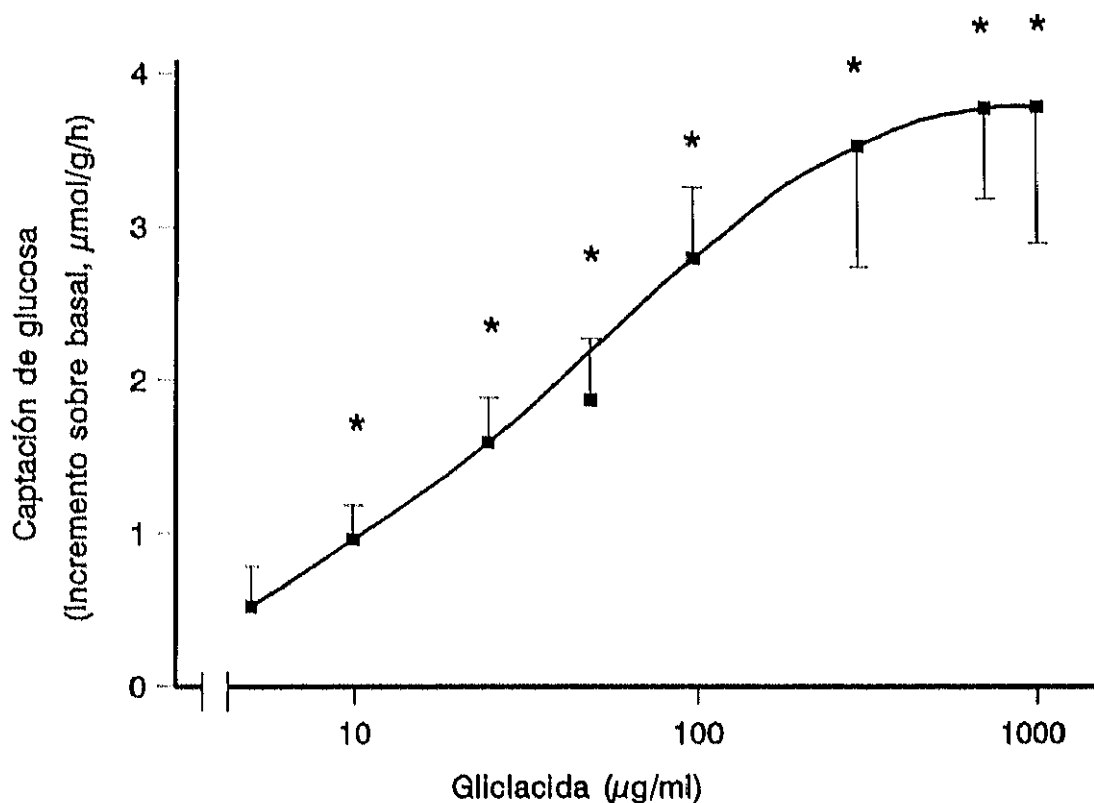


Figura 8. Curva dosis-respuesta de gliclacida sobre la captación de glucosa por el músculo esquelético. Tras 30 minutos de captación basal, diferentes concentraciones de gliclacida se añadieron en el medio de perfusión, manteniéndose otros 30 min. Las concentraciones de gliclacida estudiadas fueron 5 (n=6), 10 (n=4), 25 (n=6), 50 (n=5), 100 (n=8), 300 (n=6), 700 (n=11) y 1000 (n=6) $\mu\text{g/ml}$. Media \pm EEM; * $p < 0,05$ vs captación basal de glucosa.

En la figura 9 se puede observar que tras la adición de glielacida en el minuto 30, ya a los 5 minutos se aprecia una mayor disminución de la concentración de glucosa en el medio de perfusión respecto al valor basal (aumenta la pendiente de la recta). El efecto de la glielacida sobre la captación de glucosa fue, por tanto, inmediato y se mantuvo lineal a lo largo de los 30 minutos de ensayo ($r = -0,90$ a $-1,0$).

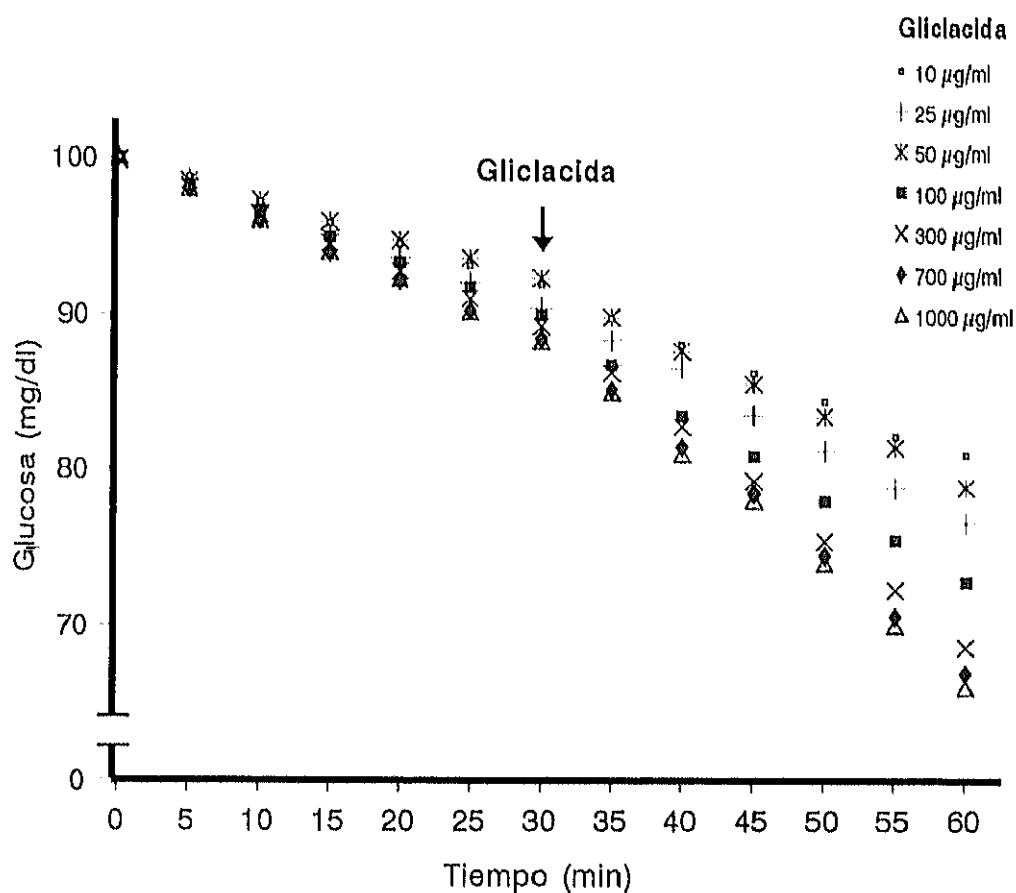


Figura 9. Niveles de glucosa en el medio de perfusión con diferentes concentraciones de glielacida. La perfusión de extremidades inferiores se mantuvo durante 60 min, se tomaron alícuotas del medio de perfusión cada 5 min para analizar el contenido de glucosa.

Después de la adición de glielacida, la presión arterial en el sistema fue de $85 \pm 5,8$ mm Hg, similar a la presión obtenida en situación basal $80 \pm 4,5$ mm Hg.

1.2 CAPTACION DE GLUCOSA EN PRESENCIA DE INSULINA

Una vez visto que la gliclacida tenía un efecto directo (no requiere la presencia de insulina) e inmediato sobre la utilización de la glucosa por el músculo esquelético, se ensayaron dos concentraciones diferentes de insulina en el medio de perfusión. Tras 30 min de perfusión basal se añadió insulina 10^{-9} M en el medio de perfusión manteniéndose la perfusión otros 30 min, y en el minuto 60 se añadió insulina 10^{-7} M junto con glucosa para alcanzar una concentración similar a la inicial (100 mg/dl).

La insulina a la concentración de 10^{-9} M produjo un incremento sobre la captación de glucosa de 2,5 veces, mientras que la insulina a concentraciones suprafiológicas (10^{-7} M) produjo un aumento de 3,7 veces en el aclaramiento fraccional de la glucosa (Tabla IV). El incremento producido por insulina 10^{-9} M fue menor ($p < 0,05$) que el obtenido con insulina 10^{-7} M.

Tabla IV. Captación de glucosa estimulada por insulina en el músculo esquelético. Los datos se expresan como el valor medio \pm EEM de 11 determinaciones para cada grupo.

INSULINA (M)	BASAL $\mu\text{mol/g/h}$	ESTIMULO $\mu\text{mol/g/h}$	INCREMENTO $\mu\text{mol/g/h}$	p vs basal
10^{-9}	$3,6 \pm 0,2$	$9,2 \pm 0,6$	$5,6 \pm 0,7$	$< 0,001$
10^{-7}	$3,6 \pm 0,3$	$13,4 \pm 0,9$	$9,8 \pm 1,0$	$< 0,001$

Cuando comparamos el incremento producido por gliclacida y el incremento inducido por insulina sobre la captación basal de glucosa en el músculo esquelético, observamos (Figura 10) que el efecto producido por gliclacida sobre la captación de glucosa a las concentraciones de 300, 700 y 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no fue diferente del obtenido con insulina 10^{-9} M, pero fue menor que el alcanzado con insulina 10^{-7} M.

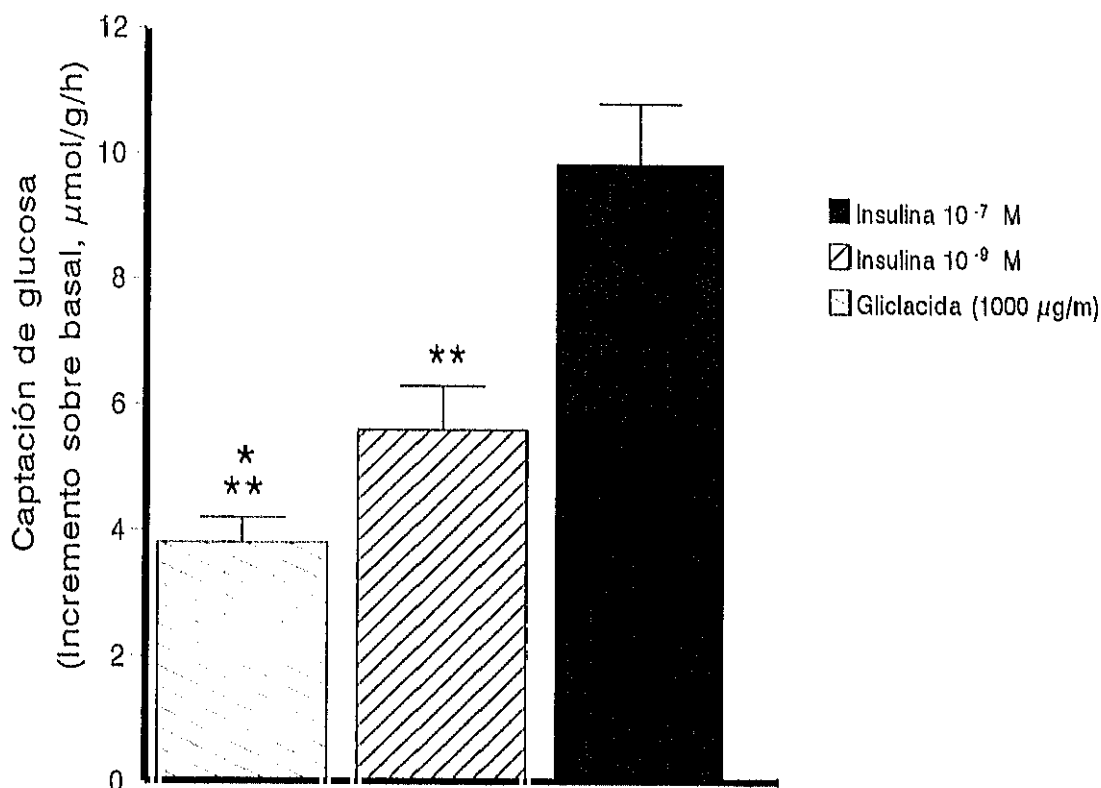


Figura 10. Efecto de la gliclacida y la insulina sobre la captación de glucosa por las extremidades inferiores. Tras 30 min de captación basal, insulina (10^{-9} M) se añadió en el medio de perfusión y en el minuto 60 se añadió insulina (10^{-7} M) y glucosa, manteniéndose la perfusión durante otros 30 min. Los datos representan la media \pm EEM de 11 experimentos realizados con cada concentración de insulina y de 6 para gliclacida a la concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, * n.s. (no significativo) vs insulina 10^{-9} M; ** $p < 0,05$ vs insulina 10^{-7} M.

1.3 EFECTO DE LA GLICLACIDA COMBINADA CON LA INSULINA SOBRE LA CAPTACION DE GLUCOSA POR EL MUSCULO ESQUELETICO.

Diversos grupos de investigadores han observado que las sulfonilureas aumentan la utilización de la glucosa mediada por insulina en el músculo esquelético (106) y en células musculares cultivadas (107,108).

Para conocer el efecto de ambas drogas sobre la captación de glucosa por el músculo esquelético, gliclacida a diferentes concentraciones (50, 100 y 300 $\mu\text{g/ml}$) e insulina a la concentración de 10^{-9} M se añadieron conjuntamente en el medio de perfusión en el minuto 30.

En la Tabla V se muestra el efecto producido por la combinación de gliclacida e insulina sobre la captación de glucosa por el músculo esquelético.

Tabla V. Captación de glucosa por las extremidades inferiores en ausencia y presencia de gliclacida combinada con insulina. Los datos se expresan como el valor medio \pm EEM. El número de veces aparece entre paréntesis.

INSULINA 10^{-9} M + GLICLACIDA $\mu\text{g/ml}$	BASAL $\mu\text{mol/g/h}$	ESTIMULO $\mu\text{mol/g/h}$	INCREMENTO $\mu\text{mol/g/h}$	p vs basal
50 (n=7)	4,1 \pm 0,2	10,0 \pm 0,4	5,9 \pm 0,5	< 0,001
100 (n=7)	3,6 \pm 0,3	11,2 \pm 0,3	7,6 \pm 0,3	< 0,001
300 (n=8)	4,0 \pm 0,3	11,7 \pm 0,5	7,7 \pm 0,6	< 0,001

La combinación de glielacida a la concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$ y de insulina 10^{-9} M (Figura 11) produjo un incremento sobre la captación de glucosa por las extremidades inferior mayor ($p < 0,05$) que el inducido por concentraciones fisiológicas de insulina (10^{-9} M), y no fue diferente del obtenido con concentraciones suprafisiológicas de insulina (10^{-7} M).

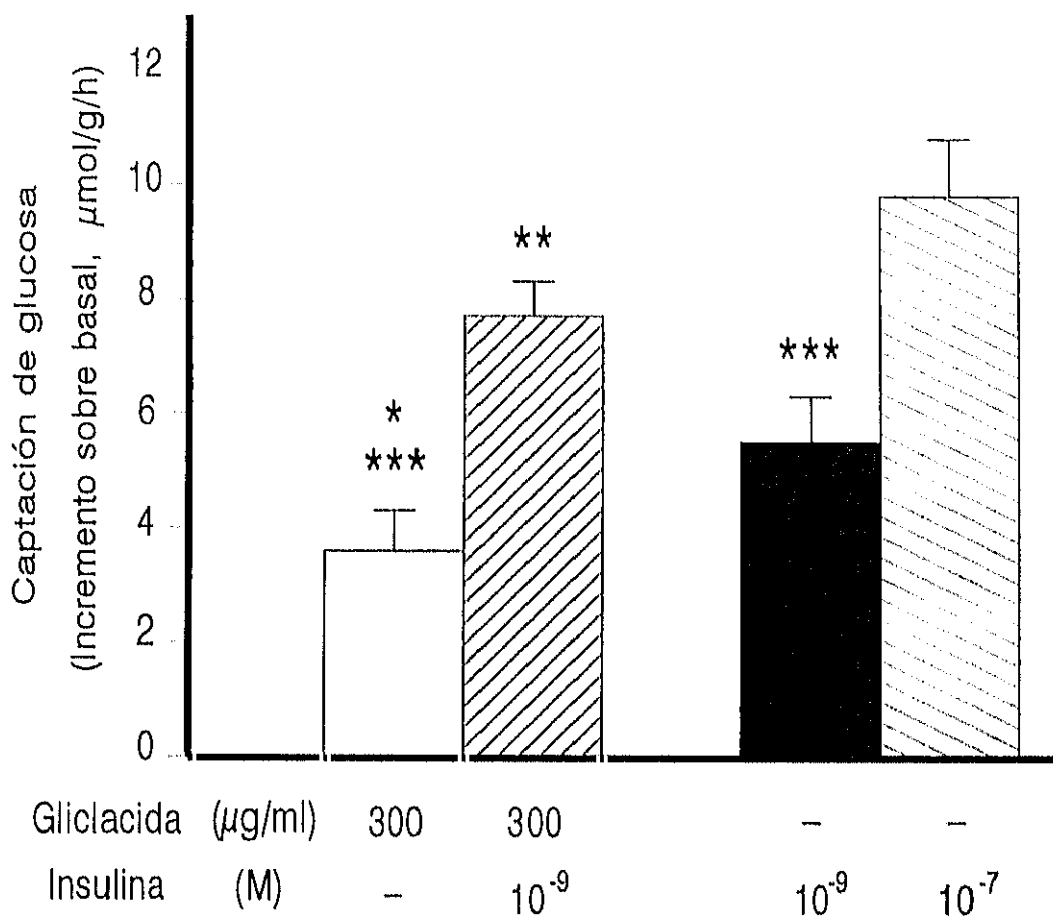


Figura 11. Efecto aditivo de la glielacida sobre la captación de glucosa estimulada por insulina. Los resultados representan la media \pm EEM de 6 experimentos realizados con glielacida (300 $\mu\text{g/ml}$), 8 con glielacida (300 $\mu\text{g/ml}$) más insulina 10^{-9} M y 11 para cada concentración de insulina. * $p < 0,05$ vs glielacida (300 $\mu\text{g/ml}$) combinada con insulina 10^{-9} M; ** $p < 0,05$ vs concentraciones fisiológicas de insulina (10^{-9} M); *** $p < 0,05$ vs concentraciones suprafisiológicas de insulina (10^{-7} M).


Sin embargo las captaciones de glucosa producidas por las concentraciones 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de gliclacida, aunque fueron ligeramente superiores a la captación de glucosa inducida por insulina 10^{-9} M, no alcanzaron diferencias significativas.

Para las tres concentraciones ensayadas (50, 100 y 300 $\mu\text{g/ml}$), el efecto de la gliclacida más insulina 10^{-9} M fue mayor ($p < 0,05$) que el obtenido con las correspondientes concentraciones de gliclacida sola (Tabla VI).

Tabla VI. Captación de glucosa por las extremidades inferiores de ratas producidas por gliclacida, gliclacida más insulina e insulina. Diferencias entre los grupos.

	p vs Insulina 10^{-9} M	p vs Insulina 10^{-7} M
GLICLACIDA		
50 $\mu\text{g/ml}$	< 0,001	< 0,001
100 $\mu\text{g/ml}$	< 0,001	< 0,001
300 $\mu\text{g/ml}$	n.s.	< 0,001
GLIC+INS 10^{-9} M		
50 $\mu\text{g/ml}$	n.s.	< 0,01
100 $\mu\text{g/ml}$	n.s.	< 0,05
300 $\mu\text{g/ml}$	< 0,05	n.s.

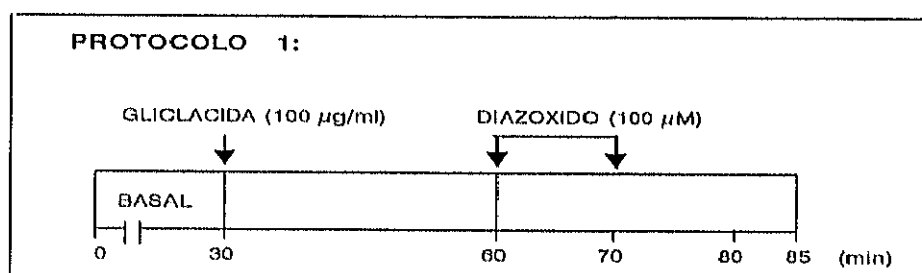
 Significativamente inferior

 Significativamente superior

1.4 EFECTO DEL DIAZOXIDO SOBRE LA CAPTACION DE GLUCOSA ESTIMULADA POR GLICLACIDA EN EL MUSCULO ESQUELETICO.

El diazóxido es una sulfonamida que ha sido usada como agente hipotensor, y como tratamiento en las hipoglucemias severas. El diazóxido actúa abriendo los canales de K^+ ATP-dependientes, provocando hiperpolarización de la célula beta e inhibiendo la secreción de insulina.

Se ha referido que las sulfonilureas y el diazóxido ejercen efectos opuestos sobre los canales de K^+ dependientes de ATP en las células β pancreáticas (192,193). Por otro lado se ha demostrado la existencia de estos canales en diferentes tejidos, entre ellos en el músculo esquelético (133). Para ver si el mecanismo de acción de la gliclacida en el músculo esquelético era el mismo que en las células beta pancreáticas, se ensayaron dos protocolos de estudio con gliclacida y diazóxido. La concentración de diazóxido empleada fue de $100 \mu M$, a la que se sabe que prácticamente todos los canales de K^+ dependientes de ATP permanecen abiertos en la célula.



El incremento de la captación de glucosa sobre el valor basal inducida por $100 \mu g/ml$ de gliclacida ($3,1 \pm 0,4 \mu mol/g/h$) fue similar ($p > 0,05$) al obtenido en los ensayos de perfusión de extremidades inferiores (apartado 4.1, Tabla III) cuando esta misma concentración de gliclacida ($100 \mu g/ml$) se añadía al medio de perfusión ($2,8 \pm 0,4 \mu mol/g/h$). Sin embargo, fue reducido a $0,5 \pm 0,2 \mu mol/g/h$ ($p < 0,05$) cuando el diazóxido se añadió posteriormente en el medio de perfusión (Figura 12).

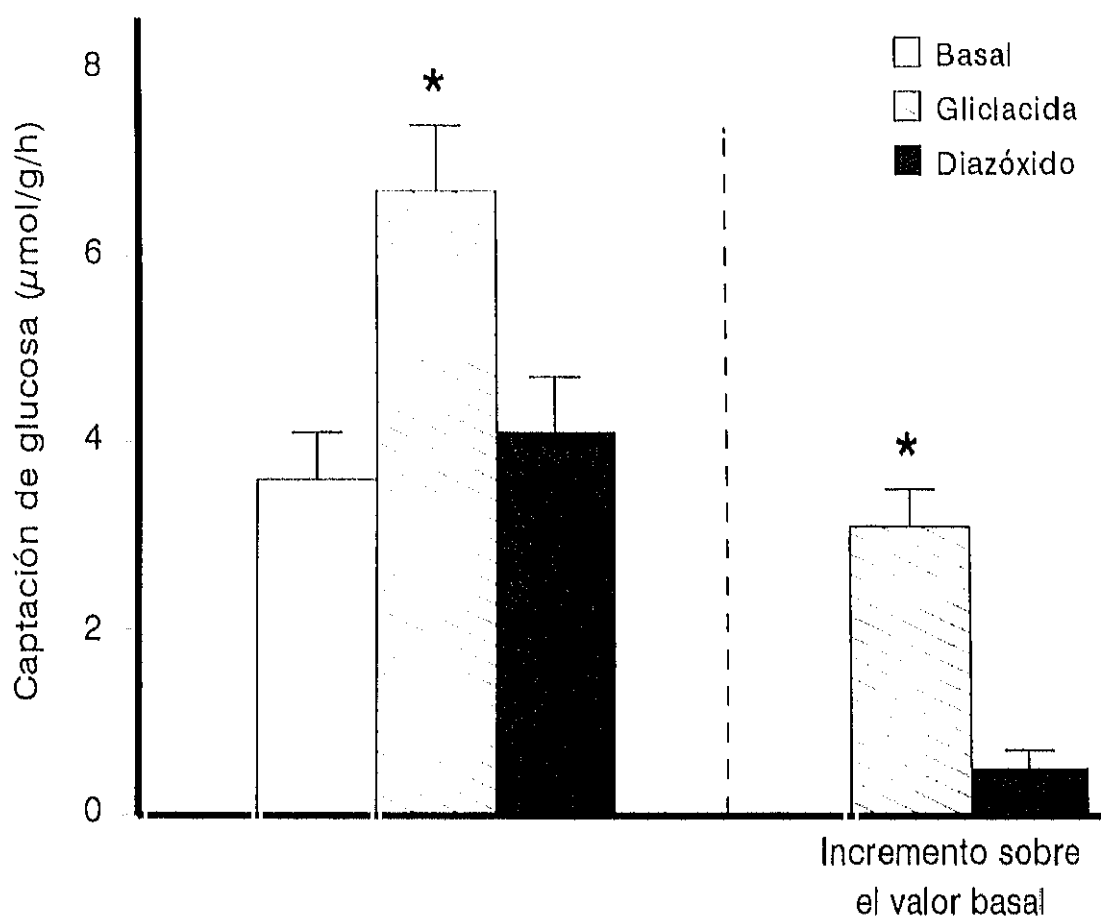
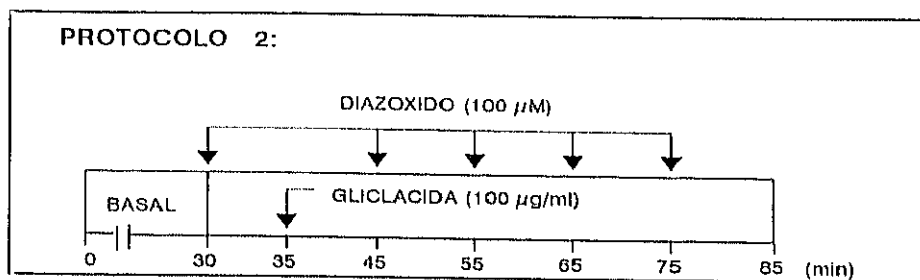


Figura 12. Efecto inhibitorio del diazóxido sobre la captación de glucosa inducida por gliclacida en el músculo esquelético. Las extremidades inferiores fueron perfundidas durante 85 min; tras 30 min de captación basal se añadió gliclacida (100 µg/ml) y 30 min después diazóxido (100 µM). Media ± EEM de 7 experimentos; * $p < 0,05$ vs basal y vs diazóxido.

Una vez visto que el diazóxido revertía el efecto estimulador de la gliclacida sobre la captación de glucosa por el músculo esquelético, diseñamos otro experimento, en el cual ambas drogas se añadían a la vez en el medio de perfusión. De esta manera podríamos ver si el diazóxido bloqueaba o impedía la acción de la gliclacida sobre la captación de glucosa en la perfusión de extremidades inferiores de las ratas.



El efecto estimulador de la gliclacida sobre la captación de glucosa por el músculo esquelético disminuyó aproximadamente en un 80% cuando el diazóxido se añadió en el medio de perfusión antes que la sulfonilurea (Figura 13).

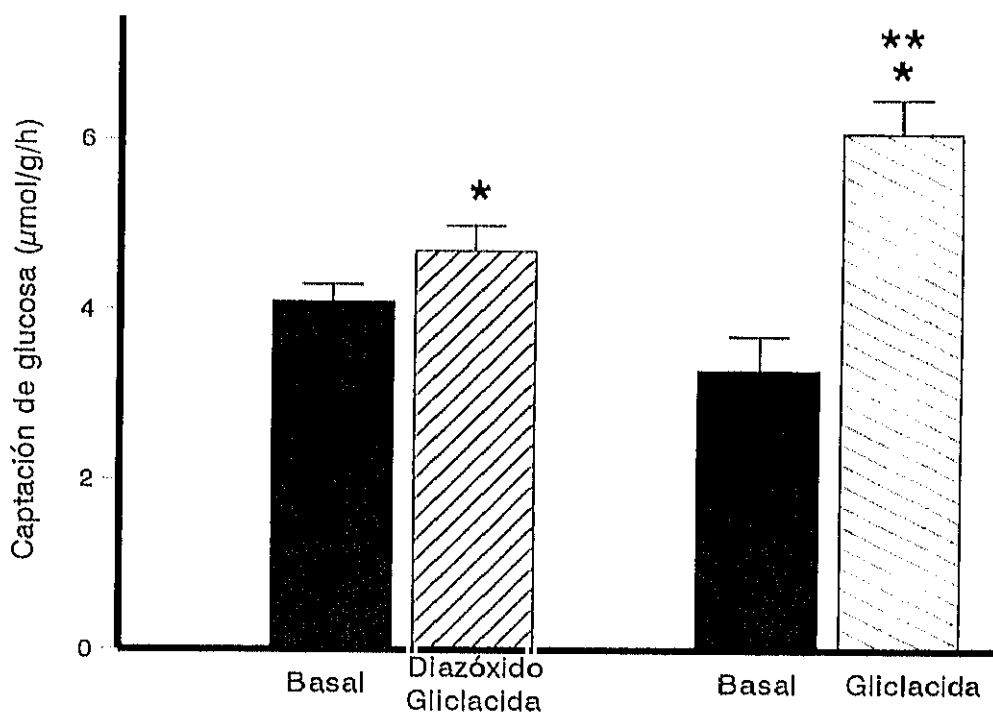


Figura 13. Captación de glucosa por las extremidades inferiores en ausencia y presencia de diazóxido combinado con gliclacida o gliclacida sola. El diazóxido (100 µM) se añadió cada 10 minutos en el medio de perfusión, mientras que la gliclacida (100 µg/ml) se añadió en el min 35. Los resultados representan la media ± EEM de 8 experimentos. * $p < 0,05$ vs basal; ** $p < 0,05$ vs diazóxido + gliclacida.

La captación basal de glucosa no se modificó en presencia del diazóxido (Tabla VII), tampoco se modificó la presión arterial manteniéndose a 100 mm Hg durante el tiempo que duró la perfusión. El efecto inhibitorio del diazóxido sobre la captación de glucosa inducida por gliclacida fue transitorio, durando aproximadamente 10 minutos.

Tabla VII. Efecto del diazóxido sobre la captación basal de glucosa y estimulada por gliclacida en el músculo esquelético. Los datos se muestran como media \pm EEM; el número de ensayos aparece entre paréntesis.

	BASAL $\mu\text{mol/g/h}$	ESTIMULO $\mu\text{mol/g/h}$	INCREMENTO $\mu\text{mol/g/h}$	p vs basal
GLICLACIDA 100 $\mu\text{g/ml}$ (n=8)	3,3 \pm 0,4	6,1 \pm 0,4	2,8 \pm 0,4	< 0,001
GLICLACIDA 100 $\mu\text{g/ml}$ + DIAZOXIDO 100 μM (n=8)	4,1 \pm 0,3	4,7 \pm 0,3	0,6 \pm 0,2	< 0,05
DIAZOXIDO 100 μM (n=4)	3,8 \pm 0,4	4,2 \pm 0,3	0,4 \pm 0,2	n.s.

1.5 EFECTO DEL DIAZOXIDO SOBRE LA CAPTACION DE GLUCOSA ESTIMULADA POR INSULINA EN EL MUSCULO ESQUELETICO.

Una vez visto que el diazóxido impedía que la gliclacida estimulara la captación de glucosa por el músculo esquelético, estudiamos el efecto de la insulina sobre la captación de glucosa en presencia de diazóxido. Aunque el mecanismo de acción de la insulina se sabe que comienza por la interacción de la insulina con su receptor de membrana, diseñamos este experimento para descartar que el diazóxido, de alguna manera pudiera influir sobre la captación de glucosa y conducirnos a interpretaciones equívocas respecto a los datos obtenidos con gliclacida.

Las condiciones del ensayo fueron las mismas que en el apartado anterior (protocolo 1), así el diazóxido se añadió en los minutos 30, 45, 55, 65 y 75 pero en el minuto 35 pusimos insulina 10^{-9} M en el medio de perfusión, en vez de gliclacida.

La acción de la insulina a la concentración 10^{-9} M fue similar en ausencia y presencia de diazóxido ($5,6 \pm 0,7$ vs $4,7 \pm 0,5$ $\mu\text{mol/g/h}$, n.s.). El efecto estimulador de la insulina no fue alterado por la presencia de diazóxido $100 \mu\text{M}$ en el medio de perfusión (Figura 14).

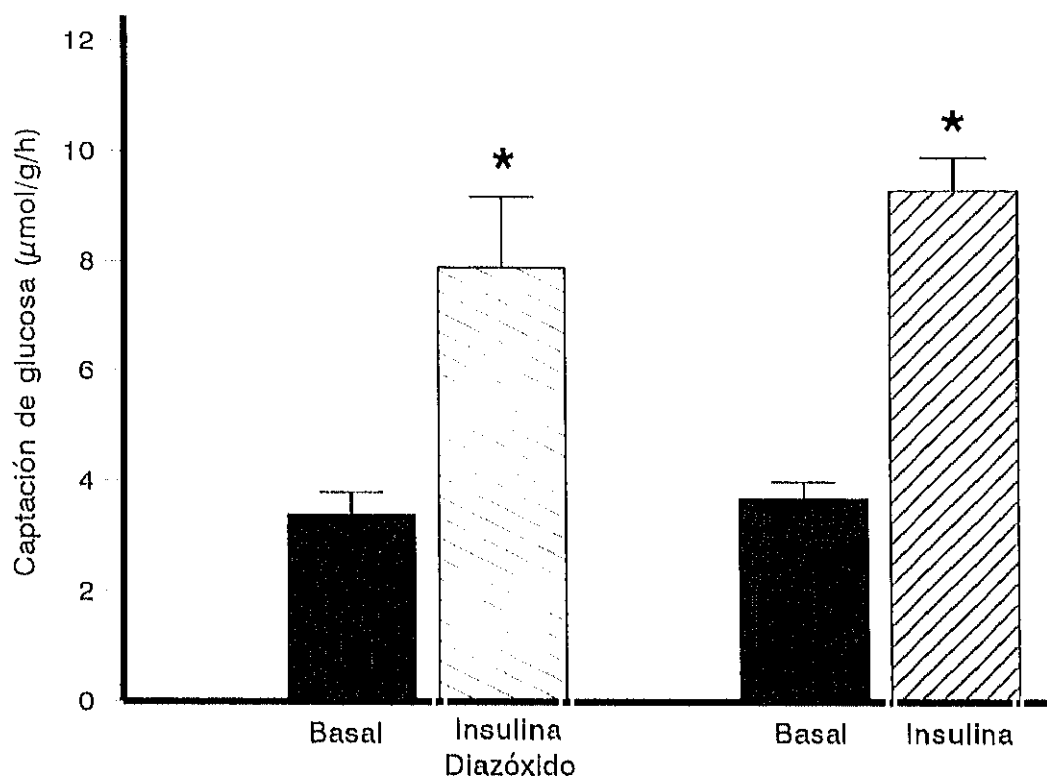


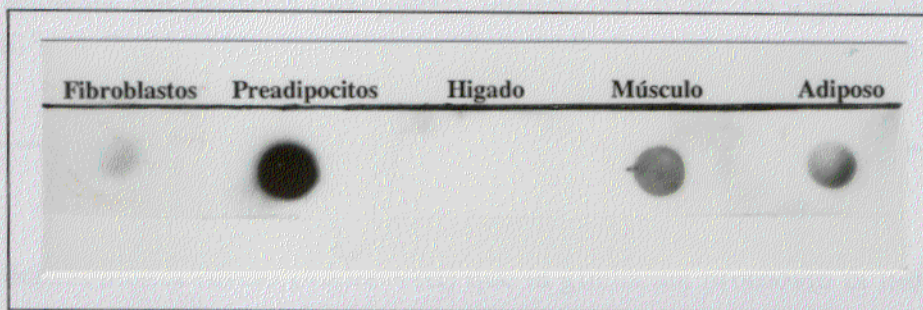
Figura 14. Captación de glucosa por las extremidades inferiores en ausencia y presencia de diazóxido combinado con insulina. Los datos representan la media \pm EEM de 5 experimentos para el diazóxido (100 μ M) y la insulina (10^{-9} M), y de 11 experimentos para la insulina sola (10^{-9} M); * $p < 0,05$ vs basal.

1.6. TRANSLOCACION DE LA PROTEINA TRANSPORTADORA GLUT4.

Como hemos visto en la introducción el transportador GLUT4 se desplaza a la membrana plasmática en respuesta a un estímulo con insulina. Para ver si el aumento en la captación de glucosa en el músculo esquelético en respuesta a glicéridos se correspondía con un aumento de GLUT4 en la membrana plasmática, se aislaron las fracciones subcelulares (membranas plasmáticas y de los microsomas) en las que se midió el contenido del glucotransportador mediante Western-blot con un anticuerpo policlonal específico contra el extremo carboxi-terminal del GLUT4.

Para ver la especificidad del anticuerpo anti-GLUT4 se realizaron estudios de Dot-blot usando como controles positivos tejido muscular y adiposo, así como la línea celular 3T3-L1 diferenciada a adipocitos. Como controles negativos se utilizaron tejido hepático y la línea celular 3T3-L1 previa al proceso de diferenciación.

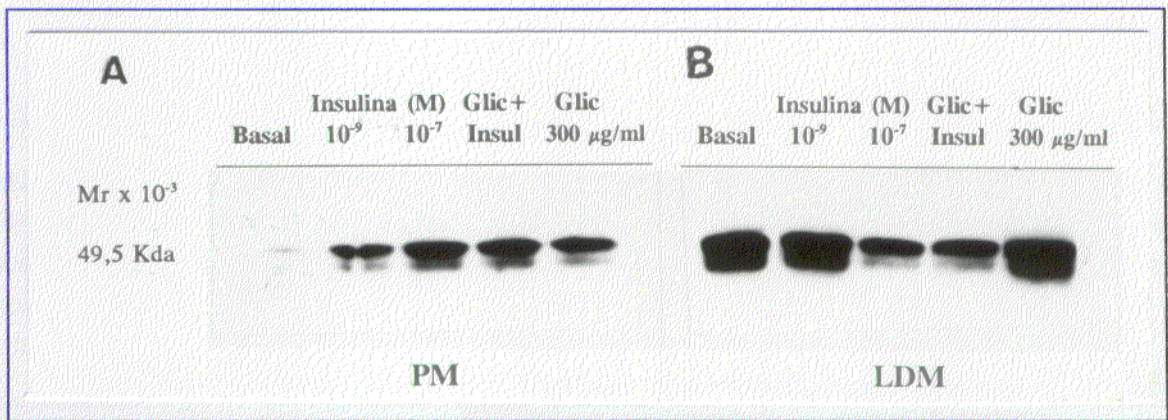
Se comprobó (Fotografía 5) la especificidad del anticuerpo en músculo y adiposo que expresan el glucotransportador GLUT4, mientras que en el tejido hepático no se detectó la proteína. En fibroblastos pertenecientes a la línea celular 3T3-L1 no se detectó la presencia del transportador GLUT4, apareciendo su expresión tras la diferenciación celular momento en el que las células adquieren fenotipo adipocitario.



Fotografía 5. Análisis por Dot-blot de la especificidad del anticuerpo anti-GLUT4. Se emplearon 5 μ g de proteínas de muestras de fibroblastos 3T3-L1, adipocitos 3T3-L1, homogenados de hígado, músculo y tejido adiposo que fueron fijadas a una membrana de nitrocelulosa mediante vacío.

El contenido de GLUT4 en fracciones subcelulares se midió en los músculos gastrocnemius de ratas perfundidas en ausencia y presencia de gliclacida a la concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$, en presencia de cantidades crecientes de insulina (10^{-9} y 10^{-7} M) y de la combinación de gliclacida (300 $\mu\text{g/ml}$) e insulina 10^{-9} M.

En la fotografía 6 se observa la distribución subcelular de la isoforma GLUT4 frente a diferentes estímulos en el músculo esquelético.



Fotografía 6. Análisis por Western-blot de GLUT4 en fracciones subcelulares de músculo esquelético. Los músculos gastrocnemius se extrajeron de ratas perfundidas en situación basal y después de estímulos con gliclacida (300 $\mu\text{g/ml}$), insulina (10^{-9} ó 10^{-7} M) y gliclacida (300 $\mu\text{g/ml}$) e insulina (10^{-9} M). Panel A) Membranas plasmáticas (PM), Panel B) Microsomas de baja densidad (LDM).

La densitometría reveló (Tabla VIII) que la gliclacida promovió el movimiento del transportador GLUT4 desde un compartimento intracelular a la membrana plasmática. Así, frente a un estímulo de gliclacida a la concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$ la fracción de membranas plasmáticas contenía dos veces más GLUT4 que en situación basal. Esto mismo sucedió en los músculos que habían sido extraídos de ratas perfundidas con insulina a la concentración de 10^{-9} M, en los que la cantidad de GLUT4 presente en la membrana era el doble que en

situación basal (músculos extraídos de ratas perfundidas en ausencia de gliclacida o de insulina). Sin embargo en respuesta a un estímulo de insulina a concentraciones suprafiológicas (10^{-7} M) o de la combinación de gliclacida (300 $\mu\text{g/ml}$) más insulina (10^{-9} M), se produjo una gran translocación del glucotransportador, apareciendo distribuido aproximadamente el 50% en la membrana plasmática y el otro 50% en las fracciones microsomales. En estas situaciones la cantidad de GLUT4 presente en la membrana plasmática era tres veces superior a aquella encontrada en ausencia de insulina o gliclacida (Figura 15).

Tabla VIII. *Contenido del transportador GLUT4 en las membranas plasmáticas y en los microsomas de baja densidad.* Los datos representan el porcentaje de unidades arbitrarias de cada fracción respecto del total (correspondiente a la suma de las unidades arbitrarias obtenidas en la fracción PM y en la LDM). Los datos están expresados como la media \pm desviación estándar de cuatro experimentos para cada grupo; * $p < 0,05$ vs PM basal, ** $p < 0,05$ vs LDM basal.

	BASAL	GLICLACIDA 300 $\mu\text{g/ml}$	INSULINA 10^{-9} M	GLIC 300 $\mu\text{g/ml}$ INSUL 10^{-9} M	INSULINA 10^{-7} M
PM	14 \pm 5	35 \pm 10*	35 \pm 9*	53 \pm 7*	53 \pm 9*
LDM	86 \pm 6	65 \pm 11**	65 \pm 9**	47 \pm 6**	47 \pm 9**

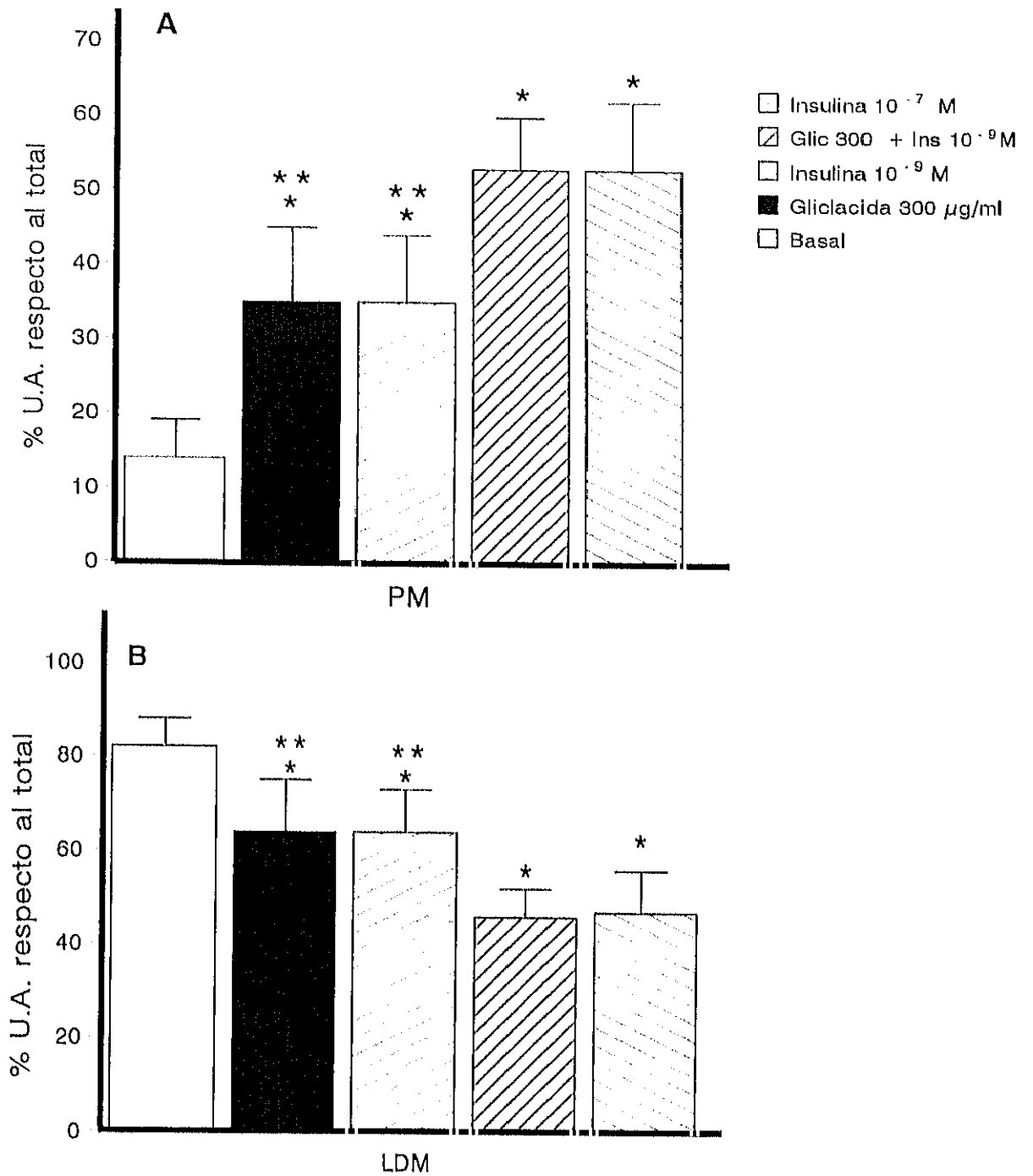


Figura 15. Efecto de la gliclacida sobre la translocación del glucotransportador GLUT4. Media ± EEM de cuatro experimentos. * p < 0,05 vs basal, ** p < 0,05 vs insulina 10⁻⁷ M y vs gliclacida (300 µg/ml) e insulina (10⁻⁹ M). Panel A) Distribución subcelular de GLUT4 en las membranas plasmáticas, Panel B) Distribución subcelular de GLUT4 en los microsomas de baja densidad.

Para comprobar la pureza de las fracciones se usó la actividad ouabaina Na^+/K^+ ATPasa como marcador de la fracción enriquecida con membranas plasmáticas (PM), mientras que la actividad UDP-galactosil transferasa sirvió de marcador para los microsomas de baja densidad (LDM).

La actividad ouabaina Na^+/K^+ ATPasa fue tres veces superior en las fracciones enriquecidas con membranas plasmáticas que en las fracciones enriquecidas con microsomas de baja densidad (Tabla IX).

Tabla IX. Actividad enzimática ouabaina Na^+/K^+ ATPasa de las fracciones enriquecidas con membranas plasmáticas y con microsomas de baja densidad de los diferentes grupos estudiados. Los datos se expresan en nanomoles de fósforo inorgánico liberado por minuto y por miligramo de proteína y representan la media \pm EEM de cuatro experimentos para cada grupo. * $p < 0,05$ vs LDM.

	BASAL	GLICLACIDA 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$	INSULINA 10^{-9} M	GLIC 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ INSUL 10^{-9} M	INSULINA 10^{-7} M
PM	$84 \pm 17^*$	$91 \pm 13^*$	$81 \pm 13^*$	$87 \pm 21^*$	$74 \pm 6^*$
LDM	26 ± 5	40 ± 8	39 ± 2	30 ± 7	30 ± 3

Aunque hubo oscilaciones en la actividad Na^+/K^+ ATPasa en las PM de los diferentes grupos no hubo diferencias significativas entre ellas. Lo mismo ocurrió con las LDM de los cinco grupos estudiados, así la actividad Na^+/K^+ ATPasa fue similar.

En la figura 16 se representa la actividad Na^+/K^+ ATPasa de las dos fracciones que contenían el GLUT4, así como el homogenado del que se partió.

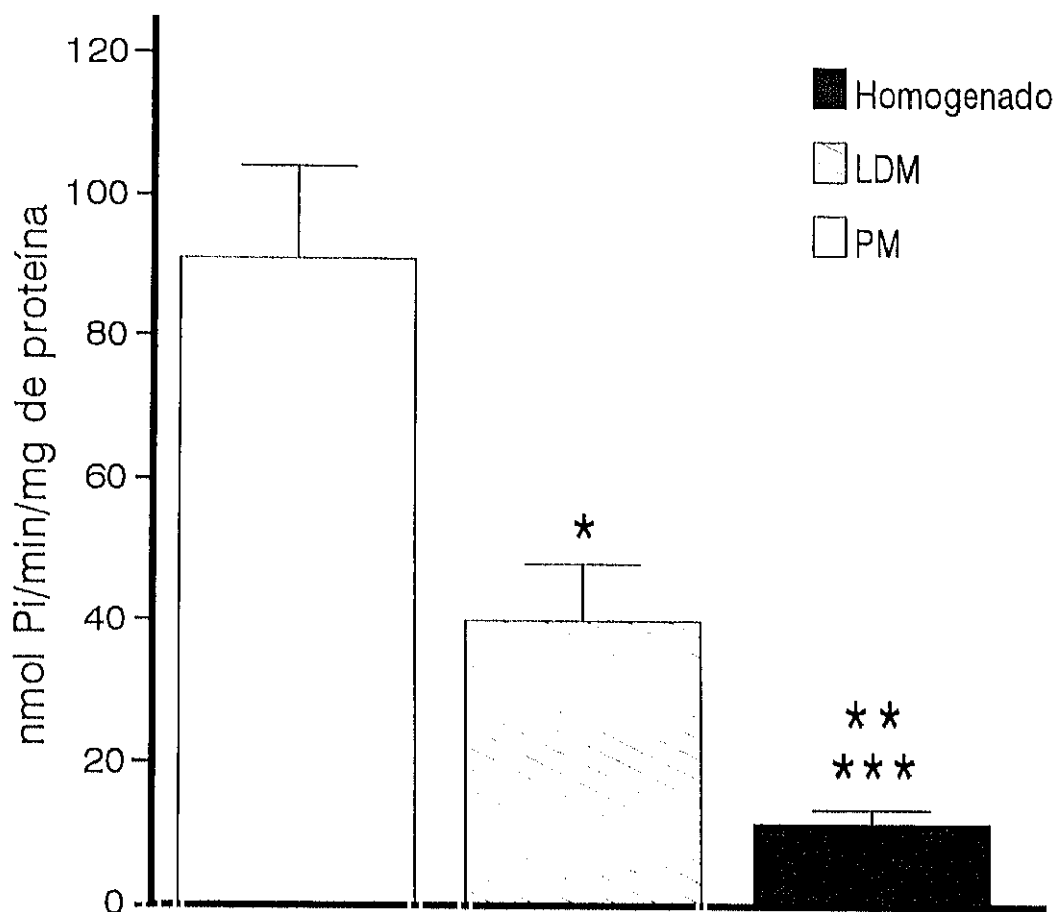


Figura 16. Caracterización enzimática de las membranas plasmáticas. Actividad Na^+/K^+ ATPasa en las fracciones subcelulares obtenidas de músculos de ratas perfundidas con glielacida (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Los datos se expresan como la media \pm EEM de cuatro experimentos; * $p < 0,01$ vs PM, ** $p < 0,001$ vs PM, *** $p < 0,05$ vs LDM.

La actividad UDP-galactosil transferasa fue aproximadamente dos veces superior en las fracciones enriquecidas con microsomas de baja densidad que en las fracciones enriquecidas con membranas plasmáticas (Tabla X). Así la galactosa transferida a lactosamina (al reaccionar con la N-acetilglucosamina) fue el doble en las fracciones LDM que en las PM.

Tabla X. Actividad enzimática UDP-galactosil transferasa de las fracciones enriquecidas con membranas plasmáticas y con microsomas de baja densidad de los diferentes grupos estudiados. Los datos se expresan en nanomoles de lactosamina formada por minuto y por miligramo de proteína y representan la media \pm EEM de cuatro experimentos para cada grupo. * $p < 0,05$ vs PM.

	BASAL	GLICLACIDA 300 μ g/ml	INSULINA 10^{-9} M	GLIC 300 μ g/ml INSUL 10^{-9} M	INSULINA 10^{-7} M
PM	3,5 \pm 1,3	4,0 \pm 0,9	3,4 \pm 0,1	3,1 \pm 0,3	2,9 \pm 0,3
LDM	6,8 \pm 1,6*	7,9 \pm 1,8*	7,5 \pm 0,9*	7,8 \pm 0,4*	7,5 \pm 0,4*

Aunque hubo oscilaciones en la actividad UDP-galactosil transferasa en las fracciones enriquecidas con LDM de los diferentes grupos no hubo diferencias significativas entre ellas. Lo mismo ocurrió en las fracciones enriquecidas con PM de los cinco grupos estudiados, así la actividad UDP-galactosil transferasa fue similar.

En la figura 17 se representa la actividad UDP-galactosil transferasa de las dos fracciones que contenían el GLUT4, así como el homogenado del que se partió.

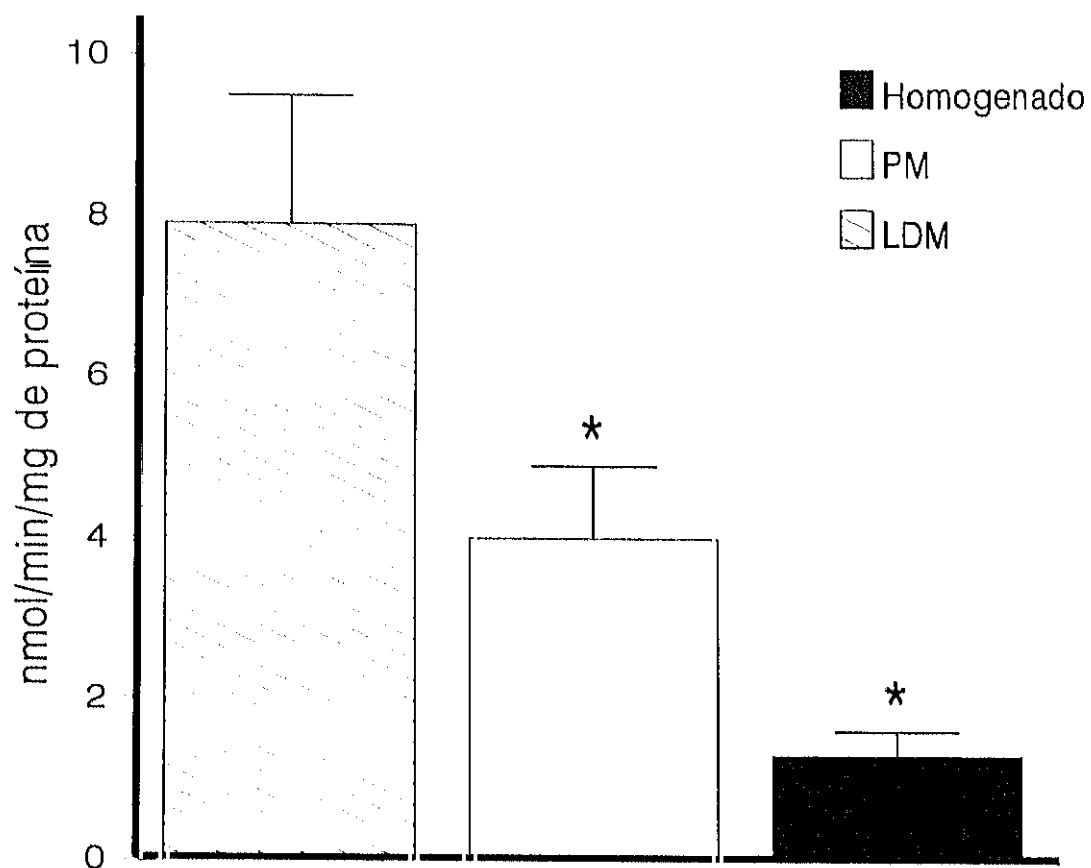


Figura 17. *Caracterización enzimática de las fracciones enriquecidas con microsomas de baja densidad.* Actividad UDP-galactosil transferasa en el homogenado y en las fracciones subcelulares obtenidas de músculos de ratas perfundidas con glicilacida (300 $\mu\text{g/ml}$). Media \pm EEM de cuatro experimentos; * $p < 0,05$ vs LDM.

2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GLICLACIDA EN RATAS DIABÉTICAS POST-ESTREPTOZOTOCINA.

2.1 RATAS MACHO WISTAR DIABÉTICAS POST-STREPTOZOTOCINA MANTENIDAS CON CICLO DE LUZ/OSCURIDAD DE 12 HORAS.

Dado que las sulfonilureas se usan en el tratamiento de la DMNID, estudiamos el efecto que producía la gliclacida sobre la captación de glucosa por el músculo esquelético administrada durante 12 días en ratas diabéticas post-estreptozotocina.

Este modelo de diabetes inducido por administración de estreptozotocina es un modelo intermedio entre la diabetes mellitus tipo I y la diabetes mellitus tipo II. La estreptozotocina destruye gran parte de las células β -pancreáticas, pero no todas, además provoca insulinoresistencia en los tejidos periféricos de acción de la insulina, entre ellos en el músculo esquelético.

Tres días después de la administración de estreptozotocina, se comprobó la inducción de diabetes por análisis de la glucemia y tras seleccionar a las ratas que tenían niveles de glucosa en sangre superiores a 200 mg/dl e inferiores a 400 mg/dl, se siguieron cuatro modalidades de tratamiento: ratas diabéticas sin tratar (Grupo G), ratas diabéticas tratadas con gliclacida (Grupo G), ratas diabéticas tratadas con insulina (Grupo I) y ratas diabéticas tratadas con gliclacida e insulina (Grupo G+I).

Tras los 12 días de seguimiento, las ratas diabéticas sin tratar perdieron peso (peso final 96 ± 4 % del inicial), las tratadas sólo con gliclacida mantuvieron peso (peso final 100 ± 5 % del inicial), las tratadas sólo con insulina ganaron peso (peso final 118 ± 4 % del inicial) y las tratadas con insulina y gliclacida ganaron peso (peso final 121 ± 2 % del inicial). La ganancia de peso en el grupo de ratas diabéticas tratadas con insulina fue similar a la de las ratas tratadas conjuntamente con gliclacida e insulina. Las ratas del Grupo G+I y las ratas del Grupo I tuvieron un peso final significativamente superior ($p < 0,001$) que el de las ratas del Grupo G o del Grupo D.

2.1.1 NIVELES SERICOS DE GLUCOSA

A lo largo del tratamiento se realizaron determinaciones de glucemia cada dos días a todos los grupos de ratas diabéticas post-STZ estudiadas. El día de la perfusión, tras 14 horas de ayuno, también se determinaron los niveles de glucosa en sangre.

Las ratas diabéticas sin tratar (Grupo D) tuvieron niveles individuales medios de glucemia post-prandial a lo largo de los 12 días de seguimiento entre 312 y 400 mg/dl, las ratas diabéticas tratadas con gliclacida (Grupo G) tuvieron niveles individuales medios de glucemia a lo largo de los 12 días de tratamiento entre 219 y 400 mg/dl. Las ratas diabéticas tratadas con insulina (Grupo I) recibieron una dosis diaria de insulina NPH subcutánea de $5,1 \pm 0,1$ unidades a las 8 p.m. y tuvieron unos niveles de glucemia a lo largo del tratamiento entre 129 y 218 mg/dl. Las ratas diabéticas tratadas con insulina y gliclacida (Grupo G+I), recibieron una dosis diaria de insulina NPH subcutánea de $5,3 \pm 0,1$ unidades a las 8 p.m. y dos dosis diarias de gliclacida de 5 mg/kg a las 9 a.m. y a las 8 p.m. Los niveles individuales medios de glucemia de las ratas del Grupo G+I a lo largo del tratamiento estuvieron entre 138 y 224 mg/dl.

Se han utilizado los resultados obtenidos en el estudio previo de perfusión de extremidades inferiores de ratas macho Wistar normales ($n=11$) de 180 g de peso para compararlos con los datos obtenidos en las ratas diabéticas. En la Tabla XI se muestran las glucemias obtenidas a lo largo del tratamiento y en el día en que se realizó la perfusión de extremidades inferiores.

Las ratas del Grupo G tuvieron unas glucemias a lo largo del tratamiento significativamente inferiores ($p < 0,01$) que las de las ratas diabéticas sin tratar. El día de la perfusión presentaron unos niveles de glucosa en sangre más bajos ($p < 0,05$) que los de las ratas diabéticas no tratadas.

Las glucemias a lo largo del tratamiento fueron inferiores en las ratas del Grupo G+I con respecto a las ratas del Grupo I, aunque no alcanzaron diferencias significativas ($p > 0,05$). El día de la perfusión los niveles séricos de glucosa (tras 14 h de ayuno y de la última dosis de gliclacida, y habiendo suprimido la dosis de insulina del día anterior) fueron similares en las ratas del Grupo I y en las del Grupo G+I.

Las ratas del Grupo G+I tuvieron unas glucemias en ayunas (día de la perfusión) similares a las glucemias obtenidas en ayunas en las ratas no diabéticas (Grupo C).

Los niveles de glucemia a lo largo del tratamiento y los del día de la perfusión fueron significativamente inferiores ($p < 0,001$) en las ratas tratadas sólo con insulina o con insulina y gliclacida en comparación con las ratas diabéticas post-STZ no tratadas o tratadas sólo con gliclacida.

TABLA XI. Niveles séricos de glucosa en los cinco grupos de ratas estudiadas. Glucemias (mg/dl) obtenidas a lo largo de los 12 días de tratamiento (días 0-12) y en el día en que las ratas fueron perfundidas (día 13). Los resultados representan la media \pm EEM, el número de determinaciones aparece entre paréntesis; * $p < 0,01$ vs Grupo C; ** $p < 0,05$ vs Grupo C.

	DIA 0-12	DIA 13
GRUPO D	358 \pm 9* (70)	362 \pm 14* (1)
GRUPO G	309 \pm 11* (82)	292 \pm 11* (10)
GRUPO I	194 \pm 10* (106)	139 \pm 18 (11)
GRUPO G+I	173 \pm 10** (103)	102 \pm 8 (9)
GRUPO C	109 \pm 3 (n=17)	100 \pm 6 (n=8)

2.1.2 NIVELES SERICOS DE INSULINA

Diversos estudios han referido que pacientes con DMNID tratados con sulfonilureas, presentaban unos niveles de insulina similares antes y después del tratamiento; a pesar de que se observaba una disminución de la glucemia después de tratamientos crónicos con sulfonilureas.

A las 72 h de la inyección de estreptozotocina (justamente el día de inicio del tratamiento) los niveles séricos de insulina fueron similares en los cuatro grupos de ratas diabéticas estudiadas (Tabla XII). En el día de la perfusión (tras 14 h de ayuno), las concentraciones séricas de insulina fueron similares en los cuatro grupos de ratas diabéticas (tratadas o sin tratar) y en el grupo de ratas no diabéticas.

TABLA XII. Niveles séricos de insulina en el día de inicio del tratamiento y en el día de la perfusión de extremidades inferiores. La concentración de insulina se expresa en ng/ml. Media \pm EEM. El número de ensayos aparece entre paréntesis.

	DIA 0	DIA 13
GRUPO D	0,5 \pm 0,1 (6)	0,5 \pm 0,1 (6)
GRUPO G	0,7 \pm 0,1 (9)	0,6 \pm 0,1 (9)
GRUPO I	0,5 \pm 0,1 (9)	0,5 \pm 0,2 (9)
GRUPO G+I	0,5 \pm 0,1 (9)	0,5 \pm 0,1 (9)
GRUPO C	--	0,7 \pm 0,1 (11)

2.1.3 CAPTACION DE GLUCOSA POR LAS EXTREMIDADES INFERIORES.

Una vez finalizados los doce días de tratamiento las ratas diabéticas post-STZ fueron perfundidas para medir la captación muscular de glucosa en ausencia (captación basal) y en presencia de cantidades crecientes de insulina (10^{-9} y 10^{-7} M).

Captación basal de glucosa

La captación basal de glucosa fue similar en los tres grupos de ratas diabéticas tratadas (Grupo G, Grupo I, Grupo G+I), mientras que en el grupo de ratas diabéticas no tratadas (Grupo D) fue significativamente inferior ($p < 0,01$) respecto a los tres grupos anteriores (Figura 18).

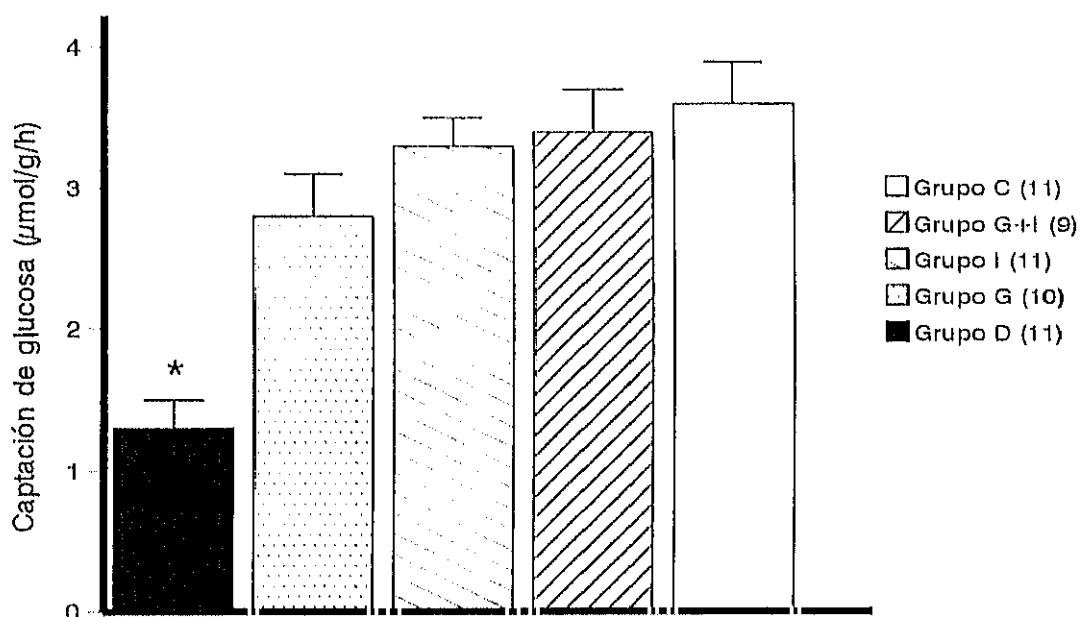


Figura 18. *Captación basal de glucosa por las extremidades inferiores.* Tras los 12 días de tratamiento las ratas diabéticas post-STZ fueron perfundidas en ausencia de insulina (situación basal) durante 30 min. Los datos representan la media \pm EEM. El número de ensayos aparece entre paréntesis; * $p < 0,01$ vs Grupo C.

En comparación con la captación basal de glucosa por las extremidades inferiores del grupo de ratas no diabéticas, los tres grupos de ratas diabéticas tratadas no presentaron diferencias significativas, mientras que las no tratadas tuvieron un valor significativamente inferior.

Captación de glucosa estimulada por insulina

A la concentración de insulina 10^{-9} M, las ratas del Grupo D presentaron una captación de glucosa similar a la de las ratas del Grupo G. Las ratas diabéticas tratadas con insulina tuvieron una captación de glucosa similar a la de las ratas tratadas con gliclacida y a las de las ratas no tratadas. Las ratas del Grupo G+I tuvieron una captación de glucosa superior ($p < 0,05$) a la de los otros tres grupos de ratas diabéticas. Al comparar la captación de glucosa estimulada por insulina 10^{-9} M por las extremidades inferiores del grupo de ratas no diabéticas (Figura 19), sólo las ratas diabéticas tratadas conjuntamente con insulina y gliclacida presentaron un valor similar, mientras que los otros tres grupos de ratas diabéticas tuvieron un valor medio significativamente inferior ($p < 0,05$).

Cuando los valores de la captación basal de glucosa fueron sustraídos de los valores obtenidos en presencia de insulina 10^{-9} M, observamos que el incremento obtenido en presencia de concentraciones fisiológicas de insulina (10^{-9} M) fue similar en las ratas diabéticas sin tratar, en las tratadas con gliclacida y en las tratadas sólo con insulina. Sin embargo, el incremento fue significativamente mayor ($p < 0,01$) en las ratas tratadas con gliclacida e insulina con respecto a los otros tres grupos de ratas diabéticas post-STZ. Las ratas del grupo G+I presentaron un incremento en la captación de glucosa estimulada por insulina 10^{-9} M similar al obtenido en el grupo de ratas no diabéticas (Grupo C).

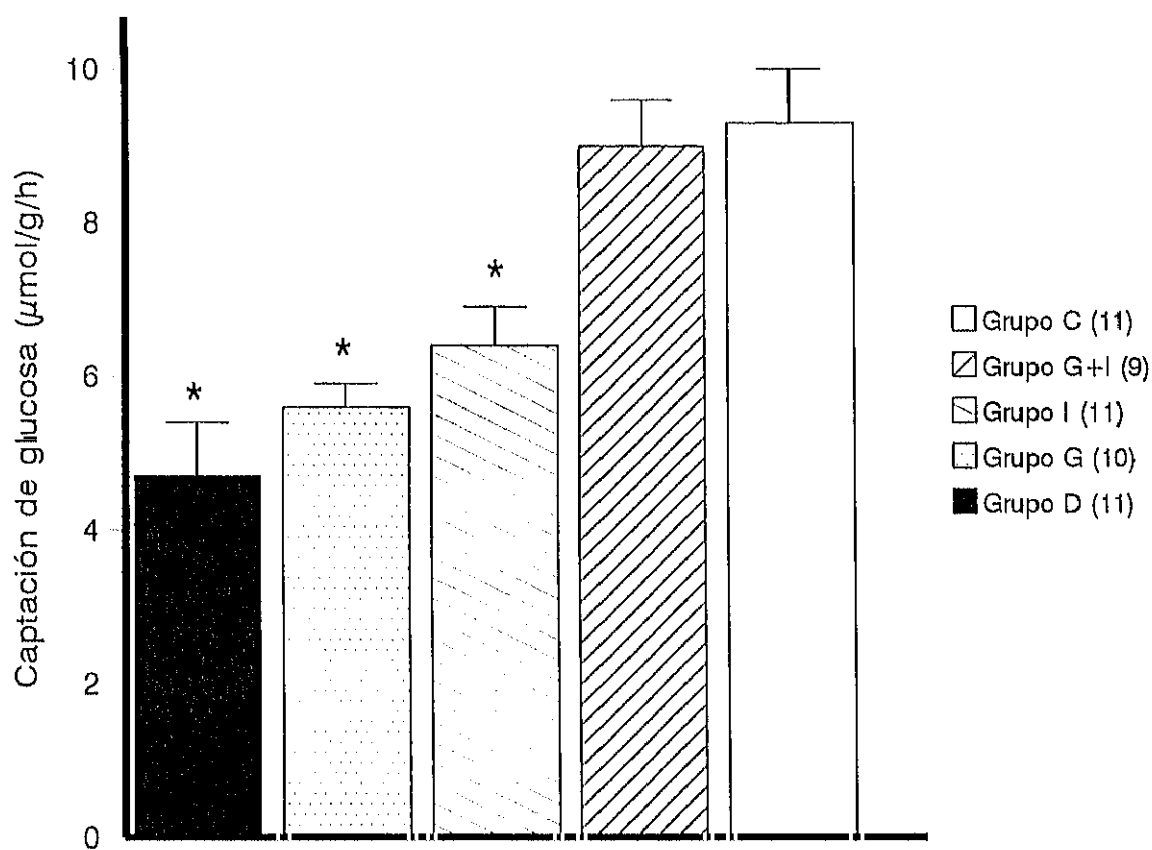


Figura 19. Captación de glucosa estimulada por insulina 10^{-9} M en el músculo esquelético. Tras 30 min de captación basal las extremidades inferiores se perfundieron otros 30 min con insulina 10^{-9} M. Media \pm EEM; * $p < 0,01$ vs Grupo C y vs Grupo G+I.

En la figura 20 podemos observar que a la concentración de insulina 10^{-7} M, la captación de glucosa por las extremidades inferiores en las ratas del Grupo D fue inferior ($p < 0,05$) a la de las ratas diabéticas tratadas con gliclacida, así como a la de las ratas diabéticas tratadas con insulina y a la de las ratas diabéticas tratadas con insulina y gliclacida. Las ratas diabéticas tratadas con gliclacida presentaron una captación de glucosa similar a la de las ratas del Grupo I e inferior ($p < 0,05$) a la de las ratas del Grupo G+I. Las ratas tratadas con insulina presentaron una captación de glucosa menor ($p < 0,05$) que

la de las ratas tratadas con insulina+gliclacida. Al comparar estos resultados con los de la captación de glucosa estimulada por insulina 10^{-7} M en el grupo de ratas no diabéticas, sólo las ratas diabéticas tratadas con insulina+gliclacida presentaron valores similares, mientras que los otros tres grupos de ratas diabéticas tuvieron valores inferiores ($p < 0,05$).

El incremento sobre la captación basal obtenido cuando las ratas fueron perfundidas con concentraciones suprafiológicas de insulina (10^{-7} M) fue significativamente superior ($p < 0,05$) en las ratas del grupo C con respecto a las ratas del grupo D, del grupo G y del grupo I. Sólo las ratas diabéticas tratadas conjuntamente con gliclacida e insulina tuvieron un incremento similar que el de las ratas diabéticas no tratadas (Grupo C).

En la tabla XIII podemos observar las captaciones de glucosa obtenidas en ausencia y presencia de insulina, así como los incrementos, en los cuatro grupos de ratas diabéticas post-STZ y en el grupo de ratas no diabéticas (Grupo C).

Tabla XIII. Captación de glucosa por las extremidades inferiores en las ratas diabéticas post-STZ y en un grupo de ratas no diabéticas. Media \pm EEM; Grupo D (n=11), Grupo G (n=10), Grupo I (n=11), Grupo G+I (n=9), C (n=11); * $p < 0,01$ vs Grupo C; ** $p < 0,05$ vs Grupo C.

	Basal	Ins 10^{-9} M	Incremento	Ins 10^{-7} M	Incremento
GRUPO D	1,3 \pm 0,2*	4,7 \pm 0,8*	3,4 \pm 0,4*	7,0 \pm 0,6*	5,7 \pm 0,6*
GRUPO G	2,8 \pm 0,3	5,6 \pm 0,3*	2,8 \pm 0,3*	9,2 \pm 0,6*	6,5 \pm 0,7*
GRUPO I	3,3 \pm 0,2	6,4 \pm 0,5*	3,1 \pm 0,5*	10,2 \pm 0,7*	6,8 \pm 0,7**
GRUPO G+I	3,4 \pm 0,3	9,0 \pm 0,6	5,6 \pm 0,6	12,0 \pm 0,4	8,8 \pm 0,5
GRUPO C	3,6 \pm 0,2	9,2 \pm 0,6	5,6 \pm 0,7	13,4 \pm 0,9	9,8 \pm 1,0

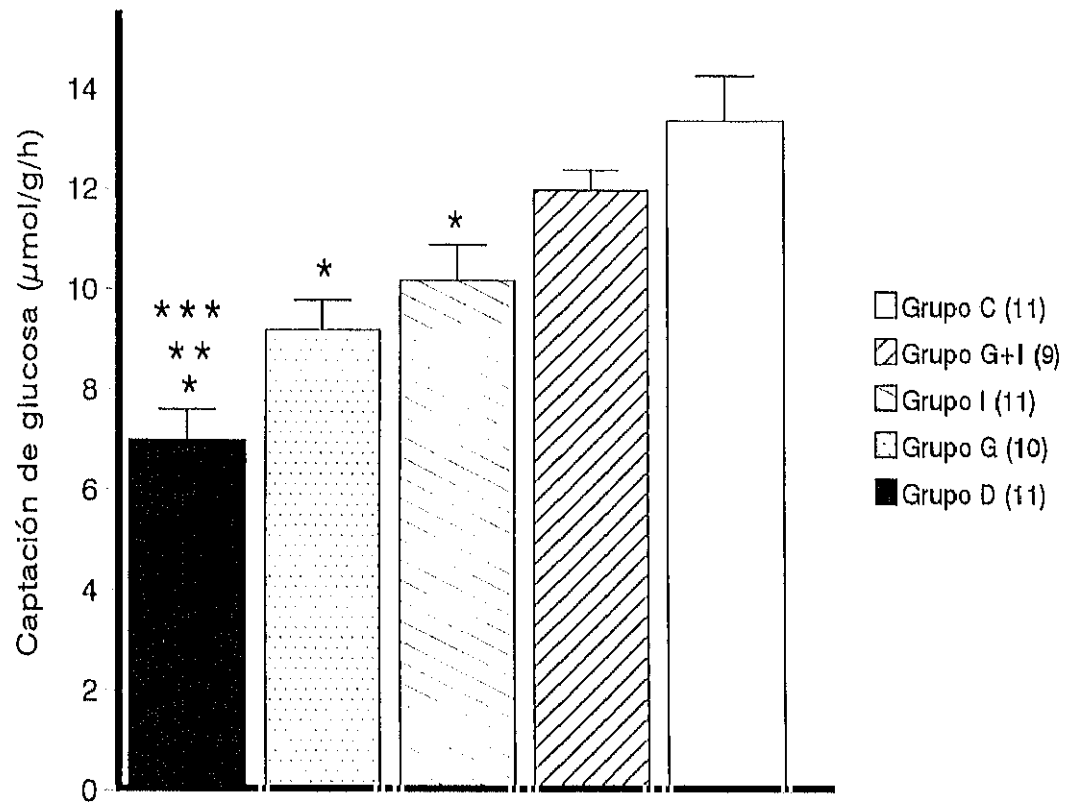


Figura 20. Captación de glucosa estimulada por insulina 10^{-7} M en el músculo esquelético. Las extremidades inferiores fueron perfundidas durante 90 minutos. Tras 30 min de perfusión basal, las extremidades se perfundieron con insulina 10^{-9} M, y en el minuto 60 se añadió insulina 10^{-7} M en el medio de perfusión, manteniéndose durante otros 30 min. Los resultados se expresan como media \pm EEM. El número de veces aparece entre paréntesis; * $p < 0,01$ vs grupo C; ** $p < 0,05$ vs Grupo G; *** $p < 0,01$ vs Grupo I.

2.1.4 UNIÓN DE LA INSULINA A SUS RECEPTORES DE TEJIDO MUSCULAR

Para conocer si el efecto de la gliclacida sobre la captación de glucosa estaba mediado a través del receptor de insulina, estudiamos la unión de la ^{125}I -insulina a los receptores parcialmente purificados de los músculos gastrocnemius de los cuatro grupos de ratas diabéticas.

En la Figura 21 se muestran las curvas de competición de la unión de insulina para los receptores de músculo esquelético de las ratas diabéticas post-STZ. Podemos apreciar como a concentraciones traza de ^{125}I -insulina (0,01 ng/ml), la unión que presentan los cuatro grupos de ratas diabéticas es similar (Tabla XIV). Además, estas curvas que muestran el desplazamiento de la ^{125}I -insulina unida por concentraciones de insulina fría, presentan una forma similar en los cuatro grupos estudiados. A partir de ellas y por cálculo geométrico, se ha determinado la afinidad aparente de los receptores de insulina, es decir, la concentración de insulina que desplaza el 50% de la máxima unión específica (ED_{50}); la afinidad aparente resultó ser similar en los cuatro grupos de ratas diabéticas post-STZ.

Tabla XIV. *Parámetros de unión de la insulina a los receptores de músculo de las ratas diabéticas post-STZ.* B_1 max: máxima capacidad de unión de los sitios de alta afinidad, B_2 max: máxima capacidad de unión de los sitios de baja afinidad. Media \pm EEM, con un $n=8$ para el Grupo D, $n=7$ para el Grupo G, $n=7$ para el Grupo I y $n=6$ para el Grupo G+I.

	% Unión específica	Afinidad aparente ED_{50} (10^{-9} M)	B_1 max (10^{-10} M)	B_2 max (10^{-10} M)
GRUPO D	5,66 \pm 0,8	1,7 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	1,9 \pm 0,2
GRUPO G	6,16 \pm 0,6	2,1 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	2,2 \pm 0,3
GRUPO I	5,2 \pm 0,5	1,7 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1	2,0 \pm 0,2
GRUPO G+I	6,5 \pm 1,0	2,2 \pm 0,2	1,1 \pm 0,2	2,0 \pm 0,2

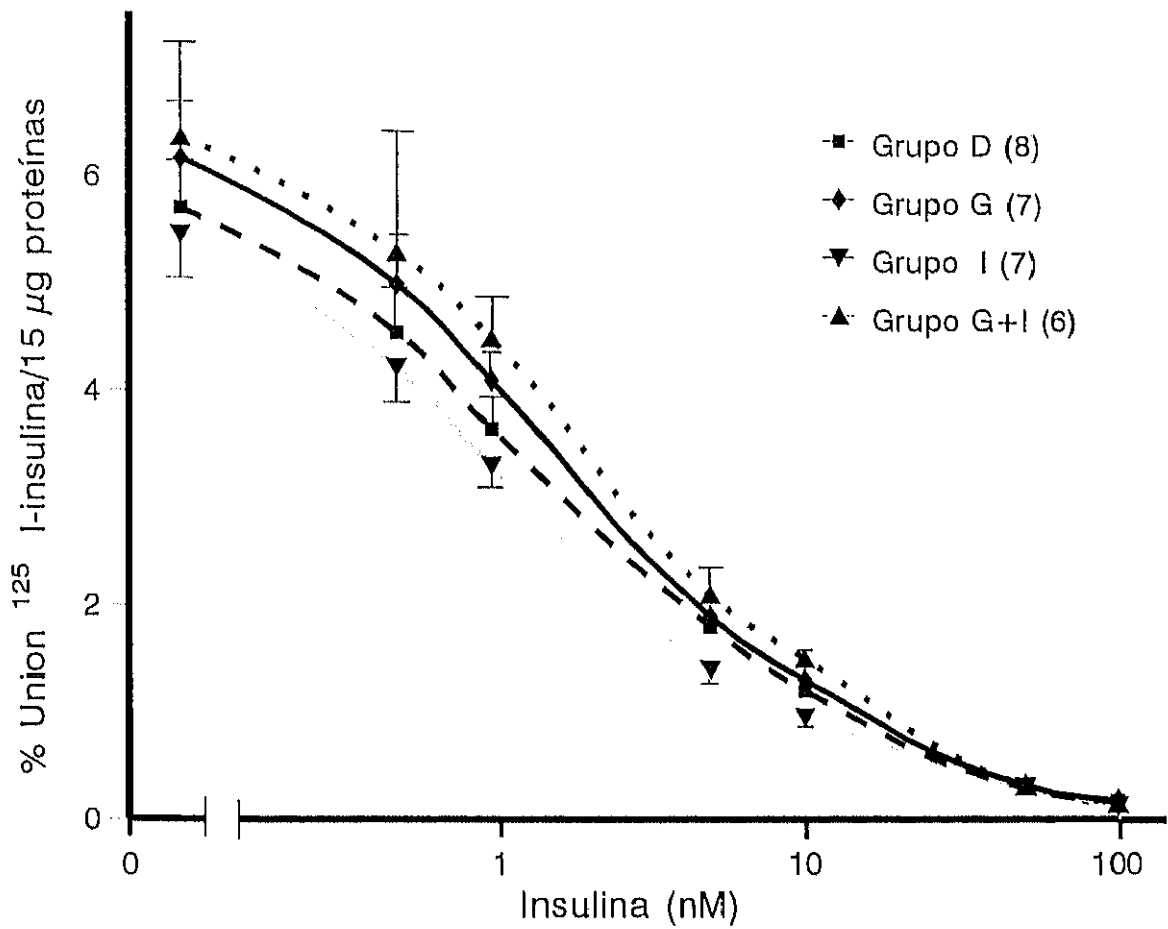


Figura 21. Desplazamiento de la unión específica de ¹²⁵I-insulina por concentraciones crecientes de insulina fría en los receptores de músculo esquelético de ratas con diabetes post-STZ. La unión específica (unión total menos unión inespecífica) se representa como función de la insulina añadida. Por cálculo geométrico se calculó el valor ED₅₀ (la concentración de insulina que desplaza el 50% de la máxima unión específica). Media ± EEM. En número de ensayos aparece entre paréntesis.

Mediante la representación de los datos según análisis de Scatchard (188), se obtuvo mayor información sobre la unión de la insulina a los receptores parcialmente purificados de músculo esquelético. Como se sabe la representación de Scatchard de la unión de la insulina a sus receptores es curvilínea, indicando que la afinidad de la reacción no es uniforme sobre el rango de saturación, lo que se ha interpretado como que en los receptores hay dos tipos de sitios de unión, unos de alta afinidad y otros de baja afinidad, con la existencia de interacciones cooperativas sitio-sitio que influyen en la unión y disociación de

la insulina. La representación de los datos de concentración de ligando unido/concentración de ligando libre (B/F) frente a la concentración de ligando unido (B) es curvilínea en todos los grupos de ratas diabéticas post-STZ (Figura 22). Los receptores de músculo de las ratas diabéticas (tratadas o sin tratar) muestran una capacidad de unión para los sitios de alta afinidad (B_1 max) y de baja afinidad (B_2 max) similar.

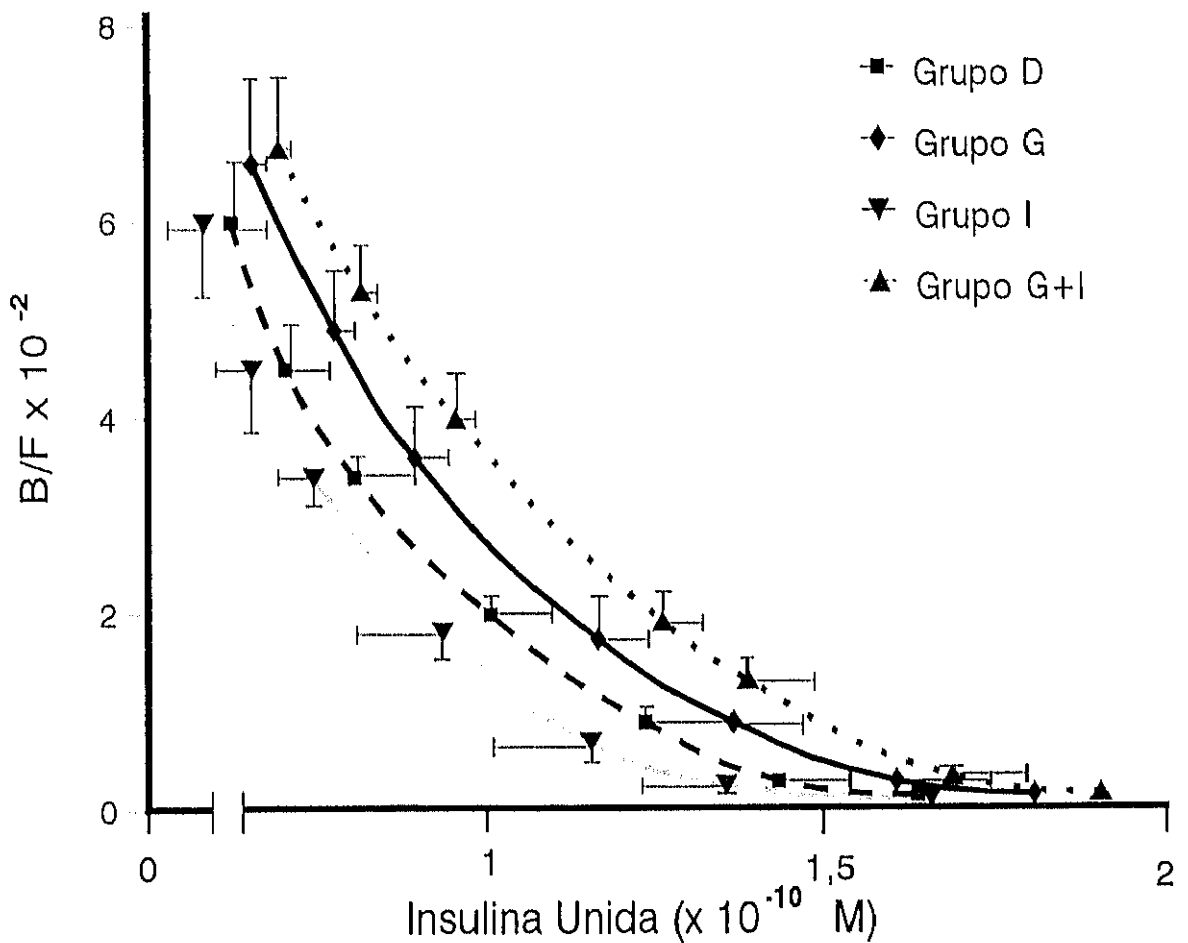


Figura 22. Representación de Scatchard de la unión específica de la insulina a sus receptores parcialmente purificados de músculo de ratas diabéticas post-STZ. Se ha representado la concentración de insulina unida/concentración de insulina libre (B/F) frente a la concentración de insulina unida (B). Los datos representan la media \pm EEM.

2.1.5 ACTIVIDAD TIROSINA QUINASA

Una vez visto que la cinética de unión de la insulina a sus receptores no se modificaba por glicilacida, y debido a la importancia de la activación del receptor para iniciar y mediar la transmisión de la señal, estudiamos la actividad tirosina quinasa de los receptores parcialmente purificados de músculo. Para analizar esta actividad empleamos dos fotoaceptores: la subunidad β del receptor (autofosforilación) y el sustrato sintético Glu4:Tyr1 (fosforilación exógena).

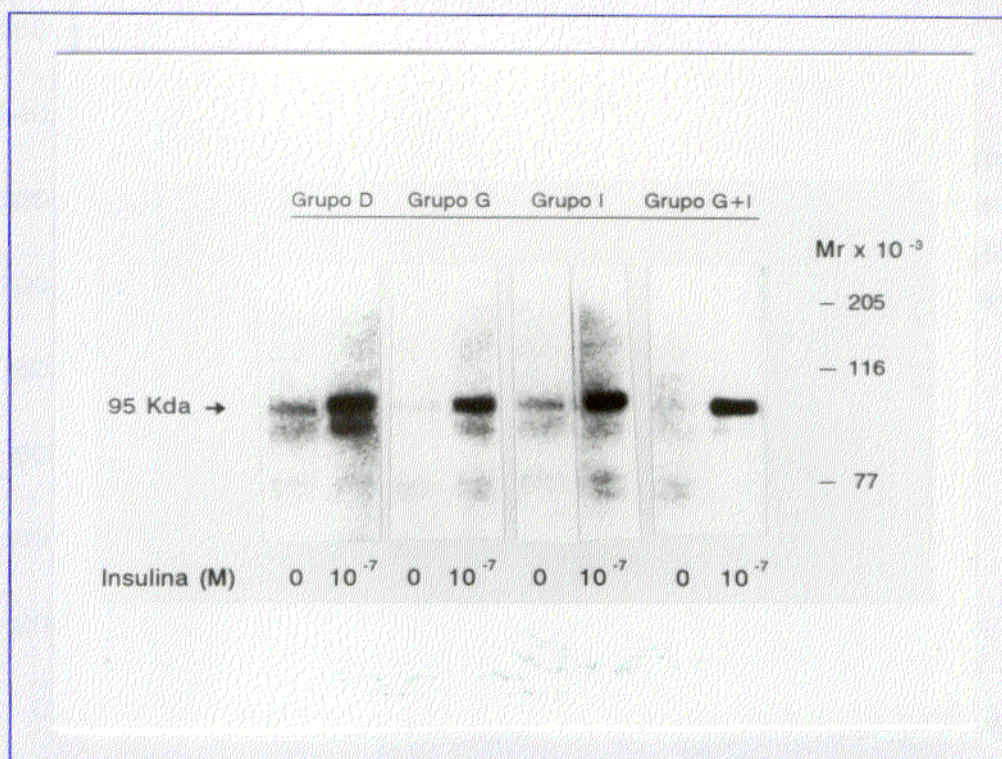
Autofosforilación del receptor de insulina.

Tras la unión de la insulina a su receptor, uno de los primeros hechos que tiene lugar es la fosforilación en múltiples residuos de tirosina de la subunidad β del receptor de insulina.

Las medidas cuantitativas de la actividad de autofosforilación pueden, potencialmente, ser confundidas por actividades ATPasas que puedan haber copurificado con el receptor de insulina durante la cromatografía de afinidad. Para evitar la actividad ATPasa empleamos en todos los ensayos el nucleótido CTP (500 μ M), que es un antagonista competitivo de las ATPasas y a la vez no es sustrato de la quinasa del receptor de insulina.

Habiendo excluido de esta forma las posibles interferencias de ATPasas preincubamos la misma cantidad de receptor de músculo parcialmente purificado (15 μ g) en ausencia y en presencia de insulina 10^{-7} M.

En la Fotografía 7 se muestra la autorradiografía de la autofosforilación del receptor de insulina en las ratas diabéticas post-STZ. Se puede observar como en presencia de insulina se produjo un incremento en la cantidad de 32 P incorporado al receptor de insulina. La movilidad electroforética del receptor era similar a una proteína de 95.000 daltons de peso molecular (subunidad β del receptor de insulina)



Fotografía 7. Autofosforilación de la subunidad β del receptor de insulina de tejido muscular. Autorradiografía representativa de la autofosforilación de la subunidad β (en ausencia y presencia de insulina) de los receptores de músculo esquelético de las ratas diabéticas post-STZ.

Cuando las bandas fueron densitometradas, se observó (Figura 23) que la incorporación de gamma-[³²P]-ATP a la subunidad β en ausencia de insulina (autofosforilación basal) y la autofosforilación estimulada por insulina 10⁻⁷ M no fueron diferentes entre los cuatro grupos de ratas diabéticas post-STZ. Cuando los valores de la autofosforilación basal fueron sustraídos de los correspondientes valores medidos en presencia de insulina 10⁻⁷ M, obtuvimos que el incremento en la fosforilación sobre el valor basal producido por el estímulo de la insulina fue similar en los cuatro grupos de ratas diabéticas post-STZ.

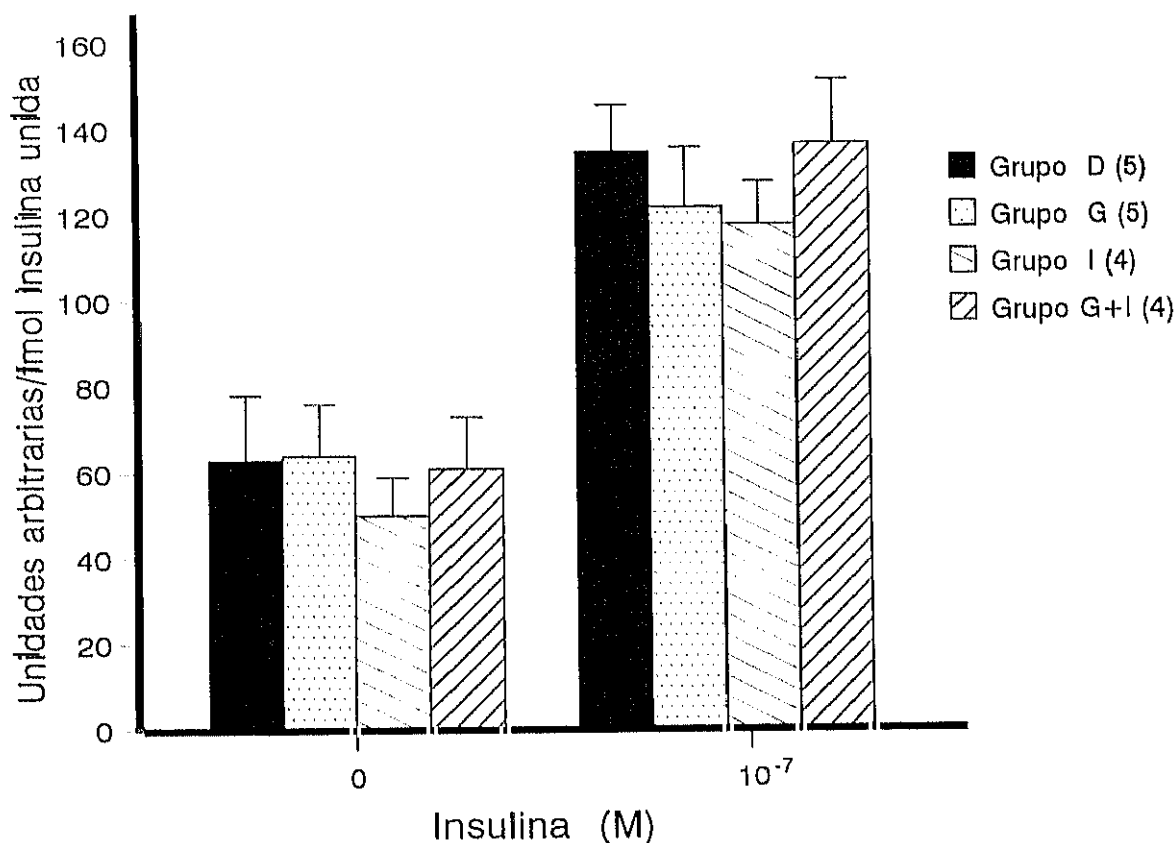


Figura 23. Autofosforilación de la subunidad β del receptor de insulina de tejido muscular de las ratas con diabetes post-STZ. Los receptores parcialmente purificados de músculo esquelético (15 μ g) fueron incubados en ausencia y presencia de insulina 10^{-7} M. Los resultados representan la media \pm EEM. El número de determinaciones aparece entre paréntesis.

Fosforilación del sustrato exógeno Glu4:Tyr1 por el receptor de insulina.

Como decíamos en la introducción la autofosforilación del receptor activa la quinasa intrínseca del mismo hacia otros sustratos. Mediante experimentos realizados *in vitro*, se ha comprobado que el receptor puede fosforilar un gran número de proteínas, incluyendo histonas y calmodulina.

Los receptores de insulina de músculo esquelético de las ratas diabéticas se incubaron

en ausencia y presencia de insulina 10^{-7} M y con el sustrato exógeno Glu4:Tyr1.

Podemos observar (Figura 24) que la fosforilación basal (producida en ausencia de insulina) de Glu4:Tyr1 no fue significativamente diferente en los cuatro grupos de ratas diabéticas post-STZ. Lo mismo ocurrió al examinar la fosforilación de Glu4:Tyr1 estimulada por insulina 10^{-7} M. El incremento de la actividad tirosina quinasa sobre el valor basal inducido por insulina 10^{-7} M fue similar en las ratas diabéticas post-STZ tratadas o sin tratar.

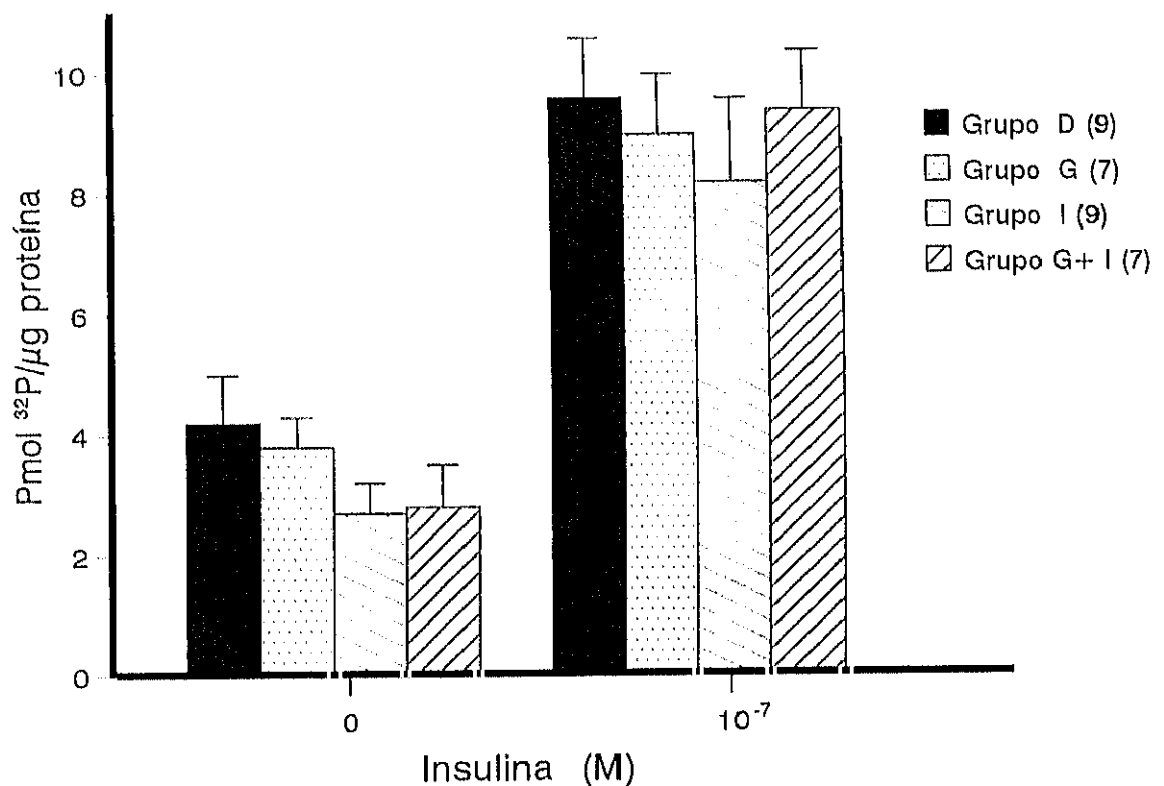


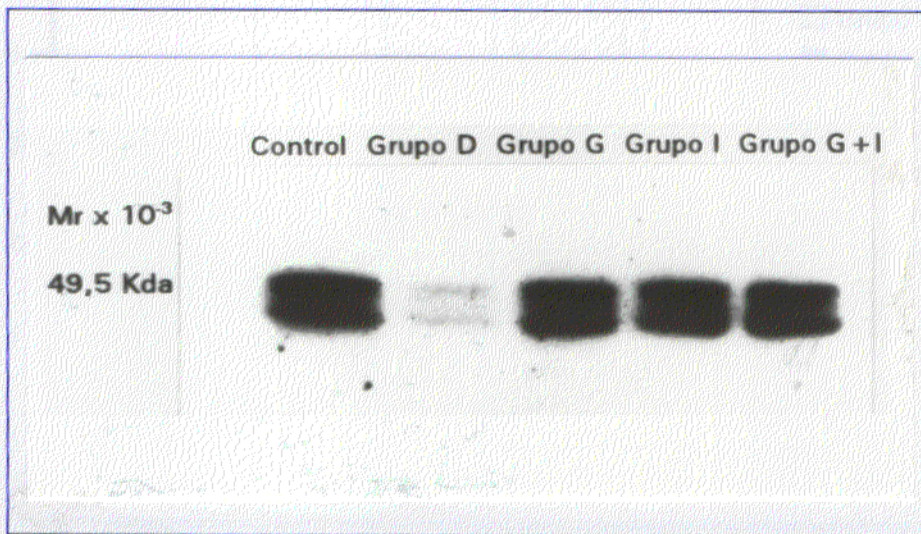
Figura 24. Fosforilación del sustrato Glu4:Tyr1 por receptores de insulina parcialmente purificados del tejido muscular de ratas con diabetes post-STZ. Los resultados representan la media \pm EEM. El número de determinaciones aparece entre paréntesis.

2.1.6 ANALISIS DEL CONTENIDO TOTAL DEL GLUCOTRANSPORTADOR GLUT4.

Para estudiar el efecto de la gliclacida sobre el transportador GLUT4, se determinó el contenido total del glucotransportador por análisis de Western-blot utilizando un anticuerpo policlonal contra la región carboxi-terminal del GLUT4.

Se cuantificó el contenido total del transportador GLUT4 en los músculos gastrocnemius de los cuatro grupos de ratas diabéticas post-STZ, así como en un grupo de ratas no diabéticas (Grupo C).

El tratamiento con gliclacida no modificó el peso molecular del transportador, observándose en la autorradiografía una banda, cuya movilidad electroforética era semejante a la de una proteína de 50 Kda de peso molecular, tanto en las ratas diabéticas post-STZ, como en el grupo control (Fotografía 8).



Fotografía 8. Análisis por Western-blot del contenido total de la proteína transportadora GLUT4 en el músculo esquelético de ratas diabéticas post-streptozotocina y en ratas no diabéticas. Autorradiografía representativa de los efectos del tratamiento con gliclacida de ratas diabéticas post-STZ sobre los niveles proteicos de GLUT4 en el músculo esquelético.

Cuando las bandas fueron densitometradas, observamos (Figura 25) que la concentración del glucotransportador GLUT4 era significativamente menor ($p < 0,05$) en las ratas diabéticas sin tratar que en los otros tres grupos de ratas diabéticas post-STZ tratadas. Además, el contenido total de GLUT4 fue superior ($p < 0,05$) en el Grupo C que en el Grupo D, sin embargo no se encontraron diferencias entre el grupo de ratas no diabéticas y los otros tres grupos de ratas diabéticas tratadas con gliclacida, con insulina o, conjuntamente con gliclacida e insulina.

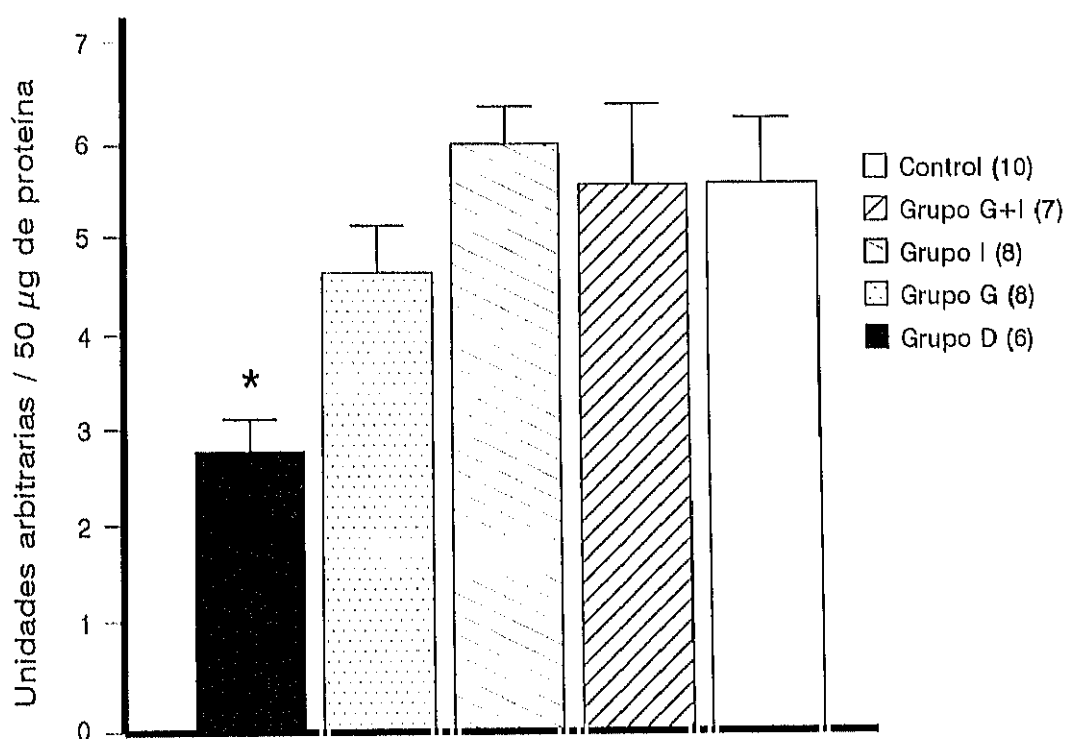


Figura 25. Efecto de la gliclacida sobre la concentración de GLUT4 en el músculo esquelético. Se analizó el contenido de GLUT4 en los músculos gastrocnemius extraídos de ratas diabéticas post-STZ que recibieron diferentes tratamientos durante 12 días y en los músculos de ratas no diabéticas usadas como grupo control. Media \pm EEM; * $p < 0,05$ vs Grupo C.

2.2 RATAS MACHO WISTAR DIABÉTICAS POST-STREPTOZOTOCINA MANTENIDAS CON CICLO INVERTIDO (OSCURIDAD/LUZ) DE 12 HORAS.

Como habíamos observado en el apartado anterior (2.1), las ratas diabéticas post-STZ tratadas con gliclacida e insulina durante 12 días presentaron una captación de glucosa tanto basal como estimulada con insulina (10^{-9} ó 10^{-7} M) similar a la de las ratas no diabéticas (control). En el grupo de ratas diabéticas tratadas sólo con insulina la captación basal de glucosa era similar a la del grupo control, pero la captación de glucosa estimulada con insulina, tanto a concentraciones fisiológicas como suprafisiológicas, era significativamente inferior con respecto al grupo de ratas no diabéticas y al grupo de ratas diabéticas post-STZ tratadas conjuntamente con gliclacida e insulina. Aunque las glucemias a lo largo del tratamiento fueron más bajas en el grupo G+I que en el Grupo I, no alcanzaron diferencias significativas, a pesar de ello veíamos que la captación de glucosa en las ratas diabéticas sólo se normalizaba cuando se trataban conjuntamente con gliclacida e insulina.

Para poder conocer si el control glucémico en las ratas diabéticas post-STZ a lo largo del tratamiento con gliclacida e insulina era mejor que el de las ratas diabéticas tratadas con insulina, se diseñó un protocolo de estudio similar al anterior (2.1) pero con un ciclo de luz invertida (puesto que las ratas comen y son metabólicamente más activas de noche), para realizar determinaciones de glucemia cuatro veces al día a lo largo del tratamiento.

Se indujo diabetes según el apartado anterior y se siguieron dos modalidades de tratamiento durante 12 días, así un grupo de ratas diabéticas fue tratado con insulina a las 8 de la mañana, mientras que otro grupo se trató conjuntamente con gliclacida (5 mg/kg) dos veces al día e insulina.

Tras los 12 días de tratamiento, las ratas diabéticas tratadas sólo con insulina ganaron peso (peso final $116 \pm 3\%$ del inicial) y las tratadas conjuntamente con gliclacida e insulina también ganaron peso (peso final $110 \pm 3\%$ del inicial). El peso final fue similar en ambos grupos de ratas. Tampoco hubo diferencias con respecto al peso ganado por las ratas diabéticas con ciclo de luz normal del apartado anterior que recibieron el mismo tratamiento.

2.2.1 NIVELES SERICOS DE GLUCOSA

En ambos grupos se realizaron determinaciones de glucemia cuatro veces al día (8 y 12 de la mañana, 4 y 8 de la tarde). El día de la perfusión, tras 14 horas de ayuno, también se determinaron los niveles de glucosa en sangre.

Las ratas diabéticas post-STZ tratadas con insulina tuvieron rangos individuales medios diarios de glucemia entre 74 y 240 mg/dl. El rango individual medio diario de glucosa sérica en las ratas diabéticas tratadas con gliclacida e insulina estuvo entre 63 y 136 mg/dl.

Los niveles de glucemia a lo largo del tratamiento fueron más bajos en el Grupo G+I que en el Grupo I (98 ± 5 vs 139 ± 15 mg/dl, $p < 0,05$).

Las glucemias obtenidas a lo largo de los 12 días de tratamiento a las 8 de la mañana (12 horas después de la administración de gliclacida) fueron similares en ambos grupos de ratas. Sin embargo, los niveles de glucosa en sangre a las 12 de la mañana (4 horas después de la administración de la primera dosis de gliclacida) de las ratas diabéticas tratadas con gliclacida e insulina fueron significativamente inferiores con respecto al grupo de ratas diabéticas tratadas sólo con insulina (Tabla XV). Las determinaciones glucémicas realizadas el resto del día (4 y 8 de la tarde) fueron similares en ambos grupos.

Las glucemias obtenidas el día de la perfusión (24 horas después de la última dosis de insulina, tras 14 horas de ayuno, y de la administración de la última dosis de gliclacida) en el grupo de ratas diabéticas post-STZ tratadas con insulina fueron similares a las obtenidas en el grupo de ratas diabéticas tratadas conjuntamente con gliclacida e insulina (Grupo I = 145 ± 23 vs Grupo G+I = 129 ± 12 , n.s.)

Tabla XV. Niveles séricos de glucosa en las ratas diabéticas. Glucemias (mg/dl) obtenidas a lo largo de los 12 días de tratamiento en las ratas diabéticas mantenidas con ciclo de luz invertido tratadas con insulina o con gliclacida e insulina. Los datos representan la media \pm EEM; el número de determinaciones aparece entre paréntesis.

	GRUPO I	GRUPO G+I	p vs Grupo I
8 a.m.	158 \pm 35 (35)	147 \pm 10 (30)	n.s.
12 a.m.	97 \pm 14 (21)	54 \pm 10 (20)	p < 0,05
4 p.m.	100 \pm 15 (21)	77 \pm 10 (20)	n.s.
8 p.m.	171 \pm 24 (23)	130 \pm 15 (20)	n.s.

Aunque, las ratas tratadas con gliclacida e insulina tenían unos niveles de glucosa en sangre muy bajos cuatro horas después de la administración de la gliclacida (12 de la mañana), los niveles de glucemia iban aumentando a lo largo del día y las ratas superaban bien la hipoglucemia, por lo que se mantuvo la dosis de insulina, para así poder estudiar las glucemias de ambos grupos de ratas con el mismo tratamiento insulínico.

2.2.2 NIVELES SERICOS DE PEPTIDO C

Se realizaron determinaciones de péptido C para conocer si la disminución de la glucosa sérica en las ratas diabéticas tratadas con glielacida e insulina se producía porque la sulfonilurea estimulaba la secreción de insulina, o si por el contrario, la disminución de la glucemia era debida a efectos extrapancreáticos producidos por la glielacida.

El día de inicio del tratamiento (3 días después de la administración de estreptozotocina) los niveles séricos de péptido C fueron similares en ambos grupos de ratas. Tampoco se encontraron diferencias en los niveles de péptido C de ambos grupos obtenidos el día en que las ratas fueron perfundidas.

TABLA XVI. Niveles séricos de péptido C en el día de inicio del tratamiento y en el día de la perfusión de extremidades inferiores. La concentración de péptido C de las ratas diabéticas tratadas con glielacida o con glielacida e insulina se expresa en pmol/ml. Media \pm EEM. El número de ensayos aparece entre paréntesis.

	DIA 0	DIA 13
GRUPO I	0,37 \pm 0,08 (5)	0,43 \pm 0,06 (5)
GRUPO G+I	0,31 \pm 0,08 (5)	0,31 \pm 0,06 (5)

2.2.3 CAPTACION DE GLUCOSA POR LAS EXTREMIDADES INFERIORES.

Una vez finalizados los doce días de tratamiento las ratas diabéticas post-STZ fueron perfundidas para medir la captación de glucosa en ausencia (captación basal) y en presencia de cantidades crecientes de insulina (10^{-9} y 10^{-7} M).

Captación basal de glucosa

La captación de glucosa obtenida cuando las ratas fueron perfundidas en ausencia de insulina fue similar en los dos grupos de ratas diabéticas (Grupo I, Grupo G+I), además cuando comparamos la captación basal de glucosa por las extremidades inferiores obtenida en las ratas diabéticas observamos que no fue diferente de la obtenida en el grupo de ratas no diabéticas (Figura 26).

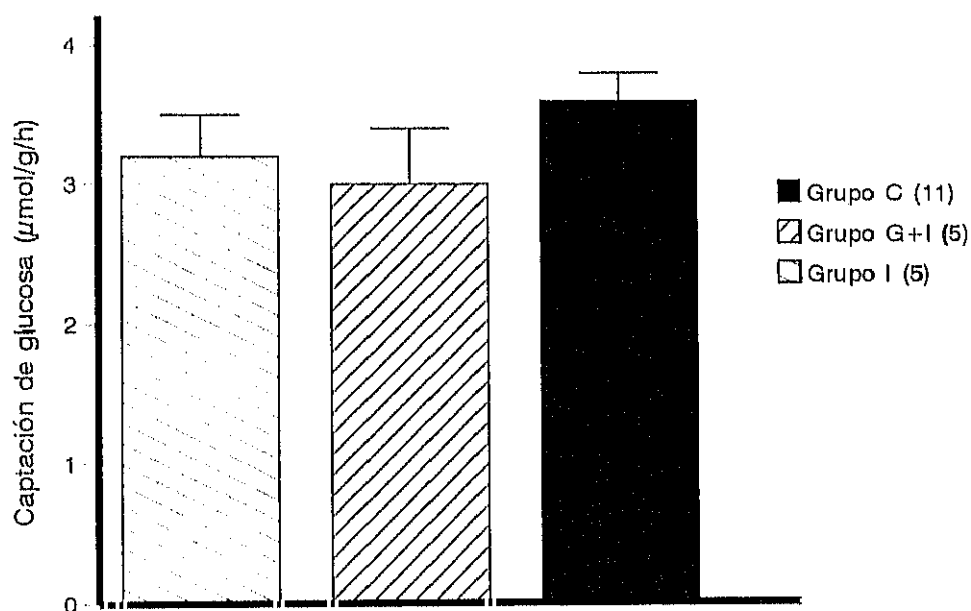


Figura 26. *Captación basal de glucosa por las extremidades inferiores.* Tras los 12 días de tratamiento las ratas diabéticas post-STZ fueron perfundidas en ausencia de insulina (situación basal) durante 30 min. Media \pm BEM. El número de ensayos aparece entre paréntesis.

La captación basal de glucosa por las extremidades inferiores de los dos grupos de ratas diabéticas mantenidas con luz invertida fue similar a la obtenida en las ratas diabéticas mantenidas con luz normal que recibieron tratamiento sólo con insulina o con gliclacida e insulina (apartado 2.1.3)

Captación de glucosa estimulada por insulina

A la concentración de insulina 10^{-9} M, las ratas del Grupo I presentaron una captación de glucosa inferior a la de las ratas del Grupo G+I. Al comparar la captación de glucosa estimulada por insulina 10^{-9} M por las extremidades inferiores del grupo de ratas no diabéticas, las ratas diabéticas tratadas conjuntamente con insulina y gliclacida presentaron un valor similar, mientras que las ratas diabéticas tratadas con insulina tuvieron una captación de glucosa significativamente inferior (Figura 27).

Cuando los valores de la captación basal de glucosa fueron sustraídos de los valores obtenidos en presencia de insulina 10^{-9} M, observamos que el incremento obtenido en presencia de concentraciones fisiológicas de insulina (10^{-9} M) fue inferior en las ratas diabéticas tratadas sólo con insulina ($p < 0,05$) respecto a las ratas tratadas con gliclacida e insulina. Las ratas del grupo G+I presentaron un incremento similar al del grupo de ratas no diabéticas (Grupo C), sin embargo el incremento en la captación de glucosa obtenido con insulina a la concentración 10^{-9} M fue significativamente inferior en el grupo de ratas diabéticas tratadas con insulina con respecto al grupo de ratas no diabéticas (Grupo C).

La captación de glucosa estimulada por insulina (10^{-9} M) así como el incremento sobre el valor basal en el músculo esquelético de las ratas del Grupo I y del Grupo G+I mantenidas con luz invertida fueron similares a los obtenidos en las ratas diabéticas mantenidas con luz normal que recibieron tratamiento sólo con insulina o con gliclacida e insulina (apartado 2.1.3)

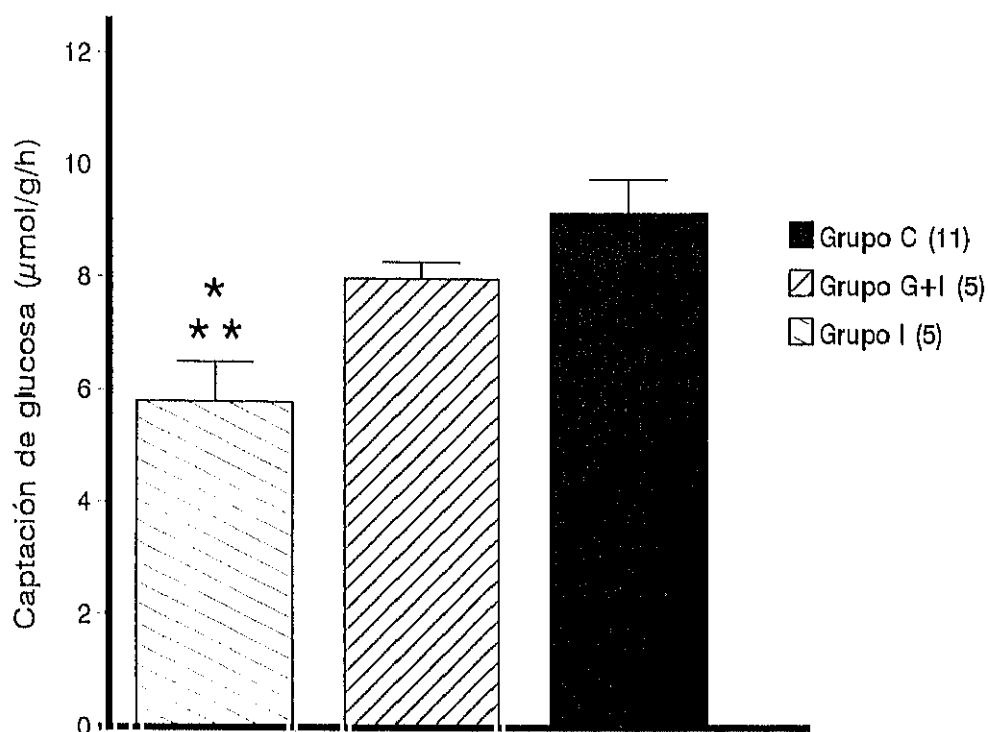


Figura 27. Captación de glucosa estimulada por insulina 10^9 M en el músculo esquelético. Tras 30 min de captación basal las extremidades inferiores se perfundieron otros 30 min con insulina 10^9 M, manteniéndose la perfusión otro 30 min. Media \pm EEM; * $p < 0,05$ vs Grupo G+I, ** $p < 0,01$ vs Grupo C.

Cuando las extremidades inferiores se perfundieron con insulina a la concentración de insulina 10^{-7} M, la captación de glucosa por el músculo esquelético en las ratas diabéticas del Grupo I fue inferior ($p < 0,05$), que la obtenida en las ratas diabéticas tratadas con gliclacida e insulina. Al comparar estos resultados con los de la captación muscular de glucosa estimulada por insulina 10^{-7} M en el grupo de ratas no diabéticas (Figura 28), las ratas diabéticas tratadas con gliclacida e insulina presentaron valores similares, mientras que las ratas diabéticas tratadas sólo con insulina tuvieron valores inferiores ($p < 0,05$).

El incremento sobre la captación basal obtenido cuando las ratas fueron perfundidas con concentraciones suprafisiológicas de insulina (10^{-7} M) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) en las ratas del grupo I con respecto a las ratas del grupo G+I. Sólo las

ratas diabéticas tratadas conjuntamente con gliclacida e insulina tuvieron un incremento similar al de las ratas diabéticas no tratadas (Grupo C).

La captación de glucosa estimulada por insulina (10^{-9} M), así como el incremento obtenido a esta concentración de insulina sobre la captación basal por las extremidades inferiores de los dos grupos de ratas diabéticas mantenidas con luz invertida, fue similar a la obtenida en las ratas diabéticas mantenidas con luz normal que recibieron tratamiento sólo con insulina o con gliclacida e insulina (apartado 2.1.3).

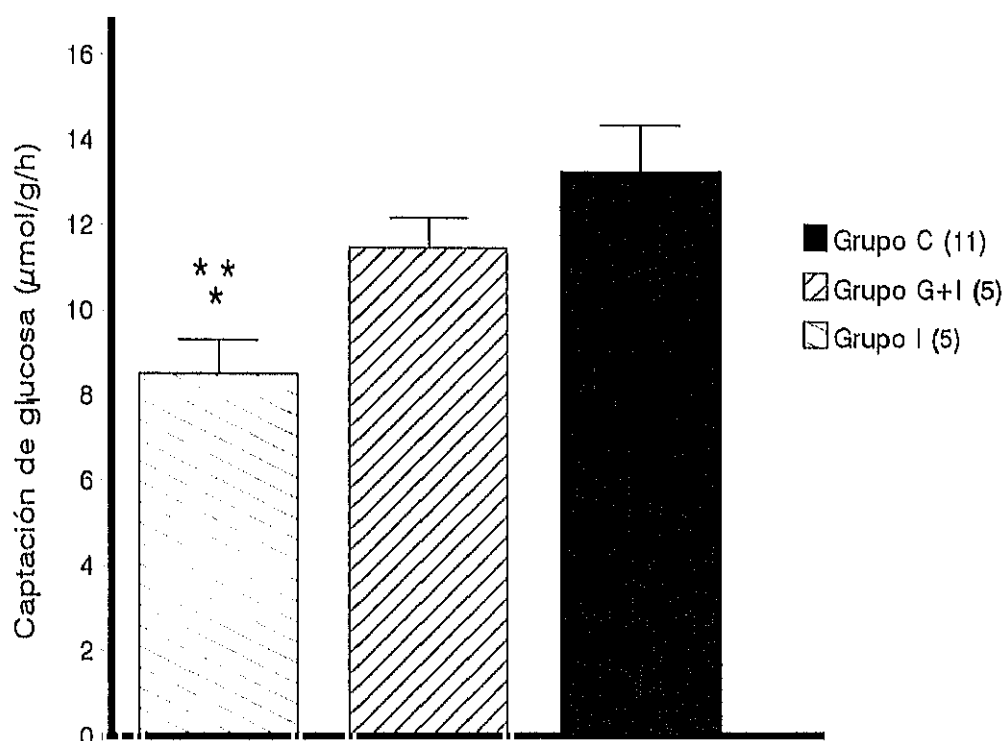


Figura 28. Captación de glucosa estimulada por insulina 10^{-7} M por las extremidades inferiores. Las extremidades inferiores fueron perfundidas durante 30 min con concentraciones suprafiológicas de insulina (10^{-7} M). Media \pm EEM; * $p < 0,05$ vs Grupo G+I; ** $p < 0,01$ vs Grupo C.

En la tabla XVII podemos observar las captaciones de glucosa obtenidas en ausencia y presencia de insulina, así como los incrementos, de los dos grupos de ratas diabéticas post-STZ y del grupo de ratas no diabéticas (Grupo C).

Tabla XVII. Captación de glucosa por las extremidades inferiores. Las extremidades inferiores de los dos grupos de ratas diabéticas post-STZ mantenidas con ciclo de luz invertido se perfundieron en ausencia y presencia de insulina. Los datos representan la media \pm EEM de 5 determinaciones para cada grupo. * $p < 0,01$ vs Grupo C.

	Basal	Ins 10^{-9} M	Incremento	Ins 10^{-7} M	Incremento
GRUPO I	$3,2 \pm 0,3$	$5,8 \pm 0,6^*$	$2,6 \pm 0,4^*$	$8,5 \pm 0,6^*$	$5,3 \pm 0,6^*$
GRUPO G+I	$3,0 \pm 0,4$	$8,0 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,4$	$11,5 \pm 0,6$	$8,5 \pm 0,7$
GRUPO C	$3,6 \pm 0,2$	$9,2 \pm 0,6$	$5,6 \pm 0,7$	$13,4 \pm 0,9$	$9,8 \pm 1,0$

DISCUSSION

DISCUSION

1. EFECTO AGUDO DE LA GLICLACIDA SOBRE LA CAPTACION DE GLUCOSA EN EL MUSCULO ESQUELETICO DE RATAS NORMALES.

Como decíamos en la introducción, los efectos extrapancreáticos de las sulfonilureas han sido estudiados durante más de 30 años. Sin embargo actualmente siguen siendo motivo de controversia.

Se han realizado numerosos estudios sobre los efectos de las sulfonilureas en células cultivadas para discernir el mecanismo de acción de estas drogas en situaciones donde la insulina no esté presente.

En la línea celular miogénica L6 se ha observado que una sulfonilurea de segunda generación (gliburide) estimula el transporte de glucosa vía proteína quinasa C, requiriendo nueva síntesis de proteínas (194). En miocitos cultivados (BC3H1) se ha visto que las sulfonilureas incrementan directamente la captación de glucosa independientemente de la acción de la insulina (195). En las células musculares L6 se ha referido que tolazamida (sulfonilurea de primera generación) no tiene un efecto directo sobre la captación de glucosa (107), pero incrementa tanto el contenido total del glucotransportador GLUT4 como sus niveles de mRNA (108). En la línea celular adipocitaria 3T3-L1, la tolbutamida estimula directamente el transporte de glucosa, y además, incrementa el contenido total de los transportadores GLUT4 y GLUT1 y sus niveles de mRNA (196).

Por tanto, se ha visto que las sulfonilureas tienen un efecto directo sobre la utilización de la glucosa y este efecto puede ser inmediato o requerir nueva síntesis de proteínas.

En nuestro estudio hemos visto que la gliclacida, una sulfonilurea de segunda generación, estimula la captación de glucosa en las extremidades inferiores de ratas normales. Este efecto fue inmediato y no requirió la adición de insulina. La dosis más baja

necesaria para producir un incremento significativo en la captación de glucosa fue $10 \mu\text{g/ml}$ y la mitad del máximo efecto se alcanzó con concentraciones de gliclacida entre 25 y $50 \mu\text{g/ml}$. La concentración de gliclacida de $10 \mu\text{g/ml}$ está en el rango de los niveles terapéuticos encontrados en humanos a los que se les ha administrado gliclacida oralmente (197). En este estudio se han usado concentraciones de gliclacida en un rango muy amplio, hasta $1000 \mu\text{g/ml}$, 10 veces superior a la concentración terapéutica. La mayoría de los investigadores usan concentraciones de sulfonilureas para observar los efectos extrapancreáticos entre 10 y 1000 veces superiores a aquellas necesarias para estimular la liberación de insulina. Esta observación sugiere la presencia de sitios de baja afinidad para sulfonilureas en tejidos diana de la insulina y/o una disminución en la sensibilidad de los tejidos tras el proceso de preparación para los experimentos *in vitro*. Por otro lado, es bien conocido que las sulfonilureas se unen a proteínas plasmáticas (del 88 al 99%), incluida la albúmina. En el medio de perfusión la proporción de albúmina es del 4%, por lo que la gliclacida se unirá a ella, y se sabe, que sólo la parte libre de la droga (no ligada a proteínas) tiene actividad biológica, por lo que no podemos precisar la concentración de droga activa libre.

La gliclacida a la concentración de $300 \mu\text{g/ml}$ tiene un efecto sobre la captación de glucosa por el músculo esquelético similar al obtenido con insulina a concentraciones fisiológicas de 10^{-9} M.

Además de este efecto directo de la gliclacida sobre la captación de glucosa, en este estudio hemos observado que la sulfonilurea tiene un efecto aditivo al de la insulina. La combinación de gliclacida a la concentración de $300 \mu\text{g/ml}$ y la insulina a la concentración de 10^{-9} M, produjo un incremento en la captación muscular de glucosa similar al encontrado con concentraciones suprafisiológicas de insulina (10^{-7} M). En adipocitos 3T3-L1, se ha visto un aumento de la captación de glucosa en respuesta a tolbutamida y además se observó un efecto aditivo cuando las células se incubaron con la sulfonilurea y la insulina (113).

El efecto de la gliclacida y de la insulina sobre la captación de glucosa en este sistema de perfusión de extremidades inferiores fue muy rápido y observamos un aumento de la captación de glucosa 5 minutos después de la adición de las drogas en el medio de perfusión. Esta falta de retraso en el efecto de la insulina debe de estar relacionado con las

características de este sistema, puesto que otros autores han referido también un efecto rápido de la insulina sobre la captación de la glucosa en la perfusión de extremidades inferiores (198,199). También es muy interesante señalar que la desaparición de la glucosa en el medio de perfusión fuera lineal. Aunque aparentemente este hecho no respondería al conocido efecto masa de la glucosa, consideramos que el rango de concentraciones en el medio de perfusión después de la introducción de la insulina o de la gliclacida (entre 90 y 45 mg/dl) es demasiado estrecho para establecer conclusiones.

El efecto estimulador de la gliclacida sobre la captación de glucosa por el músculo esquelético fue totalmente revertido por diazóxido. Además, la presencia del diazóxido en el medio de perfusión bloqueó la acción de la gliclacida sobre la captación de glucosa por las extremidades inferiores de las ratas. Sin embargo, el efecto estimulador de la insulina sobre la captación de glucosa no se modificó por la presencia de diazóxido en el medio de perfusión. Estos resultados indican que el efecto agudo de la gliclacida sobre la captación de glucosa por el músculo esquelético es producido por la inhibición de los canales de K^+ ATP dependientes. La adición del diazóxido en el medio de perfusión no produjo una disminución de la presión del sistema. Se ha referido que en humanos normotensos, la administración de diazóxido intravenoso sólo produce una pequeña disminución en la presión arterial de aproximadamente 10 mm Hg (200). En las preparaciones de las extremidades inferiores la presión estuvo entre 80 y 100 mm Hg, indicando una falta de resistencia vascular, por lo que en estas condiciones experimentales el efecto vascular del diazóxido sería menor. Por otro lado, se ha visto que la administración de diazóxido i.v. a pacientes tratados con sulfonilureas no disminuye la presión sanguínea (201).

Los efectos de las sulfonilureas sobre la bomba Na^+/K^+ ATPasa han sido estudiados en islotes pancreáticos de ratas, y se han obtenido resultados contradictorios, habiéndose observado tanto un efecto inhibitorio de la bomba Na^+/K^+ ATPasa (202) como una falta de efecto en presencia de las sulfonilureas (203). Por otro lado, está bien demostrado que las sulfonilureas y el diazóxido ejercen opuestos sobre los canales de K^+ ATP dependientes en las células β -pancreáticas.

Los canales de K^+ ATP dependientes y los receptores de sulfonilureas están funcionalmente unidos. Se ha demostrado la existencia de mutaciones en el gen del receptor

de sulfonilureas en niños con persistente hiperinsulinemia e hipoglucemia (136). El receptor de sulfonilureas tendría, por tanto, un papel central en la regulación de la secreción de insulina. Así mismo, pudiera ser que mutaciones en los receptores de sulfonilureas en tejidos diana de la insulina jugaran un papel importante en la insulinoresistencia de la DMNID.

Se han encontrado sitios de alta afinidad para sulfonilureas en el músculo esquelético y en el músculo liso (132,133). Puede ser que la acción de la gliclacida sobre la captación de glucosa por el músculo esquelético ocurra a través de los canales de K^+ ATP dependientes presentes en el músculo liso (induciendo cambios en el flujo de perfusión en los tejidos) o bien directamente en los canales presentes en el músculo esquelético. Sin embargo, el hecho de no haber observado ningún cambio en la presión del sistema durante los estudios de perfusión con gliclacida o diazóxido sugieren un mecanismo directo a través de los canales de K^+ ATP dependientes del músculo esquelético.

En pacientes con DMNID se ha observado que las sulfonilureas aumentan la utilización de la glucosa estimulada por insulina durante estudios de *clamp euglicémico* (102,191,194). En adipocitos aislados se ha observado que las sulfonilureas aumentan el transporte de glucosa estimulado por insulina, la oxidación de la glucosa y la lipogénesis, incrementando la translocación del glucotransportador GLUT4 a la membrana plasmática y estimulando la síntesis de glucógeno (205-207).

En nuestro estudio la gliclacida estimula el movimiento del GLUT4 desde un compartimento intracelular hasta la membrana plasmática. La pureza de las fracciones enriquecidas con membranas plasmáticas o con microsomas de baja densidad se realizó determinando las actividades enzimáticas específicas para cada fracción. En nuestro estudio, la contaminación de ambas fracciones obtenidas a partir de homogenados de músculo esquelético fue similar a la encontrada por Bader y colaboradores en el músculo esquelético (182).

Frente a un estímulo de gliclacida a la concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$ la fracción de membranas plasmáticas contenía dos veces más GLUT4 que en situación basal. Lo mismo ocurrió frente a un estímulo con insulina a la concentración de 10^{-9} M. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en la captación de glucosa por las extremidades

inferiores de las ratas en presencia de gliclacida (300 $\mu\text{g/ml}$), donde se alcanzaba un *plateau* a dicha concentración, siendo la captación de glucosa por el músculo esquelético similar a la obtenida con insulina 10^{-9} M. La captación de glucosa obtenida con insulina 10^{-7} M fue similar a la obtenida con gliclacida (300 $\mu\text{g/ml}$) junto con insulina (10^{-9} M); en estas situaciones la cantidad de GLUT4 presente en la membrana plasmática era similar en los músculos gastrocnemius que habían sido perfundidos con insulina sólo a la concentración de 10^{-7} M, o conjuntamente con gliclacida (300 $\mu\text{g/ml}$) e insulina (10^{-9} M). El estudio de Muller y colaboradores (208) ha referido un efecto estimulador de glimepiride (sulfonilurea de segunda generación) sobre el transporte de glucosa en adipocitos aislados de ratas en lo que se indujo insulinoresistencia por incubación con altas concentraciones de glucosa e insulina. Esta estimulación del transporte en presencia de la sulfonilurea estaba mediada por la translocación de los glucotransportadores GLUT4 y GLUT1 a la membrana plasmática y por el incremento en la actividad intrínseca del GLUT4, debido a una disminución de su fosforilación.

El efecto aditivo de la gliclacida (300 $\mu\text{g/ml}$) y de la insulina (10^{-9} M) sobre la captación muscular de glucosa, se puede relacionar con un aumento del número de transportadores en la membrana plasmática, puesto que en esta situación el número de transportadores presentes en la membrana plasmática es mayor que cuando en el medio de perfusión se añadió gliclacida o bien insulina. No podemos saber si este efecto aditivo ocurre a través de dos vías intracelulares diferentes o bien a través del mismo. Parece que las sulfonilureas estimulan el transporte a nivel post-receptor, con nuestros datos no podemos deducir si las sulfonilureas y la insulina, en algún momento, pueden tener un camino intracelular común.

Nuestros resultados apoyan un mecanismo hipotético de acción, en el que las sulfonilureas actuarían de forma similar (a través de canales de K^+ ATP dependientes) en las células β -pancreáticas estimulando la secreción de insulina y en el músculo esquelético estimulando la utilización de la glucosa.

2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GLICLACIDA EN RATAS CON DIABETES POST-ESTREPTOZOTOCINA

Las sulfonilureas constituyen los hipoglucemiantes orales más utilizados en el tratamiento de la DMNID. Se ha referido que en pacientes tratados con sulfonilureas, con el paso del tiempo persistían los niveles de glucemia más bajos, a pesar de que la secreción de insulina era similar a la del comienzo del tratamiento; estos datos apoyan el hecho de que, la acción hipoglucemiante de estas drogas a largo plazo radica fundamentalmente en un mecanismo extrapancreático.

En nuestro estudio las ratas diabéticas post-STZ presentaron a lo largo del tratamiento unos niveles glucémicos más bajos en las ratas tratadas con gliclacida que en las que no recibieron tratamiento. Por otro lado, la glucosa en sangre fue inferior en las ratas diabéticas post-STZ tratadas conjuntamente con gliclacida e insulina, o con insulina sola que en las ratas tratadas sólo con gliclacida. Esta disminución de la glucosa en sangre no puede ser explicada por un efecto estimulador de la gliclacida sobre la secreción de insulina, puesto que aunque las ratas diabéticas post-STZ tenían niveles bajos de insulina sérica, éstos no se modificaron durante los 12 días de tratamiento. Otros estudios han referido que tras tratamientos con sulfonilureas, los niveles de insulina en sangre eran similares a los existentes antes del tratamiento, e incluso en algunos casos eran inferiores (101,209,210). En nuestro caso, los cuatro grupos de ratas diabéticas tenían la misma concentración de insulina en sangre, independientemente de si habían sido tratadas o no, y del tipo de tratamiento recibido. Los niveles de insulina en ayunas y post-prandiales eran similares en las ratas diabéticas, por lo que la capacidad secretora de insulina en respuesta a una ingesta de estas ratas está disminuída. Otro dato de la insulinopenia relativa de estas ratas con diabetes post-STZ, es la inadecuada secreción de insulina en relación a la hiperglucemia que presentan.

Por tanto, la disminución de la glucosa sérica en las ratas diabéticas tratadas con gliclacida con respecto a las ratas no tratadas, no puede ser explicada por un aumento de la insulina circulante. Estos resultados apoyan posibles efectos extrapancreáticos de la sulfonilurea.

La disminución de la glucemia podría ser explicada por una mejor utilización de la glucosa en el músculo esquelético. De hecho, las ratas diabéticas post-STZ tratadas con gliclacida tuvieron una captación basal de glucosa similar a la de las ratas normales, y superior a la obtenida en las ratas diabéticas que no recibieron tratamiento. Además, las ratas diabéticas post-STZ tratadas con la sulfonilurea presentaron una captación de glucosa estimulada por concentraciones suprafisiológicas de insulina (10^{-7} M) superior a la de las ratas diabéticas no tratadas, aunque inferior a la de las ratas normales. Sólo las ratas diabéticas post-STZ tratadas conjuntamente con gliclacida e insulina tuvieron una captación de glucosa (tanto basal como estimulada por insulina) similar a la de las ratas no diabéticas.

Algunos investigadores han referido una disminución en la utilización de la glucosa por el músculo esquelético en ratas diabéticas post-STZ con respecto a ratas no diabéticas (211). Otros autores han observado que en preparaciones de intestino y páncreas de ratas diabéticas perfundidas con gliclacida o insulina se produce un aumento de la utilización de la glucosa. Además este efecto fue aumentado cuando ambas drogas estaban presentes en el medio de perfusión (212).

Como ya se ha visto en la introducción, la insulina inicia sus acciones biológicas a través de su unión a la subunidad α del receptor, ello provoca una rápida autofosforilación de la subunidad β , que a su vez, sirve para estimular la actividad tirosina quinasa del receptor hacia sustratos intracelulares (32,33,37).

Se ha observado un incremento en el efecto de la insulina sobre la actividad glucógeno sintetasa muscular en pacientes con DMNID tratados con gliclacida (148). Este efecto de la gliclacida sobre la actividad glucógeno sintetasa tuvo lugar en ausencia de cambios en la unión de la insulina a receptores parcialmente purificados o en la actividad tirosina quinasa del receptor (148).

Estudios en adipocitos aislados han mostrado que las sulfonilureas incrementan el transporte de glucosa estimulado por insulina, así como la oxidación de la glucosa y la lipogénesis, sin embargo estos efectos no se acompañan con un aumento de la unión de la insulina a los receptores aislados de adipocitos, sugiriendo que la acción predominante de las sulfonilureas sobre la utilización de la glucosa en adipocitos ocurre en un nivel posterior de la unión de la insulina a su receptor (102,105).

Bajo nuestras condiciones de ensayo, pudimos comprobar que los receptores de insulina aislados de los músculos gastrocnemius de las ratas diabéticas post-STZ sin tratar o tratadas con gliclacida siguen una cinética de unión semejante, además no observamos diferencias al analizar las características de esta unión, así ambos grupos de ratas presentaban valores similares de unión específica y de afinidad. Estos hechos también fueron observados cuando a los datos de unión de la insulina se les aplicó el análisis de Scatchard (188). La representación que se suele obtener en los estudios de unión de insulina mediante este análisis es curvilínea, indicando que la afinidad de la reacción no es uniforme sobre el rango de saturación. En nuestro estudio hemos obtenido representaciones de Scatchard curvilíneas para la unión de la insulina a los receptores de músculo de ratas diabéticas post-STZ sin tratar o tratadas con gliclacida, presentando valores similares en cuanto a la máxima capacidad de unión para los sitios de alta y baja afinidad.

En receptores de insulina parcialmente purificados de hígado de ratas normales tratadas con glipicida o tolazamida, se ha visto que la unión de la insulina no se modificaba por el tratamiento con sulfonilureas (213).

Igualmente, en nuestro estudio no encontramos diferencias en la máxima capacidad de unión de la insulina, ni en la afinidad aparente de la insulina a los receptores de músculo de ratas diabéticas post-STZ tratadas sólo con insulina o conjuntamente con gliclacida e insulina. Por tanto, no encontramos diferencias en la cinética de unión de la ^{125}I -insulina a los receptores parcialmente purificados de músculo esquelético de los cuatro grupos de ratas diabéticas post-STZ tratadas o sin tratar.

Algunos trabajos han referido un aumento de la unión de la insulina al receptor en adipocitos (214) y hepatocitos (215) de ratas diabéticas post-STZ. En el trabajo de Burant y colaboradores (216) hay un aumento del número de receptores de insulina en el músculo esquelético de ratas diabéticas post-STZ. El número de receptores disminuyó cuando las ratas diabéticas fueron tratadas con insulina.

En nuestro estudio no hemos observado diferencias ni en la unión de la insulina al receptor, ni en el número de receptores en las ratas diabéticas sin tratar y en las tratadas con insulina, si bien en el trabajo de Burant y colaboradores las diferencias en los niveles glucémicos de ambos grupos de ratas eran mucho mayores (510 ± 14 vs 94 ± 6), que las

diferencias en las glucemias entre nuestros dos grupos de ratas (359 ± 9 vs 194 ± 10). Además, el tratamiento insulínico recibido por las ratas en nuestro estudio y en el de Burant fue diferente.

Estas diferencias también se han encontrado en los estudios realizados en receptores de insulina parcialmente purificados de músculo esquelético en humanos, así hay autores que sugieren igual número de receptores y constante de afinidad para los pacientes con DMNID y para los pacientes diabéticos obesos con respecto a un grupo de sujetos no diabéticos, tanto obesos como no obesos (217). Sin embargo, otros autores han observado una disminución de la unión de la insulina en sujetos obesos no diabéticos y en sujetos obesos con DMNID, respecto a un grupo de sujetos controles no obesos. En ambos estudios la afinidad aparente de los sitios de unión para la insulina fue similar en los tres grupos.

Una vez visto que las características de unión de la insulina a sus receptores eran similares en las ratas diabéticas tratadas con gliclacida y en las no tratadas, estudiamos el siguiente paso en el mecanismo de acción de la insulina.

Tras la unión de la insulina al receptor se produce un cambio conformacional de la subunidad α y se activa la enzima tirosina quinasa presente en la subunidad β del receptor de insulina. La activación de dicha enzima produce la fosforilación en residuos tirosina de la propia subunidad β del receptor de insulina (autofosforilación); así como la fosforilación de otros sustratos intracelulares, o de sustratos aportados al sistema de ensayo.

Diversos investigadores han demostrado que en pacientes tratados con sulfonilureas en los que aumentaba el transporte de glucosa en adipocitos, no se observaban cambios en la actividad tirosina quinasa del receptor (219). También se ha referido que en pacientes tratados con gliclacida, hay un aumento en la utilización de la glucosa estimulada por insulina en el músculo esquelético; este efecto potenciador de la acción de la insulina se produce en ausencia de cambios en la actividad tirosina quinasa del receptor (148).

Nosotros hemos determinado la actividad tirosina quinasa de los receptores de insulina parcialmente purificados de músculo esquelético midiendo la capacidad de autofosforilación de la subunidad β , así como la capacidad de fosforilar un sustrato exógeno (Poli Glu4:Tyr1), tanto en ausencia como en presencia de una concentración máxima de insulina (10^{-7} M).

En las ratas diabéticas post-STZ tratadas o sin tratar, no observamos diferencias significativas en cuanto a la autofosforilación basal o estimulada con insulina 10^{-7} M. Tampoco se encontraron diferencias en la fosforilación del sustrato Glu4:Tyr1 en situación basal o en presencia de insulina 10^{-7} M, por los receptores de músculo esquelético de los cuatro grupos de ratas diabéticas post-STZ estudiados.

En adipocitos de ratas se ha visto que la clorpropamida (sulfonilurea de primera generación) estimula el transporte de glucosa en ausencia de cambios en la unión de la insulina y en la actividad tirosina quinasa del receptor (220), por lo que los efectos de las sulfonilureas sobre el transporte de glucosa deben estar mediados a nivel post-receptor.

Los datos obtenidos en ratas diabéticas insulino pénicas después de la administración de estreptozotocina con respecto a la actividad tirosina quinasa en tejidos diana de la insulina (hígado, músculo, adiposo) son contradictorios.

De hecho, algunos trabajos han mostrado una disminución de la autofosforilación de receptores de hígado de ratas diabéticas post-STZ con respecto a ratas no diabéticas (215). El tratamiento insulínico restauró parcialmente estas anomalías.

En nuestros datos observamos que la autofosforilación de receptores de músculo en ratas diabéticas sin tratar fue similar al del grupo de ratas diabéticas tratadas con insulina. En el estudio de Kadowaki y colaboradores (215) las ratas diabéticas fueron tratadas con 8 unidades de insulina NPH, mientras que en nuestro estudio la dosis de insulina fue de 5 unidades, también las glucemias alcanzadas por las ratas diabéticas sin tratar fueron más altas en el estudio de Kadowaki. En nuestro estudio, hay que tener en cuenta que los músculos gastrocnemius habían sido perfundidos durante una hora con insulina, no podemos saber si este hecho puede influir en la actividad tirosina quinasa.

Otros estudios han referido una menor autofosforilación del receptor de insulina parcialmente purificado de músculo esquelético de ratas diabéticas post-STZ en situación basal, sin embargo la autofosforilación en presencia de insulina fue similar en el grupo de ratas no diabéticas y en el grupo de ratas control (216).

Otros autores han referido una disminución en la autofosforilación del receptor en el músculo de ratas diabéticas sin tratar con respecto a ratas no diabéticas, sin embargo en estas ratas diabéticas estaba aumentada la fosforilación de un sustrato de 170 Kda de peso

molecular (IRS-1). El aumento de la fosforilación de este sustrato en las ratas diabéticas post-STZ estaría mediado más por el hipoinsulinismo que por la hiperglucemia (221). El tratamiento con insulina revertió este efecto. En este estudio los niveles de insulina sérica eran superiores en las ratas tratadas con insulina que en las no tratadas. En nuestro estudio no existieron diferencias en la concentración de insulina sérica entre las ratas no tratadas y las tratadas con insulina.

Otros estudios han sugerido diferencias en la actividad quinasa del receptor dependiendo del sustrato empleado. De hecho en receptores de hígado de ratas no diabéticas y de ratas diabéticas post-STZ, la fosforilación exógena estaba disminuída en las ratas diabéticas post-STZ cuando se usó como fosfoaceptor histona H2b, pero no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de ratas en la fosforilación del sustrato exógeno Glu4:Tyr1 (222).

Otras investigaciones realizadas sugieren que los datos de fosforilación dispares encontrados en los receptores parcialmente purificados de músculo de ratas diabéticas, dependería además del tipo y de la concentración del sustrato para valorar la actividad tirosina quinasa, de la severidad del estado diabético, que provocaría un mayor o menor daño metabólico (223). Estos resultados indican que la actividad tirosina quinasa del receptor variará según ciertas condiciones, dependiendo del sustrato empleado (podría ser un problema de la afinidad de los receptores por los fosfoaceptores) y del mayor o menor grado de insulinopenia.

En pacientes con DMNID, la disminución de los niveles de GLUT4 en adipocitos parece ser la llave de la resistencia a la insulina en el tejido adiposo. Se ha observado una disminución de los niveles proteicos del glucotransportador GLUT4 en adipocitos de pacientes con DMNID y de ratas diabéticas post-STZ (224,225). En ratas con diabetes post-STZ se ha visto que la disminución del GLUT4 en adipocitos es restaurada por tratamiento insulínico (224). Sin embargo, los niveles de GLUT4 y el mRNA son normales en los músculos vasto lateral y recto abdominal de sujetos con DMNID, mientras que muchos grupos de investigadores han observado que el mRNA y los niveles proteicos de GLUT4 están disminuídos en el músculo esquelético de ratas con diabetes post-STZ (226,227). Por tanto, la regulación del transportador GLUT4 de músculo en diabéticos humanos parece ser

diferente que la observada en ratas diabéticas post-estreptozotocina.

En ratas diabéticas post-STZ se ha estudiado la regulación del GLUT4 en diferentes músculos, y se ha visto que el contenido del transportador disminuye en músculo cardíaco, en soleo y en los músculos gastrocnemius. Sin embargo se han encontrado niveles normales de GLUT4 en los músculos vasto lateral y recto abdominal (228). También se ha visto una regulación heterogénea del GLUT4 (tanto en los niveles proteicos como en el mRNA) en ratas diabéticas post-STZ específica de tejidos, según sea músculo cardíaco, músculo rojo o músculo blanco (229).

En pacientes con DMNID sólo se ha podido analizar el contenido de GLUT4 en los músculos vasto lateral y recto abdominal, por lo que los datos anteriores apoyarían una regulación del GLUT4 específica, relacionada con diferencias existentes en los músculos según la composición de las fibras y/o la diferente inervación o tonicidad.

Cuando analizamos el contenido total del glucotransportador GLUT4 en el músculo esquelético de ratas diabéticas post-STZ y en un grupo de ratas no diabéticas (control), observamos que los niveles proteicos de GLUT4 estaban disminuídos en el grupo de ratas diabéticas sin tratar con respecto al grupo de ratas no diabéticas. Estos datos concuerdan con los encontrados por otros autores (226,227). Además, en nuestro estudio observamos que las ratas diabéticas que recibieron tratamiento con insulina o conjuntamente con gliclacida e insulina presentaban unos niveles proteicos totales del transportador GLUT4 en los músculos gastrocnemius similares a los del grupo de ratas no diabéticas y superiores a los de las ratas diabéticas post-STZ que no recibieron tratamiento. Otros autores han referido que la administración exógena de insulina a ratas diabéticas post-STZ normaliza los niveles de GLUT4 en adipocitos (224) y en el músculo esquelético (228), tal y como nosotros hemos encontrado en nuestro estudio.

Las ratas diabéticas post-STZ que recibieron tratamiento sólo con gliclacida presentaron una concentración proteica del transportador GLUT4 superior a la de las ratas diabéticas que no recibieron tratamiento, y similar a los otros dos grupos de ratas diabéticas tratadas y al grupo de ratas no diabéticas.

En el estudio de Vestergaard y colaboradores (230), no encuentran diferencias en los niveles proteicos ni en el mRNA del GLUT4 en los pacientes con DMNID que

recibieron tratamiento con gliclacida, con respecto a otros pacientes que no fueron tratados con la sulfonilurea. Estos datos no pueden ser comparados con los obtenidos en nuestro estudio por varias razones: 1º) Los modelos diabéticos son distintos, y ya hemos visto las diferencias existentes en la regulación del glucotransportador GLUT4 en el músculo esquelético, 2º) no hay un grupo control para poder ver si existen diferencias en el grupo de pacientes diabéticos y el grupo de sujetos sanos, 3º) el músculo que utilizan en el estudio es el vasto lateral, donde se sabe que en pacientes diabéticos no hay cambios en la cantidad total de GLUT4 con respecto a los sujetos sanos, ni siquiera se han observado cambios en los niveles de GLUT4 en este músculo en ratas con diabetes post-STZ (228).

De esta manera, en nuestro estudio observamos por un lado, un aumento del GLUT4 en el músculo de las ratas diabéticas tratadas con gliclacida respecto a las no tratadas y por otro, que los niveles del GLUT4 de las ratas que recibieron tratamiento con la sulfonilurea son similares a los del grupo de ratas no diabéticas. Por tanto, el tratamiento con gliclacida normalizó el contenido total del GLUT4 del músculo esquelético de las ratas diabéticas post-STZ. En otro estudio no se han observado diferencias en el contenido total del glucotransportador entre ratas normales sin tratar y tratadas con glibenclamida (231).

El aumento de GLUT4 que hemos encontrado en las ratas diabéticas tratadas con gliclacida respecto a las no tratadas, no puede aparentemente atribuirse a un aumento de los niveles séricos de insulina, puesto que los dos grupos de ratas tenían la misma concentración de insulina sérica una vez finalizado el tratamiento. No obstante, no se puede excluir que tras la administración de gliclacida las ratas diabéticas presentaran una mayor secreción de insulina, puesto que este posible efecto no se ha determinado.

Algunos autores han referido que la hiperglucemia o los cambios en la homeostasis de la glucosa regulan el contenido del GLUT4 en el músculo esquelético (227) y en adipocitos (232). La hiperglucemia podría ser un factor importante en el *down regulation* del mRNA y del contenido proteico de los transportadores.

Si analizamos nuestros resultados podemos considerar que la disminución de la glucemia en las ratas diabéticas tratadas con gliclacida respecto a las no tratadas, se produce probablemente por una mayor utilización de la glucosa en el músculo esquelético. El aumento en la captación de la glucosa en las ratas diabéticas tratadas con gliclacida, puede

ser, producido por un aumento de la translocación del GLUT4 en el músculo esquelético. De hecho, en la primera parte de la discusión, hemos referido como la gliclacida promueve el movimiento del transportador GLUT4 desde el interior celular a la membrana plasmática. Otros autores han referido una disminución de la glucemia en pacientes tratados con sulfonilureas por descenso de la producción hepática de glucosa.

La disminución de la glucemia, el aumento de la utilización de la glucosa y el efecto de la gliclacida *per se*, son factores a tener en cuenta en la regulación del transportador GLUT4 en las ratas diabéticas post-STZ que fueron tratadas con la sulfonilurea.

En el músculo esquelético se ha visto que el número de glucotransportadores GLUT1 presentes en la membrana plasmática es normal en la diabetes, pero se ha observado que en ratas con diabetes post-STZ hay una disminución del GLUT4 presente en la membrana plasmática con respecto a ratas no diabéticas (233). También se ha referido que en respuesta a insulina hay menor cantidad de GLUT4 en la membrana plasmática, aunque la señal inductora en respuesta a insulina parece estar intacta y se transloca el mismo número de transportadores desde los compartimentos intracelulares hacia la membrana plasmática en ratas con diabetes post-STZ que en ratas normales (233). La disminución del número de transportadores presentes en la membrana plasmática podría ser debido, por tanto, a una disminución del contenido total del GLUT4, que se ha demostrado que existe en las ratas diabéticas con respecto a las ratas normales (226,227).

La menor captación basal de glucosa por las extremidades inferiores de las ratas diabéticas no tratadas, encontrada en nuestro estudio, podría justificarse por un menor número de glucotransportadores presentes en la membrana plasmática. En las ratas diabéticas tratadas con gliclacida, la captación basal de glucosa era similar a la de las ratas no diabéticas, probablemente porque en ambos grupos de ratas existía la misma cantidad de GLUT4 en la membrana plasmática, al tener el mismo contenido proteico de GLUT4. La captación de glucosa estimulada por insulina 10^{-7} M fue inferior en las ratas diabéticas no tratadas que en las ratas que recibieron tratamiento con gliclacida, causado de nuevo posiblemente, por un menor número de transportadores presentes en la membrana plasmática.

La captación de glucosa estimulada por insulina (10^{-7} M) de las ratas diabéticas

tratadas con gliclacida fue menor que la obtenida en las ratas normales, dado que la translocación del transportador GLUT4 en el músculo esquelético en respuesta a insulina es similar en estados diabéticos que en estados normales (233), y ambos grupos de ratas presentaban el mismo contenido proteico total de GLUT4, la menor captación de glucosa estimulada por insulina en las ratas diabéticas tratadas con gliclacida podría deberse a una disminución de la actividad intrínseca del transportador.

La adición de gliclacida al tratamiento insulínico, mejoró las glucemias en las ratas diabéticas post-STZ, con respecto a las tratadas sólo con gliclacida. De hecho, en las ratas diabéticas post-STZ mantenidas con ciclo de luz invertido, que recibieron tratamiento combinado con la gliclacida y la insulina se encontraban hipoglucémicas cuatro horas después de la administración de la sulfonilurea, mientras que las ratas diabéticas tratadas con insulina presentaban niveles de glucemia normales. A ambos grupos de ratas se les administró misma dosis de insulina exógena (3 unidades), por lo que la adición de gliclacida al tratamiento insulínico pudiera necesitar un reajuste de la dosis de insulina para evitar una bajada excesiva de los niveles de glucosa en sangre.

El tratamiento combinado con gliclacida e insulina normalizó la captación muscular de glucosa (tanto basal como estimulada por insulina). En las ratas diabéticas post-STZ que fueron tratadas con insulina se normalizó la captación basal de glucosa (al igual que ocurría en las ratas diabéticas tratadas sólo con gliclacida), por lo que la adición de gliclacida al tratamiento insulínico puede mejorar la insulinoresistencia en el tejido muscular en las ratas diabéticas post-STZ.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Estudio del efecto agudo de la gliclacida en ratas normales:

1. La gliclacida tiene un efecto directo (independiente de insulina), inmediato y dosis-dependiente sobre la captación de la glucosa por el músculo esquelético.
2. El efecto alcanzado con concentraciones altas de gliclacida es similar al producido con concentraciones fisiológicas de insulina.
3. La gliclacida a concentraciones elevadas produce un efecto aditivo al de la insulina sobre la captación muscular de glucosa.
4. La acción estimuladora de la gliclacida sobre la utilización de la glucosa en el músculo esquelético se produce a través de canales de K^+ ATP dependientes.
5. La gliclacida estimula la translocación del glucotransportador GLUT4 desde compartimentos intracelulares a la membrana plasmática.

Estudio del tratamiento oral con gliclacida durante 12 días en ratas con diabetes post-STZ:

1. El tratamiento con gliclacida reduce los niveles glucémicos.
2. La gliclacida normaliza la captación basal de glucosa por el músculo esquelético y mejora la captación de glucosa inducida por concentraciones suprafisiológicas de insulina.
3. La gliclacida no modifica la unión de la insulina a los receptores de insulina parcialmente purificados de músculo esquelético ni tampoco la actividad tirosina quinasa de los mismos.

4. La gliclacida normaliza el contenido del glucotransportador GLUT4 en el músculo esquelético.
5. La adición de gliclacida al tratamiento insulínico mejora el control glucémico alcanzado sólo con tratamiento insulínico y normaliza la captación de glucosa estimulada por insulina en el músculo esquelético.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- **Mering JV, Minkoski O** (1889). Diabetes mellitus nach pankreas extirpation. Zentralbl Klin Med 10:393.
- 2.- **Banting FG, Best CH** (1922). Pancreatic extracts. J. Lab. Clin. Med. 7:464-472.
- 3.- **Sanger F, Tuppy H** (1951). The amino-acid sequence in the phenylalanil chain of insulin.
1. The identification of lower peptides from partial hidrolysates. Biochem. J. 49:463-481.
- 4.- **Katsoyannis PG, Tometsko A, Fukuda K** (1963). Insulin peptides IX: the synthesis of the A-chain of insulin and its combination with natural B-chain to generate insulin activity. J. Am. Chem. Soc. 85:2863.
- 5.- **Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F, Heyncker HL, Yansura DG, Crea R, Hirose T, Kraszewski A, Itakura K, Riggs AD** (1979). Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:106-110.
- 6.- **Rasmussen H, Zawalich KC, Ganesan S, Calle R, Zawalich WS** (1990). Physiology and pathophysiology of insulin secretion. Diabetes Care 13:655-666.
- 7.- **Cook DL, Hales CN** (1984). Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic β -cells. Nature 311:271-273.
- 8.- **Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJH** (1984). Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic β -cells. Nature 312:446-448.
- 9.- **Cook DL, Satin LS, Ashford MLJ, Hales CN** (1988). ATP-sensitive K^+ channels in pancreatic β cells. Spare-channel hypothesis. Diabetes 37:495-498.
- 10.- **Dunne MJ, Petersen OH** (1991). Potassium selective ion channels in insulin-secreting cells: physiology, pharmacology and their role in stimulus-secretion coupling. Bioquim. Biophys. Acta 1071:67-82.

- 11.- **Henquin JC, Meissner HP** (1984). Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic β -cells. *Experientia* 40:1043-1052.
- 12.- **Henquin JC** (1978). D-glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islet cells. *Nature* 271:271-273.
- 13.- **Prentki M, Matschinsky FM** (1987) Ca^{2+} , cAMP and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol. Rev.* 67:1185-1248.
- 14.- **Longo EA, Tornheim K, Deeney JT, Varnum BA, Tillotson D, Prentki M, Corkey BE** (1991). Oscillations in cytosolic free Ca^{2+} , oxygen consumption, and insulin secretion in glucose-stimulated rat pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* 266:9314-9319.
- 15.- **Brisson GR, Mallaisse WJ** (1973). The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XI. Effects of theophylline and epinephrine on ^{45}Ca efflux from perfused islets. *Metabolism* 22:455-465.
- 16.- **Gylfe E** (1988). Glucose-induced early changes in cytoplasmic calcium of pancreatic β -cells studied with time-sharing dual-wavelength fluorometry. *J. Biol. Chem.* 263:5044-5048.
- 17.- **Pralong WF, Bartley C, Wollheim CB** (1990). Single islet β -cell stimulation by nutrients: relationship between pyridine nucleotides, cytosolic Ca^{2+} and secretion. *EMBO J.* 9:53-60.
- 18.- **Gembal M, Gilon P, Henquin JC** (1992). Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K^+ channels in mouse β cells. *J. Clin. Invest.* 89:1288-1295.
- 19.- **Smith PA, Rorsman P, Ashcroft FM** (1989). Modulation of dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channels by glucose metabolism in mouse pancreatic β -cells. *Nature* 342:550-553.
- 20.- **Henquin JC** (1992). Adenosine triphosphate-sensitive K^+ channels may not be the sole regulators of glucose-induced electrical activity in pancreatic β -cells. *Endocrinology* 131:127-131.
- 21.- **Sato Y, Aizawa T, Komatsu M, Okada N, Yamada T** (1992). Dual functional role of membrane depolarization/ Ca^{2+} influx in rat pancreatic β -cell. *Diabetes* 41:438-443.

- 22.- **Dukes ID, McIntyre MS, Mertz RJ, Philipson LH, Roe MW, Spencer B, Worley III JF** (1994). Dependence on NADH produced during glycolysis for β -cell glucose signalling. *J. Biol. Chem.* 269:10979-10982.
- 23.- **Freychet P, Roth J, Neville DM Jr** (1971). Insulin receptors in the liver: specific binding of ^{125}I -insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68:1833-1837.
- 24.- **Cuatrecasas P** (1971). Insulin-receptor interactions in adipose tissue cells: direct measurement and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68:1264-1268.
- 25.- **Pilch PF, Czech MP** (1979). Interaction of cross-linking agents with the insulin effector system of isolated fat cells. Covalent linkage of ^{125}I -insulin to a plasma membrane receptor protein of 140,00 daltons. *J. Biol. Chem.* 254:3375-3381.
- 26.- **Czech MP** (1985). The nature and regulation of the insulin receptor: structure and function. *Ann. Rev. Physiol.* 47:357-381.
- 27.- **Massague J, Pilch PF, Czech MP** (1981). A unique proteolytic cleavage site on the β subunit of the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 256:3182-3190.
- 28.- **Kasuga M, Hedo JA, Yamada KM, Kahn CR** (1982). The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor. *J. Biol. Chem.* 257:10392-10399.
- 29.- **Feener EP, Backer JM, King GL, Wilden PA, Sun XJ, Kahn CR, White MF** (1993). Insulin stimulates serine and tyrosine phosphorylation in the juxtamembrane region of the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 268:11256-11264.
- 30.- **White MF, Livingston JN, Backer JM, Lauris V, Dull TJ, Ullrich A, Kahn CR** (1988). Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity. *Cell* 54:641-649.
- 31.- **Carpentier JL, Paccaud JP, Backer J, Gilbert A, Orci L, Kahn CR** (1993). Two steps of insulin receptor internalization depend of different domains of the β -subunit. *J. Cell. Biol.* 122:1243-1252.

- 32.- **Kasuga M, Zick Y, Blith DL, Crettaz M, Kahn CR** (1982). Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. *Nature* 298:667-669.
- 33.- **Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR** (1982). Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-Dalton subunit of its own receptor. *Science* 215:185-187.
- 34.- **Shoelson SE, White MF, Kahn CR** (1988). Tryptic activation of the insulin receptor. Proteolytic truncation of the α -subunit releases the β -subunit from inhibitory control. *J. Biol. Chem.* 263:4852-4860.
- 35.- **Gronskov K, Vissing H, Shymko RM, Tornqvist H, De Meyts P** (1993). Mutation of the arginine 86 to proline in the insulin receptor alpha subunit causes lack of transport of the receptor to the plasma membrane, loss of binding affinity, and a constitutively activated tyrosine kinase in transfected cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192:905-911.
- 36.- **Ellis L, Clauser E, Morgan DO, Edery M, Roth RA, Rutter WJ** (1986). Replacement of insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163 compromises insulin-stimulated kinase activity and uptake of 2-deoxyglucose. *Cell* 45:721-732.
- 37.- **Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauser E, Ou J, Masiarz F, Kan YW, Goldfine ID, Roth RA, Rutter WJ** (1985). The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* 40:747-758.
- 38.- **Seino S, Seino M, Bell GI** (1990). Human insulin-receptor gene. Partial sequence and amplification of exons by polymerase chain reaction. *Diabetes* 39:123-128.
- 39.- **Seino S, Seino M, Bell GI** (1990). Human insulin-receptor gene. *Diabetes* 39:129-133.
- 40.- **Caro JF, Raju SM, Sinha MK, Goldfine ID, Dohm GL** (1988). Heterogeneity of human liver, muscle, and adipose tissue insulin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151:123-129.
- 41.- **Brillon DJ, Henry RR, Klein HH, Olefsky JM, Freidenberg GR** (1988). Functional and structural differences in human and rat-derived insulin receptors: Characterization of the β subunit kinase activity. *Endocrinology* 132:1837-1847.

- 42.- **Mosthaf L, Grako K, Dull TJ, Coussens L, Ullrich A, McClain DA** (1990). Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *EMBO J.* 9:2409-2413.
- 43.- **Vogt B, Carrascosa JM, Ermel B, Ullrich A, Häring H** (1991). The two isotypes of the human insulin receptor (HIR-A and HIR-B) follow different internalization kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177:1013-1018.
- 44.- **Carrascosa JM, Vogt B, Ullrich A, Häring HU** (1991). Activation of phosphatidylinositol-3-kinase by insulin is mediated by both A and B human insulin receptor types. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174:123-127.
- 45.- **Herrera R, Rosen OM** (1986). Autophosphorylation of the insulin receptor in vitro: designation of phosphorylation sites and correlation with receptor kinase activation. *J. Biol. Chem.* 261:11980-11985.
- 46.- **Roth RA, Cassell MP** (1983). Insulin receptor: evidence that is a protein kinase. *Science* 219:299-301.
- 47.- **White MF, Takayama S, Kahn CR** (1985). Differences in the sites of phosphorylation of the insulin receptor in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 260:9470-9478.
- 48.- **Tornsquist HE, Pierce MW, Frackelton AR, Nemenoff RA, Avruch J** (1987). Identification of insulin receptor tyrosine residues autophosphorylated in vitro. *J. Biol. Chem.* 262:10212-10219.
- 49.- **Tavaré JM, O'Brien RM, Siddle K, Denton RM** (1988). Analysis of insulin receptor phosphorylation sites in intact cells by two-dimensional phosphopeptide mapping. *Biochem. J.* 253:783-788.
- 50.- **Häring HU** (1991). The insulin receptor: signalling mechanism and contribution to the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetologia* 34:848-861.
- 51.- **Takayama S, White MF, Kahn CR** (1988). Phorbol ester-induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity. *J. Biol. Chem.* 263:3440-3447.

- 52.- **Backer JM, Kahn CR, Cahill DA, Ullrich A, White MF** (1990). Receptor-mediated internalization of insulin requires a 12-aminoacid sequence in the yuxtamembrane region of the insulin receptor β -subunit. *J. Biol. Chem.* 265:16450-16454.
- 53.- **White MF, Maron R, Kahn CR** (1985). Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr 185,000 protein in intact cells. *Nature* 318:183-186.
- 54.- **Sun XJ, Crimmins DL, Myers MG Jr, Miralpeix M, White MF** (1993). Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Moll. Cell. Biol.* 13:7418-7428.
- 55.- **Sturgill TW, Ray LB, Erikson E, Maller JL** (1988). Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature* 334:715-718.
- 56.- **Rossumando AJ, Sanghera JS, Marsden LA, Weber MJ, Pelech SL, Sturgill TW** (1991). Biochemical characterization of a family of serine/threonine protein kinases regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylations. *J. Biol. Chem.* 266:20270-20275.
- 57.- **Dent P, Lavoigne A, Nakielny S, Caudwell FB, Watt P, Cohen P** (1990). The molecular mechanisms by which insulin stimulates glycogen synthesis in mammalian skeletal muscle. *Nature* 348:302-307.
- 58.- **Kim S-J, Kahn CR** (1994). Insulin induces rapid accumulation of insulin receptor and increases tyrosine kinase activity in the nucleus of cultured adipocytes. *J. Cell. Physiol.* 157:217-228.
- 59.- **Kim S-J, Kahn CR** (1994). Insulin stimulates phosphorylation of c-Jun, c-Fos and Fos-related proteins in cultured adipocytes. *J. Biol. Chem.* 269:11887-11892.
- 60.- **O'Brien RM, Granner DK** (1991). Regulation of gene expression by insulin. *Biochem. J.* 278:609-619.
- 61.- **Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H, Seino S** (1990). Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 13:198-208.
- 62.- **Kasahara M, Hinkle PC** (1977). Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 252:7384-7390.

- 63.- **Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF** (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229:941-945.
- 64.- **Cushman SW, Wardzala LJ** (1980). Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell: apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 255:4758-4762.
- 65.- **Suzuki K, Kono T** (1980). Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2542-2545.
- 66.- **Zorzano A, Wilkinson W, Kotliar N, Thoidis G, Wadzinski BE, Ruoho AE, Pilch PF** (1989). Insulin-regulated glucose uptake in rat adipocytes is mediated by two transporter isoforms present in at least two vesicle populations. *J. Biol. Chem.* 264:12358-12363.
- 67.- **Haney PM, Slot JW, Piper RC, James DE, Mueckler M** (1991). Intracellular targeting of the insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4) is isoform specific and independent of cell type. *J. Cell. Biol.* 114:689-699.
- 68.- **James DE, Piper RC, Slot JW** (1994). Insulin stimulation of GLUT4 translocation: a model for regulated recycling. *Trends. Cell. Biol.* 4:120-126.
- 69.- **Rodríguez-Miñón JL** (1985). Historia de la diabetes. En "Manual del diabético: Guía para diabéticos y educadores". Cerdan, Jara A, Rodríguez-Miñón JL, Pallardo LF (eds). Ediciones CEA 9-18.
- 70.- **Himsworth HP, Kerp RB** (1939). Insulin-sensitive and insulin-insensitive types of diabetes mellitus. *Clin. Sci.* 4:119-152.
- 71.- **National Diabetes Data Group** (1979). Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 28:1039-1057.
- 72.- **Janbon M, Chaptal J, Vedel A, Schoop J** (1942). Accidents hypoglycémiques graves par un sulfamido-thiadiazole (le VK57 ou 2254 RP). *Montpellier. Med.* 44:21-22.

- 73.- **Loubatières A** (1944). Relations entre la structure moléculaire et l'activité hypoglycémisante des aminosulfamides hypoglycémisants. *Arch. Int. Physiol.* 54:174-177.
- 74.- **Gerich JE** (1985). Sulfonylureas in the treatment of diabetes Mellitus. *Clin. Proc.* 60:439-443.
- 75.- **Melander A** (1987). Clinical pharmacology of sulfonylureas. *Metabolism* 36 (suppl. 1):12-16.
- 76.- **Skilman TG, Feldman JM.** (1981). The pharmacology of sulfonylureas. *Am. J. Med.* 70:361.
- 77.- **Malaisse WJ, Mahy M, Brisson GR, Malaisse-Lagae F** (1972). The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. VIII. Combined effects of glucose and sulfonylureas. *Eur. J. Clin. Invest.* 2:85-90.
- 78.- **Groop L, Luzi L, Melander A, Groop P-H, Ratheiser K, Simonson DC, DeFronzo RA** (1987). Different effects of glyburide and glipizide on insulin secretion and hepatic glucose production in normal and NIDDM subjects. *Diabetes* 36:1320-28.
- 79.- **Jackson JE, Bressler R** (1981). Clinical pharmacology of sulfonylurea hypoglycaemic agents. *Drugs* 22:211-245.
- 80.- **Ferner RE, Chaplin S** (1987). The relationship between the pharmacokinetics and the pharmacodynamic effects of oral hypoglycaemic drugs. *Clin. Pharmacokinet.* 12:379-401.
- 81.- **Dunbar JC, Foá PP** (1974). An inhibitory effect of tolbutamide and glibenclamide (glyburide) on the pancreatic islets of normal animals. *Diabetologia* 10:27-35.
- 82.- **Malaisse WJ, Lebrun P** (1990). Mechanisms of sulfonylurea-induced insulin release. *Diabetes Care* 13 (suppl. 3):9-17.
- 83.- **Sturgess NC, Ashford MLJ, Cook DL, Hales CN** (1985). The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel. *Lancet* 31:474-475.
- 84.- **Boyd AE III** (1988). Sulfonylurea receptors, ion channels and fruit flies. *Diabetes* 37:847-850.

- 85.- **Henquin JC** (1980). Tolbutamide stimulation and inhibition of insulin release: studies of the underlying ionic mechanisms in isolated rat islets. *Diabetologia* 18:151-160.
- 86.- **Flatt PR, Shibier O, Szecowka J, Berggren PO** (1994). New perspectives on the actions of sulphonylureas and hyperglycaemic sulphonamides on the pancreatic β -cell. *Diabete Metab.* 20:157-162.
- 87.- **Ali L, Wesslen N, Hellman B** (1988). Opposing effects of glucose and tolbutamide on the sodium content of rat pancreatic islets. *Acta Endocrinol.* 118:227-231.
- 88.- **Ashcroft FM, William B, Smith PA, Fewtrell MS** (1981). Ion channels involved in the regulation of nutrient-stimulated insulin secretion. In **Flatt PR** ed, *Nutrient regulation of insulin secretion*, Portland Express, 198-212.
- 89.- **Kajinuma H, Kuzuya T, Ide T** (1974). Effects of hypoglycemic sulfonamides on glucagon and insulin secretion in ducks and dogs. *Diabetes* 23:412-417.
- 90.- **Ostenson CG, Nylén A, Grill V, Gutniak M, Efendic S** (1986). Sulphonylurea-induced inhibition of glucagon secretion from the perfused rat pancreas: evidence for a direct, nonparacrine effect. *Diabetologia* 29:861-867.
- 91.- **Samols E, Tyler JM, Mialhe P** (1969). Suppression of pancreatic glucagon release by the hypoglycaemic sulphonylureas. *Lancet* 1:174-176.
- 92.- **Lecomte MJ, Luyckx AS, Lefebvre PJ** (1977). Plasma glucagon and clinical control of maturity-onset type diabetes: effects of diet, placebo and glipizide. *Diabete. Metab.* 3:239-243.
- 93.- **Pfeifer MA, Beard JC, Halter JB, Judzewitsch R, Best JD, Porte D Jr** (1983). Suppression of glucagon secretion during a tolbutamide infusion in normal and noninsulin-dependent diabetic subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56:586-591.
- 94.- **Pek S, Fajans SS, Floyd JC Jr, Knopf RF, Conn JW** (1972). Failure of sulphonylureas to suppress plasma glucagon in man. *Diabetes* 21:216-223.
- 95.- **Unger RH, Aguilar-Parada E, Muller WA, Eisentraut AM** (1970). Studies of pancreatic alpha cell function in normal and diabetic subjects. *J. Clin. Invest.* 49:837-848.

- 96.- **Mirsky IA, Perisutti G, Jinks R** (1956). Ineffectiveness of sulfonylureas in alloxan diabetic rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 91:475-477.
- 97.- **Houssay BA, Penhos JC** (1958). Action of the hypoglycemic sulfonyl compounds in hypophysectomized, adrenalectomized and depancreatized animals. *Metabolism* 5:723-732.
- 98.- **Melander A, Bitzén P-O, Faber O, Groop L** (1989). Sulfonylurea antidiabetic drugs. An update of their clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs* 37:58-72.
- 99.- **Ratzmann KP, Schulz B, Heinke P, Besch W** (1984). Tolbutamide does not alter insulin requirement in Type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 27:8-12.
- 100.- **Reaven G, Dray J** (1967). Effect of chlorpropamide on serum glucose and immunoreactive insulin concentrations in patients with maturity-onset diabetes mellitus. *Diabetes* 16:487-492.
- 101.- **Duckworth WC, Solomon SS, Kitabchi AE** (1972). Effect of chronic sulfonylurea therapy on plasma insulin and proinsulin levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 35:585-591.
- 102.- **Kolterman OG, Gray RS, Shapiro G, Scarlett JA, Griffin J, Olefsky JM** (1984). The acute and chronic effects of sulfonylurea therapy in type II diabetic subjects. *Diabetes* 33: 346-354.
- 103.- **Jacobs DB, Hayes GR, Lockwood DH** (1987). Effect of chlorpropamide on glucose transport in rat adipocytes in the absence of changes in insulin binding and receptor-associated tyrosine kinase activity. *Metabolism* 36:548-554.
- 104.- **Ward G, Harrison LC, Proietto J, Aitken P, Nankervis A** (1985). Gliclazide therapy is associated with potentiation of post-binding insulin action in obese, non-insulin-dependent diabetic subjects. *Diabetes* 34:241-245.
- 105.- **Simonson DC, Ferrannini E, Bevilacqua S, Smith D, Barrett E, Carlson R, DeFronzo R** (1984). Mechanisms of improvement in glucose metabolism after chronic glyburide therapy. *Diabetes* 33:838-845.

- 106.- **Feldman JM, Lebovitz HE, Durhan NC** (1969). An insulin dependent effect of chronic tolbutamide administration on the skeletal muscle carbohydrate transport system. *Diabetes* 18:84-95.
- 107.- **Wang PH, Beguinot F, Smith RJ** (1987). Augmentation of the effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on glucose uptake in cultured rat skeletal muscle cells by sulfonylureas. *Diabetologia* 30:797-803.
- 108.- **Wang PH, Moller D, Flier JS, Nayak RC, Smith RJ** (1989). Coordinate regulation of glucose transporter function, number, and gene expression by insulin and sulfonylureas in L6 rat skeletal muscle cells. *J. Clin. Invest.* 84:62-67.
- 109.- **Daniels EL, Lewis SB** (1982). Acute tolbutamide administration alone or combined with insulin enhances glucose uptake in the perfused rat hindlimb. *Endocrinology* 110:1840-1842.
- 110.- **Kramer JH, Lampson WG, Shaffer SW** (1983). Effect of tolbutamide on myocardial energy metabolism. *Am. J. Physiol.* 245:H313-H319.
- 111.- **Maloff BI, Lockwood DH** (1981). In vitro effects of sulfonylurea on insulin action in adipocytes: potentiation of insulin stimulated hexose transport. *J. Clin. Invest.* 68:85-90.
- 112.- **Martz A, Jo I, Jung CY** (1989). Sulfonylurea binding to adipocyte membranes and potentiation of insulin-stimulated hexose transport. *J. Biol. Chem.* 264:13672-13678.
- 113.- **Zuber MX, Wang S-M, Thammavaram KV, Reed DK, Reed BC** (1985). Elevation of the number of cell-surface insulin receptors and the rate of 2-deoxyglucose uptake by exposure of 3T3-L1 adipocytes to tolbutamide. *J. Biol. Chem.* 260:14045-14052.
- 114.- **Best JD, Judzewitsch RG, Pfeifer MA, Beard JC, Halter JB, Porte D Jr** (1982). The effect of chronic sulfonylurea therapy on hepatic glucose production in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 31:333-338.
- 115.- **Patel TB** (1986). Effects of tolbutamide on gluconeogenesis and glycolysis in isolated perfused rat liver. *Am. J. Physiol.* 250:E82-E86.
- 116.- **Davidson MB, Sladin EG** (1987). Effect of glyburide on glycogen metabolism in cultured rat hepatocytes. *Metabolism* 36:925-930.

- 117.- **Cabello MA, Monge L, Ortega JL, Samper B, Feliu JE** (1987). Effect of glipizide on hepatic fructose 2,6-bisphosphate concentration and glucose metabolism. *Metabolism* 36:738-742.
- 118.- **Hatao K, Kaku K, Matsuda M, Tsuchiya M, Kaneko T** (1985). Sulfonylurea stimulates liver fructose 2-6 bisphosphate formation in proportion to its hypoglycemic action. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1:49-53.
- 119.- **Patel TB** (1986). Effect of sulfonylureas on hepatic fatty acid oxidation. *Am. J. Physiol.* 251:E241-E246.
- 120.- **Gaines KL, Hamilton S, Boyd AE III** (1989). Characterization of the sulfonylurea receptor on beta cell membranes. *J. Biol. Chem.* 263:2589-2592.
121. **Siconolfi-Baez L, Banerji MA, Lebovitz HE** (1990). Characterization and significance of sulfonylurea receptor. *Diabetes Care* 13 (suppl. 3):2-8.
- 122.- **Schwanstecher C, Dickel C, Ebers I, Lins S, Züinkler BJ, Panten U** (1992). Diazoxide-sensitivity of the adenosine 5'-triphosphate dependent K^+ channel in mouse pancreatic β -cells. *Br. J. Pharmacol.* 107:87-94.
- 123.- **Terzic A, Findlay I, Hosoya Y, Kurachi Y** (1994). Dualistic behavior of ATP-sensitive K^+ channels toward intracellular nucleoside diphosphates. *Neuron.* 12:1049-1058.
- 124.- **Hayashi S, Horie M, Tsuura Y, Ishida H, Okada Y, Seino Y, Sasayama S** (1993). Disopyramide blocks pancreatic ATP-sensitive K^+ channels and enhance insulin release. *Am. J. Physiol.* 265:C337-C342.
- 125.- **Ashcroft SJH** (1994). Protein phosphorylation and beta-cell function. *Diabetologia* 37 (suppl. 2):S21-S29.
- 126.- **Schmid-Antomarchi H, De Weille J, Fosset M, Lazdunski M** (1987). The receptor for antidiabetic sulfonylureas controls the activity of the ATP-modulated K^+ channel in insulin-secreting cells. *J. Biol. Chem.* 262:15840-15844.

- 127.- **Niki I, Welsh M, Berggren P-O, Hubbard P, Ashcroft SJH** (1991). Characterization of the solubilized glibenclamide receptor in a hamster pancreatic β -cell line HIT T15. *Biochem. J.* 277:619-624.
- 128.- **Aguilar-Bryan L, Nelson DA, Vu QA, Humphrey MB, Boyd AE III** (1990). Photoaffinity labeling and partial purification of the β -cell sulfonylurea receptor using a novel, biologically active glyburide analog. *J. Biol. Chem.* 265:8218-8224.
- 129.- **Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement IV JP, Boyd AE III, González G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA** (1995). Cloning of the β cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268:423-426.
- 130.- **Kramer W, Müller G, Girbig F, Gutjahr U, Kowalewski S, Hartz D, Summ H-D** (1994). Differential interaction of glimepiride and glibenclamide with the β -cell sulfonylurea receptor II. Photoaffinity labeling of a 65 KDa protein by [3 H]glimepiride. *Biochim. Biophys. Act.* 1191:278-290.
- 131.- **Bernardi H, De Weille JR, Epelbaum J, Mourre C, Amoroso S, Slama A, Fosset M, Lazdunski M** (1993). ATP-modulated K^+ channels sensitive to antidiabetic sulfonylureas are present in adenohipophysis and are involved in growth hormone release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:1340-1344.
- 132.- **Kovacs RJ, Nelson MT** (1991). ATP-sensitive K^+ channels from aortic smooth muscle incorporated into planar lipid bilayers. *Am. J. Physiol.* 261:H604-H609.
- 133.- **Spruce AE, Standen NB, Standfield PR** (1985). Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature* 316:736-738.
- 134.- **Schwanstecher M, Löser S, Chudziak F, Panten U** (1994). Identification of a 38-kDa high affinity sulfonylurea-binding peptide in insulin-secreting cells and cerebral cortex. *J. Biol. Chem.* 269:17768-17771.
- 135.- **Rajan AS, Aguilar-Bryan L, Nelson DA, Nichols CG, Wechsler SW, Lechago J, Bryan J** (1993). Sulfonylurea receptors and ATP-sensitive K^+ channels in clonal pancreatic α cells: evidence for two high affinity sulfonylurea receptors. *J. Biol. Chem.* 268:15221-15228.

- 136.- **Thomas MP, Cote GJ, Wohllk N, Haddad B, Mathew PM, Rabi W, Aguilar-Bryan L, Gagel RF, Bryan J** (1995). Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* 268:426-429.
- 137.- **Groop LC, Ratheiser K, Luzi L, Melander A, Simonson DC, Petrides A, Bonadonna RC, Widén E, DeFronzo RA** (1991). Effect of sulfonylurea on glucose-stimulated insulin secretion in healthy and non-insulin dependent diabetic subjects: a dose-response study. *Acta Diabetol.* 28:162-168.
- 138.- **Shapiro ET, van Cauter E, Tillil H, Given BD, Hirsch L, Beebe C, Rubenstein AH, Polonsky KS** (1989). Glyburide enhances the responsiveness of the β -cell to glucose but does not correct the abnormal patterns of insulin secretion in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 69:571-576.
- 139.- **Hosker JP, Rudenski AS, Burnett MA, Matthews DR, Turner RC** (1989). Similar reduction of first- and second-phase β -cell responses at three different glucose levels in type II diabetes and the effect of gliclazide therapy. *Metabolism* 38:767-772.
- 140.- **Della Casa L, Del Rio G, Glaser B, Cerasi E** (1991). Effect of 6 month gliclazide treatment on insulin release and sensitivity to endogenous insulin in NIDDM: role of initial CS II-induced normoglycemia. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 14 (suppl. 2):S69-S78.
- 141.- **Chiasson J-L, Hamet P, Verdy M** (1991). The effect of diamicon on the secretion and action of insulin. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 14 (suppl. 2): S47-S52.
- 142.- **Couturier E** (1986). Gliclazide on long-term therapy increases insulin response to glucose of type II diabetics. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1:343-347.
- 143.- **Noury J, Nandeuil A** (1991). Comparative three-month study of the efficacies of metformin and gliclazide in the treatment of NIDDM. *Diabete Metab.* 17:209-212.
- 144.- **Wing JR, Panz UR, Joffe BI, Seftel HC** (1993). Changes in glucose disposal and cellular insulin binding in obese black southern African patients with type 2 diabetes mellitus before and after sulphonylurea therapy. *Diabet. Med.* 10:50-55.
- 145.- **Pulido N, Casla A, Suárez A, Casanova B, Arrieta FJ, Rovira A** (1992). Effect of sulphonylureas on glucose uptake by skeletal muscle. *Diabetologia* 35 (suppl. 1):A101.

- 146.- Pulido N, Suárez A, Casla A, Casanova B, Arrieta FJ, Gonzalo A, Romero R, Rovira A (1994). Effect of gliclazide plus insulin on glucose uptake by skeletal muscle. *Eur. J. Clin. Invest.* 24 (suppl. 2):A8.
- 147.- Johnson AB, Argyraki M, Thow JC, Jones IR, Broughton D, Miller M, Taylor R (1991). The effect of sulphonylurea therapy on skeletal muscle glycogen synthase activity and insulin secretion in newly presenting type 2 diabetic patients. *Diabet. Med.* 8:243-253.
- 148.- Bak JF, Schmitz O, Sorensen NS, Pedersen O (1989). Postreceptor effects of sulphonylurea on skeletal muscle glycogen synthase activity in type II diabetic patients. *Diabetes* 38:1343-1350.
- 149.- Marchand E, Grigorescu F, Buyschaert M, De Meyts P, Ketelslegers J-M (1983). The hypoglycaemic effect of a sulphonylurea (gliclazide) in moderate type II diabetes and glucose intolerance is not accompanied by changes in insulin action and insulin binding to erythrocytes. *Mol. Physiol.* 4:83-93.
- 150.- Dolais-Kitabgi J, Alengrin F, Freychet P (1983). Sulphonylureas in vitro do not alter insulin binding or insulin effect on amino acid transport in rat hepatocytes. *Diabetologia* 24:441-444.
- 151.- Lagarde M, Dechavanne M, Thouverez JP, Vainer H (1975). Effects of gliclazide, a new antidiabetic agent on the platelet release reaction, role of adenylate cyclase. *Thrombosis Res.* 9:87-90.
- 152.- Jennings PE, Scott NA, Santabadi AR, Belch JJJ (1992). Effects of gliclazide on platelet reactivity and free radicals in type II diabetic patients: clinical assessments. *Metabolism* 41:36-39.
- 153.- Florkowski CM, Richardson MR, Le Guen C, Jennings PE, O'Donnell MJ, Jones AF, Lunec J, Barnett AH (1988). Effect of gliclazide on thromboxane B₂, parameters of haemostasis, fluorescent IgG and lipid peroxides in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res.* 9:87-90.

- 154.- **Fujitani B, Maeda J, Tsuboi T, Kadokawa T, Shimizu M** (1983). Effect of gliclazide on prostaglandin I₂ formation in normal and streptozotocin-induced diabetic animals. *Japan. J. Pharmacol.* 33:965-970.
- 155.- **Fu ZZ, Yan T, Chen Y-J, Sang JQ** (1992). Thromboxane/prostacyclin balance in type II diabetics: gliclazide effects. *Metabolism* 41 (suppl. 1):33-35.
- 156.- **Ziegler O, Drouin P** (1991). Hemobiological activity of gliclazide in diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 14 (suppl. 2):S83-S90.
- 157.- **Bailey CJ, Day C** (1989). Traditional plant medicines as treatment for diabetes. *Diabetes Care* 12:553-564.
- 158.- **Watanabe CK** (1918). Studies in the metabolic changes induced by administration of guanidine bases. I. Influence of injected guanidine hydrochloride upon blood sugar content. *J. Biol. Chem.* 33:253-265.
- 159.- **Sterne J** (1957). Du nouveau dans les antidiabetiques, la NN dimethylamino guanyl guanidine (NNDG). *Maroc. Med.* 36:1295-1296.
- 160.- **Ungar G, Freedman L, Shapiro SL** (1957). Pharmacological studies of a new oral hypoglycemic drug. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 95:190-192.
- 161.- **Mehnert H, Seitz W** (1958). Weitere Ergebnisse der diabetesbehandlung mit blutzuckersenkenden biguanides. *Munch. Med. Wschr.* 100:1849-1851.
- 162.- **Tucker GT, Casey C, Phillips PJ, Connor H, Ward JD, Woods HF** (1981). Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 12:235-246.
- 163.- **Luft D, Schmulling RM, Eggstein M** (1978). Lactic acidosis in biguanide-treated diabetics. A review of 330 cases. *Diabetologia* 14:75-87.
- 164.- **Wu MS, Johnston P, Sheu WHH, Hohenbeck CB, Jeng CY, Goldfine ID, Chen Y-Di, Reaven GM** (1990). Effect of metformin on carbohydrate and lipoprotein metabolism in NIDDM patients. *Diabetes Care* 13:1-18.

- 165.- **Prager R, Schernthaner G** (1983). Insulin receptor binding to monocytes, insulin secretion and glucose tolerance following metformin treatment. *Diabetes* 32:1083-1086.
- 166.- **Peden N, Newton RW, Feely J** (1983). Oral hypoglycaemic agents. *Br. Med. J.* 286:1564-1567.
- 167.- **Lord JM, Atkins TW, Bailey CJ** (1983). Effect of metformin on hepatocyte insulin receptor binding in normal, streptozotocin diabetic and genetically obese diabetic (ob/ob) mice. *Diabetologia* 25:108-113.
- 168.- **Trischitta V, Gullo D, Pezzino V, Vigneri R** (1983). Metformin normalizes insulin binding to monocytes from obese non-diabetic subjects and obese type II diabetic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57:713-718.
- 169.- **Prager R, Schernthaner G, Graf H** (1986). Effect of metformin on peripheral insulin sensitivity in non insulin dependent diabetes mellitus. *Diabete Metab.* 12:346-350.
- 170.- **Nosadini R, Avogaro A, Travisan R, Valerio A, Tessari P, Duner E, Tiengo A, Velussi M, Del Prato S, Krentzenberg S, Muggeo M, Crepaldi G** (1987). Effect of metformin on insulin-stimulated glucose turnover and insulin binding to receptors in type II diabetes. *Diabetes Care* 10:62-67.
- 171.- **Bailey CJ, Puhah JA** (1986). Effect of metformin on glucose metabolism in mouse soleus muscle. *Diabete Metab.* 12:212-218.
- 172.- **Klip A, Sarabia V, Ramlat T, Bilan PJ, Leiter LA** (1990). Glucose transport in human muscle cells in cultures: stimulation by insulin and metformin. *Diabetes* 39 (suppl. 1):82A.
- 173.- **Wilcock C, Bailey CJ** (1990). Sites of metformin-stimulated glucose metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 39:1831-1834.
- 174.- **Pedersen O, Nielsen O, Bak J, Richelsen B, Beck-Nielsen H, Sorensen N** (1989). The effects of metformin on adipocyte insulin action and metabolic control in obese subjects with type II diabetes. *Diabetic. Med.* 6:249-256.

- 175.- Jackson RA, Hawa MI, Jaspán JV, Sim BM, Disilvio L, Featherbe D, Kurtz AB (1987). Mechanisms of mechanism of metformin action in non-insulin dependent diabetes. *Diabetes* 36:632-640.
- 176.- Matthai S, Hamann A, Klein HH, Benecke H, Kreyman G, Flier JS, Greten H (1991). Association of metformin's effect to increase insulin-stimulated glucose transport with potentiation of insulin-induced translocation of glucose transporters from intracellular pool to plasma membrane in rat adipocytes. *Diabetes* 40:850-857.
- 177.- Hems R, Ross BD, Berry MN, Krebs HA (1966). Gluconeogenesis in the perfused rat liver. *Biochem. J.* 101:284-292.
- 178.- Ruderman NB, Houghton CRS, Hems R (1971). Evaluation of the isolated perfused rat hindquarter for the study of muscle metabolism. *Biochem. J.* 124:639-651.
- 179.- Dohm GL, Kasperek GJ, Tapscott EB, Beecher GR (1980). Effect of exercise on synthesis and degradation of muscle protein. *Biochem. J.* 188:255-262.
- 180.- Laemly UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- 181.- James DE, Strube M, Mueckler M (1989). Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature* 338:83-87.
- 182.- Bader S, Scholz R, Kellerer M, Tippmer S, Rett K, Mathaci S, Freund P, Häring HU (1992). Normal insulin receptor tyrosine kinase activity and glucose transport (GLUT4) levels in the skeletal muscle of hyperinsulinaemic hypertensive rats. *Diabetologia* 35: 712-718.
- 183.- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- 184.- Fleisher B (1974). Isolation and characterization of Golgi apparatus and membranes from rat liver. *Methods. Enzymol.* 31:180-191.
- 185.- Schimmel SD, Kent C, Bischoff R, Vagelos PR (1973). Plasma membranes from cultured muscle cells: isolation procedure and separation of putative plasma-membrane marker enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:3195-3199.

- 186.- **Hedo JA, Harrison LC, Roth J** (1981). Binding of insulin receptors to lectins: evidence for common carbohydrate determinants on several membrane receptors. *Biochemistry* 20:3385-3393.
- 187.- **Caro JF, Ittoop O, Pories WJ, Meelheim D, Flickinger EG, Thomas F, Jenquin M, Silverman JF, Khazanie PG, Sinha MF** (1986). Studies on the mechanism of insulin resistance in the liver from humans with noninsulin-dependent diabetes: insulin action and binding in isolated hepatocytes, insulin receptor structure, and kinase activity. *J. Clin. Invest.* 78:249-258.
- 188.- **Scatchard G** (1949). The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51:660-672.
- 189.- **Grumberger G, Zick Y, Gorden P.** (1984). Defect in phosphorylation of insulin receptors in cells from an insulin-resistant patient with normal insulin binding. *Science* 223:932-934.
- 190.- **Snedecor GW, Cochran WG.** (1967). *Statistical methods.* Ames Iowa State University Press.
- 191.- **DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Felber JP** (1981). The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose: results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* 30:1000-1007.
- 192.- **Trube G, Rorsman T, Ohno-Shosaku T** (1986). Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K^+ channel in mouse pancreatic β -cells. *Pflügers Arch.* 407:493-499.
- 193.- **Henquin JC, Meissner HP** (1982). Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on ^{86}Rb fluxes and membrane potential in pancreatic beta cells. *Biochem. Pharmacol.* 31:1407-1415.
- 194.- **Davidson MB, Molnar G, Furman A, Yamaguchi D** (1991). Glyburide-stimulated glucose transport in cultured muscle cells via protein kinase C-mediated pathway requiring new protein synthesis. *Diabetes* 40:1531-1538.

- 195.- **Rogers BJ, Standaert ML, Pollet RJ** (1987). Direct effects of sulfonylurea agents on glucose transport in the BC3-H1 myocyte. *Diabetes* 36:1292-1296.
- 196.- **Tordjman KM, Leingang KA, James DE, Mueckler MM** (1989). Differential regulation of two distinct glucose transporter species expressed in 3T3-L1 adipocytes: effects of chronic insulin and tolbutamide treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7761-7765.
- 197.- **Campbell DB, Taylor A, Taylor D, Gordon B, Ings RMJ** (1987). The biodisposition and pharmacodynamics of gliclazide in man. In: Halim D, Nielsen SP (eds). FADL Publishers, Copenhagen, Aarhus, Odense, 24-38.
- 198.- **Chiasson JL, Dietz MR, Shikama H, Wooten M, Exton JH** (1980). Insulin regulation of skeletal muscle glycogen metabolism. *Am. J. Physiol.* 239:E69-E74.
- 199.- **Lewis SB, Shultz TA, Westbie DK, Gerich JE, Wallin JD** (1977). Insulin-glucose dynamics during flow-through perfusion of the isolated rat hindlimb. *Horm. Metab. Res.* 9:190-195.
- 200.- **Thirwell MP, Zsoter T** (1972). The effect of diazoxide on the veins. *Am. Heart. J.* 83:512-517.
- 201.- **Palatnick W, Meatherall RC, Tenenbein M** (1991). Clinical spectrum of sulfonylurea overdose and experience with diazoxide therapy. *Arch. Intern. Med.* 151:1859-1862.
- 202.- **Gronda CM, Rossi JP, Gagliardino JJ** (1989). Effect of different stimulators and a blocker of insulin release on islet Na^+/K^+ ATPase activity. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* 11:341-4.
- 203.- **Lebrun P, Malaisse WJ, Herchuelz A** (1985). Do hypoglycaemic sulfonylureas inhibit Na^+/K^+ ATPase activity in pancreatic cells. *Am. J. Physiol.* 248:E491-E499.
- 204.- **Greenfield MS, Doberne L, Rosenthal M, Schulz B, Widstrom A, Reaven GM** (1982). Effect of sulfonylurea treatment on in vivo insulin secretion and action in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 31:307-312.

- 205.- **Bolinder J, Ostman J, Arner P** (1985). Reversal of insulin resistance in adipose tissue of non-insulin-dependent diabetics by treatment with diet and sulfonylurea. *Acta Endocrinol.* 108:85-90.
- 206.- **Jacobs DB, Jung CY** (1985). Sulfonylurea potentiates insulin-induced recruitment of glucose transport carrier in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 260:2593-2596.
- 207.- **Altan N, Altan VM, Mikolay L, Larner J, Schwartz CFW** (1985). Insulin-like and insulin-enhancing effects of the sulfonylurea glyburide on rat adipose glycogen synthase. *Diabetes* 34:281-286.
- 208.- **Muller M, Wied S** (1993). The sulfonylurea drug, glimepiride, stimulates glucose transport, glucose transporter translocation, and dephosphorylation in insulin-resistant rat adipocytes in vitro. *Diabetes* 42:1852-1867.
- 209.- **Shauder P, Frerichs H** (1975). Tolbutamide-induced changes of the DNA, protein and insulin content and the secretory activity of isolated rat pancreatic islets. *Diabetologia* 42:1852-1867.
- 210.- **Shatz H, Laube H, Sieradzki J, Kamenisch W, Pfeiffer EF** (1978). Long-term actions of sulfonylureas on (Pro-)insulin biosynthesis and secretion. II. Studies after administration of tolbutamide and glibenclamide to rats in vivo. *Horm. Metab. Res.* 10:23-29.
- 211.- **Kubo K, Foley JE** (1989). Effect of streptozotocin-induced diabetes on glucose uptake into perfused rat hindlimb. *Diab. Nutr. Metab.* 2:219-222.
- 212.- **Tormo MA, Gómez-Zubeldia MA, Ropero F, Campillo JE** (1994). Effect of insulin and gliclazide on glucose utilization by a perfused intestine-pancreas preparation isolated from diabetic and non-diabetic rats. *Acta Diabetol.* 31:151-155.
- 213.- **Nowak SM, McCaleb ML, Lockwood DH** (1983). Extrapancreatic action of sulfonylureas: hypoglycemic effects are not dependent on altered insulin binding or inhibition of transglutaminase. *Metabolism* 32:398-402.
- 214.- **Kasuga M, Akanura Y, Iwamoto Y, Kosaka K** (1978). Insulin binding and glucose metabolism in isolated rat adipocytes. *Diabetes* 28:87-95.

- 215.- Kadowaki T, Kasuga M, Akanuma Y, Ezaki O, Takaku F (1984). Decreased autophosphorylation of the insulin receptor-kinase in streptozotocin-diabetic rats. *J. Biol. Chem.* 259:14208-14216.
- 216.- Burant CF, Treutelaar MK, Buse MG (1986). Diabetes-induced functional and structural changes in insulin receptors from rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 77:260-270.
- 217.- Arner P, Pollare T, Lithell H, Livingston JN (1987). Defective insulin receptor tyrosine kinase in human skeletal muscle in obesity and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*:437-440.
- 218.- Caro JF, Sinha MK, Raju SM, Ittoop O, Pories WJ, Flickinger DG, Meelheim D, Dohm GL (1987). Insulin receptor kinase in human skeletal muscle from obese subjects with and without noninsulin dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* 79:1330-1337.
- 219.- Pedersen O, Hother-Nielsen O, Bak J, Hjøllund E, Beck-Nielsen H (1991). Effects of sulfonylureas on adipocyte and skeletal muscle insulin action in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am. J. Med.* 90 (suppl. 6A):22S-28S.
- 220.- Jacobs DB, Hayes GR, Lockwood DH (1987). Effect of chlorpropamide on glucose transport in rat adipocytes in the absence of changes in insulin binding and receptor-associated tyrosine kinase activity. *Metabolism* 36:548-554.
- 221.- Giorgino F, Chen J-H, Smith RJ (1991). Changes in tyrosine phosphorylation of insulin receptors and 170,000 molecular weight nonreceptor protein in vivo in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats: effects of insulin and glucose. *Endocrinology* 130:1433-1444.
- 222.- Block NE, Komori K, Robinson KA, Dutton SL, Lam CF, Buse MG (1991). Diabetes-associated impairment of hepatic insulin receptor tyrosine kinase activity: a study of mechanisms. *Endocrinology* 128:312-322.
- 223.- Block NE, Komori K, Dutton SL, Robinson KA, Buse MG (1991). Skeletal muscle of insulin-receptor kinase. Effects of substrate inhibition and diabetes. *Diabetes* 40:1691-1700.

- 224.- **Kahn BB, Cushman SW** (1987). Mechanism for markedly hyperresponsive insulin-stimulated glucose transport activity in adipose cells from insulin-treated streptozotocin diabetic rats. *J. Biol. Chem.* 262:5118-5124.
- 225.- **Kahn BB, Shulman GI, DeFronzo RA, Cushman SW, Rossetti L** (1991). Normalization of blood glucose in diabetic rats with phlorizin treatment reverses insulin-resistant glucose transport in adipose cells without restoring glucose transporter gene expression. *J. Clin. Invest.* 87:561-570.
- 226.- **Garvey WT, Huecksteadt TP, Birnbaum MJ** (1989). Pretranslational suppression of an insulin-responsive glucose transport in rats with diabetes mellitus. *Science* 245:60-63.
- 227.- **Bourey RE, Koranyi L, James DE, Mueckler M, Permutt MA** (1990). Effects of altered glucose homeostasis on glucose transporter expression in skeletal muscle of the rat. *J. Clin. Invest.* 86:542-547.
- 228.- **Harding DS, Domínguez JH, Garvey WT** (1993). Muscle-group specific regulation of GLUT4 glucose transporters in control, diabetic and insulin-treated diabetic rats. *Metabolism* 42:1310-1315.
- 229.- **Camps M, Castelló A, Muñoz P, Monfer M, Testar X, Palacín M, Zorzano A** (1992). Effect of diabetes and fasting on GLUT4 (muscle/gat) glucose-transporter expression in insulin-sensitive tissues: heterogeneous response. *Biochem. J.* 282:765-772.
- 230.- **Vestergaard H, Weinreb JE, Rosen AS, Bjorbaek C, Hansen L, Pedersen O, Kahn BB** (1995). Sulfonylurea therapy improves glucose disposal without changing skeletal muscle GLUT4 levels in noninsulin-dependent diabetes mellitus subjects: a longitudinal study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80:270-275.
- 231.- **Kern M, Loomis TA, Tapscott EB, Dohm GL** (1993). Increased muscle glucose uptake in response to chronic glyburide treatment is not related to changes in glucose transporter (GLUT4) protein. *Int. J. Biochem* 25:1257-1261.
- 232.- **Garvey WT, Olefsky JM, Matthaei S, Marshall S** (1987). Glucose and insulin co-regulate the glucose transport system in primary cultured adipocytes. *J. Biol. Chem.* 262:189-197.

233.- Klip A, Ramlal T, Bilan PJ, Cartee GD, Culve EA, Holloszy JO (1990). Recruitment of GLUT4 glucose transporters by insulin in diabetic rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172:728-736.