

Efecto de la insulina sobre la
oxidación de acetato- $U-^{14}C$ y su in-
corporación a triglicéridos en adipo-
citos aislados de Gallus domesticus

M^a Inmaculada Rosa Montes Ramírez

DON CARLOS OSORIO FELAEZ, CATEDRATICO DE FISILOGIA GENERAL, QUIMICA BIOLOGICA Y FISILOGIA ESPECIAL, Y DON JOSE ANTONIO GOMEZ CAPI-LLA, PROFESOR ADJUNTO DE FISILOGIA GENERAL Y ESPECIAL DE LA FACUL-TAD DE MEDICINA DE GRANADA.

CERTIFICAN: Que la tesina que presenta D^a INMACULADA ROSA MONTES RAMIREZ, para aspirar al grado de Licenciado en Medicina y Ciru-gía, ha sido realizada bajo nuestra dirección, considerándola sufi-cientemente aventajada para hacerle acreedor de dicho título, siem-pre que así lo considere al Tribunal que designe la Facultad de Me-dicina de la Universidad de Granada.

Granada, Febrero de 1.979

C. Osorio

J. A. Gómez

A mi's padre.

Mi agradecimiento al Prof. D. Carlos Osorio Feláez, Director del Departamento de Fisiología de Bioquímica.

Al Dr. D. José Gómez-Capilla, director de esta tesina, mi gratitud por su orientación y eficaz ayuda.

A D. Francisco Vives Montero, por iniciarme en la tarea investigadora y ofrecermé su incondicional colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A José Miguel Fernández, Juan Rodríguez, M^a Estrella Titos, M^a Eugenia Campos, Joaquín Sancho y demás compañeros de laboratorio por su amistad y cooperación.

Esta tesina ha sido realizada en el Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Facultad de Medicina de Granada.

INDICE

INDICE

I.- <u>INTRODUCCION.-</u>	pág
A.- <u>TEJIDO ADIPOSEO</u>	1
A.1. <u>Generalidades</u>	1
A.2. <u>Lipogénesis</u>	4
A.3. <u>Lipolisis</u>	8
a. Hidrólisis	8
b. Transporte FFA a través de la membrana celular..	9
c. Transporte Sanguíneo de los FFA	10
d. Degradación total	10
e. Acidos grasos plasmáticos	11
A.4. <u>Control del Met. Lipídico</u>	13
Reesterificación de ácidos grasos	13
Ciclo triglicéridos/ácidos grasos	14
Control de la esterificación	16
A.5. <u>Regulación hormonal del Met. Lipídico</u>	18
Catecolaminas	18
HGH	19
ACTH	20
Prolactina	20

	pág
A.6. <u>Acción de la insulina sobre el metabolismo de</u>	
<u>lípidos en aves</u>	21
Producción de insulina	21
Estructura	22
Liberación	22
Receptores	23
Mecanismo de acción	23
Acciones metabólicas	24
A.7. <u>Metabolismo del acetato</u>	28
II.- <u>RESUMEN Y PLANTEAMIENTOS.-</u>	
Resumen y planteamientos	32
III.- <u>MATERIAL Y METODOS.-</u>	
A. Animales	34
B. Compuestos químicos y hormonas	34
C. Medio de incubación	35
D. Método de aislamiento de adipocitos	36
E. Método para determinación de la oxidación de acetato y glucosa	38
F. Método para determinación de triglicéridos .	40

G.Métodos estadísticos.....	41
1.Cálculo de la \bar{x} y del S.E.M.	41
2. Test de comparación de varianzas	42
3. Comparación de dos medias	43
 IV.- <u>RESULTADOS.-</u>	
Tablas y gráficas	46
 V.- <u>DISCUSION.-</u>	
Discusión	56
 VI.- <u>CONCLUSIONES.-</u>	
Conclusiones	55
 VII.- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	66

I • I N T R O D U C C I O N

A.- TEJIDO ADIPOSEO.

A.1.- Generalidades.

No hace muchos años se reconocía al tejido adiposo como un puro depósito de grasa; considerado como tejido conjuntivo con una escasa dotación de nervios y capilares sanguíneos.

Los estudios de HANSBERGER et al., (1.954) mostraron que las células de tejido adiposo derivan, no del tejido conectivo sino de células grasas primitivas, y su examen microscópico demostró que poseía una generosa inervación y vascularización. Los clínicos vienes SCHUR y LOW (1.928) denotaron la importancia metabólica del tejido adiposo, considerando que el papel de la insulina estaba relacionado con la formación y mantenimiento de los depósitos grasos.

Posteriormente las numerosas investigaciones de que ha sido objeto muestran, que aunque la cantidad total de grasa permanece constante está continuamente siendo sintetizada y degradada (SHOENHEIMER y RITTEMBERG; 1.935) (SHOENHEIMER, 1.942) también ha sido señalada la fisiología del tejido adiposo, en sus principales aspectos por la revisión clásica de WERTHEIMER y SHAPIRO (1.948).

La identificación de ácidos grasos plasmáticos como forma en la que los triglicéridos almacenados en el T. A. son movilizados y hechos aprovechables como combustible de otros tejidos corporales (DOLE, 1.956) (GORDON y CHERKES, 1.956) (LAURELL, 1.957) demostraron que el T.A. no es solo capaz de captar grasa del torrente sanguíneo, sino de liberarla también en forma de ácidos grasos, quedando bien

patente que es un lugar con actividad metabólica inherente, que responde a estímulos hormonales, humorales y nerviosos que la regulan (HAZELWOOD, 1.972).

Es un tejido altamente especializado, desarrollándose particularmente en aves y mamíferos con la finalidad de almacenar grasa para suministro de energía al animal en periodos prolongados de ayuno, hibernación, mantenimiento de la actividad muscular en condiciones extraordinarias como el ejercicio, en ciertas especies, de aves, peces e insectos es vital para la migración. Aunque generalmente no se encuentra T.A. en animales inferiores, la grasa se almacena en músculo, hígado y órganos especializados como el cuerpo graso de los insectos; numerosos estudios apuntan las funciones combinadas de hígado y T.A. (NEWSHOLME y START, 1.973).

Se encuentra en numerosas zonas de la economía, pero tiende a concentrarse en región subcutánea y rodeando a las vísceras, cumpliendo una función amortiguadora; su cantidad difiere de unas especies a otras, incluso dentro de una misma especie, en relación directa con la cantidad y calidad de la dieta; parece ser inversamente proporcional a la cantidad de pelo que posea el animal, ya que actúa como aislante térmico. También se encuentra como lubricante en articulaciones.

Su distribución y moderación son reguladas no solo por

factores nerviosos y hormonales, sino también por factores sexuales y hereditarios. Las evidencias acumuladas señalan que posee una función especializada en el mantenimiento de la homeostasis calórica del animal (FREDICKSON Y GORDON, 1958).

Los depósitos de grasa, ofrecen por tanto la más eficiente y conveniente forma de almacenamiento de energía, porque poseen al menos doble valor calórico (9'3 Kcal/gr) que los hidratos de carbono y las proteínas y porque es depositada con un mínimo contenido acuoso.

El catabolismo total de la dieta de ácidos grasos tiene un rendimiento del 41 % de su potencialidad energética que se acumula en forma de enlaces de alta energía, lo cual es comparable con lo que se obtiene en la combustión total de los hidratos de carbono (HAZELWOOD, 1972). Además la riqueza en enlaces C-C y C-H, de la grasa es muy superior a la que poseen los glúcidos. Estos dos factores hacen que sea casi nueve veces más eficiente como almacén de energía que los glúcidos (WEIS y FOGH, 1967).

Constituido por un conglomerado de células esféricas cuya característica principal es la de poseer una gran gota lipídica, que desplaza a la periferia, tanto al citoplasma como al núcleo (ya que en estados de buena nutrición, la célula aparece repleta con la gota de grasa). En aves se han encontrado los mayores acumulos de lípidos localizados en abdomen y región perigonadal. Al examen mi-

microscópico el tejido parece similar al de los mamíferos, a excepción del T.A. localizado en el dorso de la rodilla del pollo, donde está asociado a unos filamentos citoplasmáticos de 70-100 Å de anchura (LUCKENBELL y COHEN, 1966) estos filamentos también se han encontrado al examinar con microscopía electrónica, los adipocitos pertenecientes a la grasa abdominal subcutánea de pollo (VIVES, 1979). Otra característica diferencial es que las aves no poseen tejido adiposo pardo (JOHNSTON, 1971).

A.2.- LIPOGENESIS

Se han reconocido diferencias en algunos aspectos del metabolismo de hidratos de carbono y lípidos y en muchas de las respuestas allí asociadas entre el Gallus domesticus con respecto a otras especies (O'HEA y LEVEILLE, 1969). Entre las características diferenciales del pollo encontramos una glucemia casi doble que la del mamífero (BELL y STURKIE, 1965) y una resistencia a la hipoglucemia aguda (HOUPPT, 1958).

En los mamíferos el tejido adiposo juega un papel más importante en la síntesis de ácidos grasos y el hígado permanece en un segundo plano (FELLER, 1954) (HANSBERGER et al., 1954) (HUTCHENS et al., 1954) (FAVERGER, 1965).

En aves, sin embargo, el hígado es el principal responsable de la lipogénesis, mientras que el tejido adiposo lo es del depósito

de triglicéridos (GOODRIDGE, 1964 ; GOODRIDGE y BALL, 1966, 1967a, b,c,; GOODRIDGE, 1968 a; LEVEILLE, 1969 a; O'HEA y LEVEILLE, 1969).

Los factores responsables del comienzo y desarrollo de la lipogénesis en pollos pueden ser estudiados en el periodo postnatal. La lipogénesis pasa desde unas tasas muy bajas en el embrión a ser muy alta en el pollo adulto (SHOENHEINER y RITTEMBERG, 1936; KIL-SHEINER et al., 1960).

La proporción de síntesis de ácidos grasos en tejido adiposo de pollo cultivado in vitro se mantiene sobre el 5 % y responde poco a la acción de la insulina (lipogénica en mamíferos). Las experiencias con pájaros frágilidos in vivo y con piezas de grasa abdominal in vitro, describen que la insulina no afecta a la incorporación de la glucosa y el acetato a ácidos grasos; parece que el tejido adiposo posee una cierta insensibilidad a la insulina (GOODRIDGE, 1964).

GOODRIDGE y BALL, (1966) no encontraron que se influenciara la actividad de los enzimas en tejido adiposo avar por el ayuno y la realimentación como ocurre en mamíferos. Los mismos autores comprobaron que la incorporación de glucosa a lípidos por el tejido adiposo de palomo es menor que la encontrada en ratas (GOODRIDGE y BALL, 1967c). Resultados tales como los encontrados por O'HEA y LEVFILLE (1968) estudiando la lipogénesis en pollos juvenes y adultos, mostraron que los enzimas (acetil-CoA carboxilasa, enzima

málico y enzima de división del citrato) responsables de la lipogénesis, poseen una menor actividad en tejido adiposo que en hígado; datos similares se recogen en otros trabajos (SHAPIRA et al., 1978).

De estos estudios se deduce que menos del 4 % de la lipogénesis total corporal, a partir de glucosa puede atribuirse al tejido adiposo aviar, mientras que el resto ocurre en el hígado.

Los estudios sobre *Acanthis Flammea* indican que las variaciones en las condiciones ambientales (temperatura, periodo luminoso) y fisiológicas (migración, celo, puesta, stress, etc.) condicionan efectos significativos sobre la composición de los ácidos grasos de los depósitos lipídicos, mientras que las variaciones dietéticas poseen poco o ningún efecto (WEST y MENG, 1968).

Las dietas ricas en hidratos de carbono, aceleran las reacciones implicadas en la lipogénesis, mientras que ésta se inhibe por el ayuno, restricción alimenticia, o insuficiencia insulínica, situaciones todas ellas de gran utilización de ácidos grasos (HAZEL WOOD, 1972).

El principal lugar donde se verifica este proceso parece ser el citoplasma de la célula, probablemente en asociación con el retículo endoplásmico liso. La formación de acetil-CoA desde el piruvato se realiza en la mitocondria. La conversión de acetil-CoA a malonil CoA por acción de la acetil-CoA carboxilasa, parece ser un paso limitante de la síntesis de ácidos grasos.

Las fuentes de NADPH se requieren al menos en dos etapas reductoras. El NADP, reducido se genera especialmente en la vía de las pentosas fosfato, así como en las actividades del enzima málico e isocitrato deshidrogenasa.

Estas reacciones ocurren en la mayoría de los tejidos sobretodo en el hígado aviar, tan pronto como la dieta provee del adecuado caudal de glucosa-6-P o piruvato o ambos y esto permite disponer del acetyl-CoA necesario para reaccionar con la acetyl-CoA carboxilasa.

La piruvato quinasa del tejido adiposo de pollo es muy sensible a la presencia de fructosa 1,6-P, lo cual difiere considerablemente de lo encontrado en tejido adiposo de mamíferos (LEVEILLE 1969b ; HAZELWOOD, 1972).

Así la degradación anaerobia de la glucosa podría controlar la formación de piruvato y la lipogénesis en tejido adiposo, proveyendo el adecuado acetyl-CoA (como resultado de la influencia de la fructosa 1,6-P sobre la depresión de la Km del enzima por el fosfoenol-piruvato) (HAZELWOOD, 1972).

Ya ha quedado establecido el importante papel que juega el hígado aviar en la síntesis total de ácidos grasos de novo, por ser baja la actividad de los enzimas de la ruta de las pentosas fosfato en este órgano, mientras la del enzima málico, es muy alta; las vías formadoras tienen probablemente un pequeño papel en la

provisión de equivalentes reductores para la síntesis lipídica (O'HEA y LEVEILLE, 1969).

Una vez formados en el hígado los lípidos se transportan en el plasma en forma de β -lipoproteínas o VLDL, hasta los diversos depósitos de lípidos, principalmente al tejido adiposo (O'HEA y LEVEILLE, 1969).

A.3. LIPOLISIS.

a) Hidrólisis.

La hidrólisis de los triglicéridos depositados en el tejido adiposo a sus constituyentes antes de la movilización de los FFA, ocurre dentro del adipocito, usualmente bajo el concurso del sistema de la triglicérido lipasa, cuyo pH óptimo es 6-7; no se inhibe como le ocurre a la lipoproteinlipasa (o factor de aclaramiento) por el fosfato, la protamina o las concentraciones elevadas de sal. Además, esta última es específica de los quilomicrones o VLDL, se encuentra fuera del adipocito y su pH óptimo es alcalino.

El control de la lipolisis ha sido exhaustivamente estudiado en mamíferos (utilizando habitualmente piezas de grasa epididimal de rata) a partir de la liberación de ácidos grasos y glicerol al medio (GORDON y CHERKES, 1958 ; WHITE y ENGEL, 1958).

Se anticipó que el nivel plasmático de FFA pudiera elevarse después de la ingestión de alimento (fundamentalmente grasa)

cuando los triglicéridos de los quilomicrones están siendo aún hidrolizados por la lipoproteínlipasa. DOLE (1956) y GORDON & CHERKES (1956) analizaron esta hipótesis encontrando sorprendentemente que el nivel de FFA en plasma desciende después de la comida, pero se eleva durante el ayuno y este nivel vuelve a descender rápidamente después de la administración de glucosa e insulina.

Se asume en general que no hay tasas significativas de liberación de triglicéridos desde el tejido adiposo. Las investigaciones al respecto no son muy extensas por lo que si este proceso ocurre es insignificante en relación con la liberación de ácidos grasos. Las sucesivas etapas de la hidrólisis de triglicéridos son catalizadas por tres enzimas al menos : 1) triglicérido lipasa, 2) diglicérido lipasa, 3) monoglicérido lipasa. La actividad de 3 y 2 son de 10 a 100 veces mayor que la del enzima 1, lo que sugiere que este sea el enzima regulador. De acuerdo con esta idea, la actividad de la triglicérido lipasa puede ser incrementada por hormonas tales como el glucagón y catecolaminas, mientras que la actividad de 2 y 3 no se afectan por las hormonas mencionadas. La liberación de ácidos grasos por el tejido adiposo, depende obviamente de las tasas de lipólisis aunque no solo puede considerarse este proceso (NEWSHOLME y START, 1973). Como veremos más tarde esta regulación es muy diferente en aves y mamíferos.

b) Transporte de ácidos grasos a través de la membrana celular

El transporte de FFA a través de la membrana del adipocito,

puede ocurrir por simple difusión y por lo tanto su tasa de liberación es meramente proporcional al gradiente de concentración y no es un proceso dependiente de energía, aunque si se vé influenciado por factores metabólicos y hormonales (en los sistemas in vitro parece que se vé influenciado por la presencia de albúmina en el medio de incubación (NEWSHOLME y START, 1973).

c) Transporte sanguíneo de los FFA.

Una vez en el torrente circulatorio, los FFA forman un complejo con las lipoproteínas ya que los ácidos grasos de larga cadena son insolubles en el medio plasmático, fundamentalmente acuoso, pudiendo transportarse así en cantidades mucho mayores. Mientras que los FFA representan una pequeña porción de los lípidos plasmáticos totales (< 6 %) la mayoría existen en forma de triglicéridos, fosfolípidos y colesterol. Los triglicéridos en el pollo son transportados como β -lipoproteínas desde el hígado al tejido adiposo (O'HEA y LEVEILLE, 1969).

d) Degradación total.

Subsecuentemente la captación y oxidación de este complejo lipoproteico ocurre sobretodo en las células hepáticas, músculo, cerebro, riñón y corazón (para el cual son la principal fuente de energía).

La entrada en las células ocurre gracias al concurso de la lipoproteinlipasa, que como decíamos antes se encuentra fuera de la célula; una vez en el citoplasma se convierten los FFA en un intermedio activo, etapa que requiere ATP y una tiokinasa y son sometidos a

β -oxidación. La degradación total, prosigue en la mitocondria.

e) Acidos grasos plasmáticos.

En situaciones que implican una elevada tasa de oxidación de ácidos grasos tales como el ayuno etc., se forma un exceso de aceti-CoA en el hígado con la consiguiente producción y liberación al plasma de cuerpos cetónicos (aceto-acetato, β -hidroxibutirato y acetona).

Por otro lado, la eetonemia inducida por la insulina per se se asocia a un incremento de la movilización de ácidos grasos en el pollo, observado por varios autores (HEALD et al., 1965 ; HAZELWOOD y LORENZ, 1959 ; LANGSLOW, 1970). Este incremento de los FFA plasmáticos en respuesta a la insulina, ocurre tanto en pollos normales intactos, como en ayunados y pancreatectomizados (LEPKOVSKY et al., 1967 ; LANGSLOW et al., 1970).

Contrariamente a lo observado en mamíferos, es bien conocida la disminución de la concentración de FFA plasmáticos causada por inyección de insulina (RENOLD y CAHILL, 1965) este decaimiento es obtenido por dosis de insulina tan pequeñas que no afectan a la glucemia.

Comparando varias especies aviares se encontró que la inducción de la liberación de FFA en respuesta a la administración de insulina sólo difiere marcadamente en buhos y gansos (GRANDE y PRIGGE, 1970). Además hay una mejor correlación entre los niveles de

glucagón y FFA que entre los niveles de insulina y glucosa en sangre (GRANDE, 1968). Parece evidente que el sistema simpático adrenal no está involucrado en esta respuesta paradójica de las aves a la insulina, ya que el tejido adiposo de pollo no responde a las catecolaminas (HEALD et al., 1965 ; LANGSLOW y HALES, 1969; LANGSLOW et al., 1970).

Como han comprobado ampliamente distintos autores (HEALD et al., 1965; CARLSON et al., 1964 ; LANGSLOW, 1972) el glucagón actúa directamente sobre el tejido adiposo aviar elevando los FFA plasmáticos, efecto similar al paradójico que provoca la insulina, y que se podría explicar por un efecto secretagogo de ésta sobre las células α_2 del lóbulo esplénico del páncreas, que responden liberando glucagón en las elevaciones de insulina y como ésta carece de efecto antilipolítico frente a la lipólisis estimulada por el glucagón, se incrementa la movilización y el nivel de FFA plasmáticos in vivo (LANGSLOW y HALES, 1969; LANGSLOW, 1971; LANGSLOW y HAZELWOOD, 1975) ya que el glucagón liberado es paralelo en el tiempo al incremento de FFA (HAZELWOOD y LANGSLOW, 1978).

Sin embargo in vitro el tejido adiposo aviar no responde a la insulina con ningún cambio en la liberación de glicerol o FFA.

Los datos de LEPKOVSKY et al., (1967) en pollos pancreaectomizados, que respondieron como los normales - con un incremento de FFA a la inyección de insulina (efecto paradójico)- pudiendo

ocurrir muy bien por quedar residuos pancreáticos, ya que no hubieran sobrevivido al faltarles el glucagón (son los únicos animales que presentan un síndrome selectivo de deficiencia al glucagón) (HAZELWOOD, 1971).

A.4. CONTROL DEL METABOLISMO LIPIDICO.

La liberación de ácidos grasos por el tejido adiposo depende de las tasas de lipólisis como dijimos antes, aunque además de este proceso hay que considerar:

La reesterificación de ácidos grasos para formar triglicéridos que puede jugar un importante papel en la regulación de la movilización de FFA; si la lipólisis ocurriera en ausencia de esterificación todas las moléculas de glicerol liberadas del tejido adiposo serían acompañadas por tres moléculas de ácidos grasos.

Sin embargo en experimentos realizados con piezas de grasa de rata, aisladas e incubadas in vitro han mostrado que en general se libera mucho más glicerol que ácidos grasos ; como una gran cantidad de ácidos grasos no pueden ser detectados, se asume como explicación más simple ,que estos son reesterificados para formar triglicéridos. Este tipo de experimento, en el que se siguen los cambios producidos en los lípidos totales y el glicerol (los que hay en el tejido más los que hay en el medio), ha sido denominado como método del balance no isotópico(STEINBERG, 1973) para estimar las tasas de lipoli_

sis y esterificación (estimando que la tasa de síntesis de novo de FFA y de oxidación de estos son tan bajas que merecen ser ignoradas).

Otro soporte para esta hipótesis de la lipólisis y esterificación simultáneas se ha obtenido de experimentos en los que el carbono marcado de la glucosa fué incorporado a glicerol de glicéridos al mismo tiempo que los FFA y el glicerol estaban siendo liberados al medio ; se concluye por tanto que la lipólisis y la esterificación ocurren simultáneamente y por ello en el tejido adiposo opera un ciclo triglicéridos/ácidos grasos.

Ciclo de triglicéridos y ácidos grasos , en principio puede parecer un sistema excesiva e innecesariamente complejo para la regulación del depósito y movilización de ácidos grasos ; además la provisión de glicerol-P y la continua activación de los FFA a fatty acil-CoA requiere ATP. El tejido consideró mas económico el poseer un control independiente de ambos sistemas, de tal manera que nunca serían activos simultáneamente.

La lipólisis sería inhibida cuando se están sintetizando triglicéridos, y la esterificación se inhibiría durante la caída de triglicéridos. Este ciclo es un ejemplo de control por el sustrato (NEWSHOLME y START, 1973).

Las ventajas de este ciclo se pueden resumir en una mayor sensibilidad del mecanismo de control con respecto a la movilización de FFA - en comparación con el control de la lipasa sola - y una particular

ventaja de este ciclo, es la reducción al mínimo de la posibilidad de error y la falta de especificidad de este mecanismo de regulación de la lipólisis.

Tomando un hipotético animal muy primitivo, si la glucemia descendiera en el medio también lo haría la tasa de ingreso de glucosa en el adipocito y consecuentemente la glucólisis y la concentración de glicerol-P, la tasa de esterificación sería deprimida y la concentración de FFA intracelular se incrementaría, aumentando así la movilización de ácidos grasos. Esta secuencia de hechos que conduce a la liberación de ácidos grasos, sería desencadenada solamente por una caída de glucemia.

En el caso contrario, en que se elevaran los niveles de glucemia, la glicólisis, la concentración de glicerol-P y la tasa de esterificación, se incrementarían, mientras que la movilización de ácidos grasos sería inhibida.

Aunque no hay evidencias de que exista tal mecanismo de control en animales primitivos, aporta sin embargo una explicación en contraposición con los más sofisticados controles hormonales encontrados en los animales superiores.

En mamíferos y posiblemente otros animales, la glucemia no puede caer más allá del 30 %. Por la continua demanda de glucosa por el cerebro y otros tejidos, entrarían a formar parte en la regulación de la lipólisis las hormonas en aquellas situaciones que no esten rela-

cionadas con fluctuaciones de la glucemia (stress).

Control de la esterificación , la glucemia en la rata y el hombre no cae más allá del 30 % durante dos días de ayuno, este descenso es insuficiente para causar un marcado incremento de la movilización de FFA. En el mismo periodo, la insulina en plasma desciende alrededor del 80 %. Esto explica porque la secreción de esta hormona es regulada no sólo por la glucemia sino por secreciones duodenales (secretina, gastrina, pancreozimina) y otros factores sin identificar todavía pero que son liberados específicamente en respuesta a la presencia de glucosa en el duodeno, mientras su ausencia reduce la secreción de estas hormonas responsables en última instancia de la depresión de la insulina plasmática durante el ayuno (UNGER y EISENTRAUT, 1969).

La insulina es conocida como reguladora de la esterificación (HALES y RANDLE, 1963). Al estimular al transportador de la glucosa en la membrana del adipocito, incrementa la glucolisis y la concentración de glicerol-P. Así durante el ayuno, el descenso de los niveles plasmáticos de insulina se traduce en una disminución de la proporción de glucolisis y de la concentración de glicerol-P. Esto restringe la esterificación y en consecuencia se estimula la utilización de ácidos grasos. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que el contenido de glicerol-P en el tejido adiposo disminuye durante el ayuno y se incrementa marcadamente cuando el tejido adiposo de un animal ayunado se incubaba con glucosa e insulina.

Existen un gran número de problemas asociados con la simple idea de que la esterificación es controlada por la concentración de glicerol-P la cual a su vez es controlada por otros factores que permanecen aún sin identificar hasta el presente (NEWSHOLME , START, 1973) por lo tanto no se puede enfatizar que la disminución de la concentración de glicerol-P limite la tasa de esterificación, por lo que las variaciones en su concentración deben considerarse como un mecanismo potencial de control.

En mamíferos, la insulina acelera el metabolismo de la glucosa(WINEGRAD y RENOLD, 1958) inhibiendo la lipasa hormono-sensible (JUNGAS y BALL, 1963), el tejido adiposo de rata exhibe una alta capacidad para la esterificación de FFA a glicéridos de glicerol, fenómeno caracterizado por una razón molar FFA/glicerol, siempre menor que tres.

Sin embargo en tejido adiposo de pollo y palomo la insulina no tiene ninguno de estos efectos, no acelera el metabolismo de la glucosa, ni inhibe la lipasa hormono-sensible (no es antilipolítica). La razón molar FFA/glicerol, es siempre tres o mayor, en el tejido adiposo de pollo, sugiriendo una falta de reesterificación y la posible acumulación de mono y diglicéridos(GOODRIDGE y BALL, 1965). Aunque la diferencia existente entre el tejido adiposo de pollo y palomo es la capacidad de este de responder a la adrenalina con un efecto lipolítico.

A.5. REGULACION HORMONAL DEL METABOLISMO LIPIDICO

Las investigaciones en tejido adiposo de pollos, tanto in vivo como in vitro durante el periodo postnatal precoz y en adultos indican que la regulación de la lipólisis en aves es diferente de la encontrada en mamíferos, justificada en principio por la insensibilidad del tejido adiposo aviar a la acción hormonal (CARLSON et al., 1964 ; GOODRIDGE y BALL, 1965 ; 1966 ; 1967c ; GOODRIDGE, 1968a ; HAZELWOOD, 1972).

Es necesario apuntar la insuficiencia de datos en relación con las actividades endocrinas en aves.

En tejido adiposo de rata, la lipólisis es estimulada claramente in vivo en situaciones fisiológicas tales como el stress (disminución de la temperatura ambiental, ansiedad, etc.). La inyección de adrenalina y noradrenalina y la estimulación eléctrica de nervios (se libera noradrenalina en la terminación nerviosa) moviliza los FFA e incrementa sus niveles y los de glicerol plasmático (NEWSHOLME y START, 1973). Como es sabido las catecolaminas actúan a través del AMP_c (SUTHERLAND et al., 1965 ; BUTCHER et al., 1965) el cual estimula la proteinquinasa del tejido adiposo, la cual fosforila a la triglicérido lipasa inactiva y la convierte en triglicérido lipasa fosforilada, catalíticamente activa (CORBIN et al., 1970).

La adrenalina produce glucogenólisis hepática (por activación de la adenil-ciclase) e hiperglucemia en respuesta a los descen

sos de la temperatura ambiental (HAZELWOOD, 1972). Se apuntó la posibilidad de un efecto activador sobre la liberación de catecolaminas para amortiguar la hipoglucemia inducida por la insulina en el pollo. Sin embargo la hipoglucemia causada por inyecciones de insulina de pollo y buey y por tolbutamida no concuerdan con esta hipótesis de la liberación de catecolaminas. Mientras que la insulina de buey origina un moderado aumento de los niveles de adrenalina, la insulina de pollo estimula apreciablemente su liberación y la tolbutamida no tiene efecto, los tres agentes mencionados depleccionan la noradrenalina. Aunque el páncreas aviar posee una escasa capacidad insulinogénica inmediata, parece que el papel de las catecolaminas en la regulación del metabolismo de estos animales, es la de un agente anti-insulina (HAZELWOOD, 1972).

Se ha encontrado que el tejido adiposo mesentérico de gallinas y pollos no responde in vitro a dosis de noradrenalina 20 veces ma yores a las que son efectivas en tejido adiposo de rata (CARLSON et al., 1964 ; LANGSLOW y HALES, 1969). Las catecolaminas parecen no tener efecto adipoquinético en pollos, patos y pavos (GRANDE, 1969).

No se ha establecido que hormona hipofisaria es la responsable del mantenimiento del balance graso, pero los pollos adultos hipofisectomizados se hacen obesos, lo cual implica un deterioro del metabolismo lipídico (GIBSON y NALBANDOV, 1966).

Aunque no está firmemente establecido , parece que la HGH circulante puede relacionarse con los niveles de ácidos grasos circulante

tes en Gallus domesticus (REYNAERT et al., 1975 ; HARVEY y SCANES, 1977).

La hiperglucemia provocada por inyección de ACTH (usualmente porcino) a dosis suprafisiológicas en pollos, se asocia a un aumento de FFA, hipercolesterolemia y retardo del crecimiento, gluconeogénesis a expensas de los depósitos proteicos y glucogénesis hepática concomitante por inhibición de los enzimas glucogenolíticos del hígado, siendo los mediadores de esta acción los esteroides corticosuprarrenales (HEALD et al., 1965). En tejido adiposo in vitro, sólo se obtiene respuesta a dosis muy superiores a las fisiológicas, traduciendo habitualmente por un incremento de la lipólisis (LANGSLOW y HALES, 1969).

El tejido adiposo de aves muestra una resistencia al efecto adipocinético de la prolactina, mientras el hígado responde incrementando la tasa de incorporación de glucosa y acetato a ácidos grasos (GOODRIDGE y BALL, 1967). Estas observaciones refuerzan la hipótesis de que en aves, el principal lugar de lipogénesis es el hígado. Sobre la movilización de ácidos grasos y triglicéridos, esta hormona tiene un efecto más profundo en hígado que en tejido adiposo, lo que sugiere que la prolactina y el glucagón posean un efecto sinérgico para proveer del sustrato lipídico necesario antes y durante la migración (HAZELWOOD, 1972). La hipoglucemia precoz del ayuno desciende la secreción de prolactina en aves normales, mientras que la hiperglucemia estimulada por el glucagón induce una marcada elevación de su secreción. La

administración de glucosa e insulina no modifica los niveles de prolactina (HARVEY et al., 1978).

A.6. ACCION DE LA INSULINA SOBRE EL METABOLISMO DE LOS LIPIDOS EN AVES.

La insulina se elabora en las células β del páncreas endocrino aviar, dispersas principalmente en los lóbulos dorsal, tercero y ventral (HAZELWOOD, 1973). La cantidad de insulina presente en el páncreas aviar es mucho menor que en el mamífero (KIMMEL et al., 1968).

Además de la insulina y el glucagón se ha descrito e identificado una tercera hormona Avian pancreatic polipeptide (APP) (EPPLE, 1965 ; KIMMEL et al., 1968) que muy bien podría representar el equivalente aviar de la gastrina (KIMMEL et al., 1975; HAZELWOOD y LANGSLOW, 1978).

Los niveles de insulina circulante (30-40 μ U/ml) en plasma de pollo y contenida en el páncreas del ave son mucho menores que los de glucagón (LANGSLOW y HALFS, 1971) respondiendo quizás a este motivo la elevada glucemia que exhiben las aves con respecto a los mamíferos (HAZELWOOD y LORENZ, 1957). La mayor parte de las aves, no desarrollan diabetes permanente tras la extirpación quirúrgica del páncreas o la administración de aloxana (HAZELWOOD, 1972).

La pancreatectomía radical en patos, pollos y gansos produce

una fuerte hipoglucemia, convulsiones y muerte, esto sólo puede prevenirse con administración de glucosa o glucagón (LANGSLOW y HALES, 1971; HAZELWOOD, 1972) este modelo de respuesta se produce al extirpar el lóbulo esplénico, que sólo contiene células α_2 productoras de glucagón que es el principal implicado en el mantenimiento de los niveles de glucemia (glucemia normal en el pollo, 200 mg/100 ml aproximadamente).

Estos y otros datos anteriores sugieren que en el ave el glucagón supera en importancia a la insulina como regulador metabólico. Las acciones metabólicas del glucagón son bien conocidas en aves, produciendo lipólisis en tejido adiposo con incremento de FFA y triglicéridos plasmáticos, proceso que no puede desintegrarse de la glucogenólisis e hiperglucemia subsecuente (GRANDE y PRIGGE, 1970; HAZELWOOD, 1972).

La estructura de la insulina aviar ha sido descrita por SMITH (1966) y (KIMMEL et al., 1968). Se ha purificado la insulina de pollo estableciendo su equivalencia con la humana utilizada en radioinmuno análisis (SIMON et al., 1974).

La liberación de insulina en mamíferos, se estimula con elevaciones discretas de la glucemia y con administración de tolbutamida y glucagón (SAMOLS et al., 1965 ; TURNER y MCINTYRE, 1966).

Un efecto inesperado se encontró al administrar tolbutamida a pollos y patos pancreatectomizados y enterectomizados. En estos animales se provocó un incremento de la insulinemia (HAZELWOOD, 1958 ;

MIRSKY y GITELSON, 1957; 1958 ; COLGA y HAZELWOOD, 1976) lo que sugiere la existencia de una fuente extrapancreática de insulina. Esta hipótesis se apoya en la resistencia de los pollos a las técnicas diabéticas, tales como el tratamiento con aloxana y estreptozotocina (LANGSLOW, et al., 1970) mientras que el glucagón es secretagogo fuerte en mamíferos, en aves induce una liberación bifásica de insulina (KING y HAZELWOOD, 1976; HAZELWOOD y LANGSLOW, 1978).

Los receptores celulares para la insulina en células grasas han sido exhaustivamente estudiados en mamíferos (CUATRECASAS, 1971 a, b, c, d., 1972 ; CUATRECASAS e ILLIANO, 1971). En aves los estudios al respecto son muy escasos y sólo hay datos relativos a los eritrocitos de pavo y pollo y a los hepatocitos de pollo (SIMON et al., 1977).

Los receptores del hepatocito son cinco veces menos numerosos que en la rata, pero similares y dada la escasa acción de la insulina en tejido adiposo de pollo (GOMEZ-CAPILLA y LANGSLOW, 1977) con respecto a la encontrada en tejido adiposo de mamífero, se puede suponer que existen receptores similares a los encontrados en el mamífero (CUATRECASAS, 1971) pero en menor número.

El receptor una vez fijada y reconocida la insulina en su superficie, induce a un efector que genera un compuesto intracelular que actúa de segundo mensajero, según el modelo descrito por SUTHERLAND y RALL (1960) para explicar el mecanismo de acción de las hormonas polipeptídicas; aunque no se ha identificado el efector ni el segundo mensajero, se

especula con la posibilidad de que sean el Ca^{++} y el GMP_c intracelulares coordinadamente los que desencadenan la secuencia de sucesos y acciones biológicas de la insulina, ya que en tejido adiposo de rata se incrementan en respuesta a esta hormona (ILLIANO et al., 1973 ; FAIN y BUTCHER, 1976; VYDELINGUM et al., 1978). Sin embargo en aves este mecanismo es desconocido y se carece de bibliografía al respecto.

En mamíferos la insulina es una hormona fundamental en la regulación del metabolismo de glúcidos y lípidos. Cuando se une a los receptores aumenta el transporte activo de glucosa hacia el interior de la célula. Este hecho unido a la inducción enzimática, origina en el tejido adiposo un fuerte aumento de la lipogénesis; además muestra un claro efecto antilipolítico, inhibiendo la lipólisis inducida por el glucagón y las catecolaminas.

Sin embargo, en las aves, el papel regulador de la insulina es menos manifiesto y permanece desconocido en gran parte. La importancia de estos vertebrados radica en que participan con los mamíferos en propiedades comunes, tales como las de poseer un tejido adiposo subcutáneo muy bien desarrollado y la de ser homeotermos (GRANDE, 1969).

Un hecho llamativo es la resistencia de las aves a la producción de hipoglucemia por dosis altas de insulina exógena, que serían letales para muchos mamíferos (HAZELWOOD, 1965). La causa de esta resistencia podría ser el empleo de insulinas heterólogas (HAZELWOOD et al., 1968).

La insulina en aves es poco lipogénica (y no disminuye los FFA plasmáticos como en el mamífero) (CARLSON et al. ,1964 ; GOODRIDGE yBALL,1965; GOODRIDGE 1968 a, b; LANGSLOW y HALES, 1969; 1970; LANGSLOW y HAZELWOOD, 1975; GRANDE. 1969; 1976) además produce una hipoglucemia no severa, e incremento de los FFA plasmáticos y disminución del nitrógeno de aminoácidos en plasma (HAZELWOOD y LORENZ, 1959; HEALD et al.,1965; LANGSLOW et al.,1970).

En el tejido adiposo de pollo, la débil respuesta lipogénica a la insulina, respecto de la obtenida en mamíferos puede deberse a que en las aves dicho tejido interviene en un pequeño porcentaje en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, siendo su función primordialla de almacenamiento de grasa, mientras el hígado protagoniza la lipogénesis . Es de suponer que en un tejido con escasa actividad lipogénica los efectos de un agente lipogénico como la insulina seran menos ostensibles.

Las aves son más sensibles a su propia insulina que a la de origen mamífero. In vivo ,el pollo responde con hipoglucemia a dosis de insulina homóloga mucho menores que las necesarias para inducir idéntica respuesta a la obtenida cuando se usa insulina de mamífero (HAZELWOOD et al., 1968).

En los mamíferos , sin embargo la insulina de pollo es más activa, en idénticas condiciones y también a igual dosificación,

que la insulina porcina estimulando la incorporación de glucosa e inhibiendo la lipólisis estimulada por el glucagón en adipocitos de rata. Los adipocitos de pollo necesitan dosis 1.000 veces mayores de insulina homóloga, que las requeridas por la rata para obtener efectos similares. Además la adición de insulina no modifica la lipólisis inducida por el glucagón en los pollos (MCCUMBEE y HAZELWOOD, 1978).

Según SIMON y colaboradores (1974), la insulina de pollo es doblemente potente con respecto a la porcina, al estimular la oxidación de glucosa en adipocitos de rata ; se intenta explicar la superpotencia de esta hormona por una mayor afinidad a los receptores del mamífero.

Estos datos rechazan enérgicamente las diferencias estructurales de ambas insulinas como factor responsable de la menor respuesta del ave a la insulina.

La existencia de factores plasmáticos que inactiven o destruyan la insulina heteróloga en el pollo o la existencia de caracteres diferenciales en los receptores, pudieran ser las causas determinantes de la escasa acción lipogénica de la insulina en aves (HAZELWOOD et al., 1968). No obstante la primera posibilidad se puede eliminar haciendo estudios in vitro, pero en ellos vuelve a obtenerse la misma respuesta mínima, lo cual descarta esta hipótesis.

En cuanto a la segunda conjetura, ya se apuntó que el número de receptores para la insulina en el hepatocito de pollo era menor (SIMON et al., 1977); además parece que son idénticos estos receptores

en el pollo y en el mamífero ; a pesar de los cambios estructurales sufridos por la insulina de pollo a lo largo de la evolución, sus receptores no se han modificado (DE MEYTS et al., 1975). Aunque este estudio se ha llevado a cabo en hepatocitos, se podría suponer que en adipocitos de pollo sucede algo similar (VIVES, 1979).

Ya se comentó la escasa actividad enzimática del tejido adiposo aviar (GOODRIDGE y BALL, 1966 ; SHAPIRA et al., 1978) ya que su función principal es la deposición grasa de los lípidos sintetizados en el hígado.

Junto a esto, en la mayoría de los trabajos con tejido adiposo in vitro, se usaban piezas de tejido, con este sistema se produce una respuesta desigual por parte de las células ya que las que permanecen en el interior del tejido tienen un defectuoso contacto con el medio de incubación y pueden entrar en hipoxia.

Desde la aparición de técnicas para el aislamiento de adipocitos (ROBBELL, 1964) se ha establecido que las células aisladas son más sensibles a la insulina (y a otras hormonas) que las piezas de tejido. Estas necesitan dosis de insulina tan altas como 10^4 ng/ml y mayor tiempo de incubación que las células aisladas para que la hormona tenga efectos significativos (LANGSLOW y HALES, 1969).

Usando células aisladas de tejido adiposo , GOMEZ-CAPILLA y LANGSLOW, 1977 demostraron por primera vez que dosis fisiológicas de insulina producían un aumento significativo de la captación de glucosa,

síntesis de triglicéridos y producción de CO_2 a partir de glucosa. Está bien establecido en mamíferos que la insulina tiene una rápida acción sobre el tejido adiposo produciendo un aumento en la síntesis de triglicéridos a partir de glucosa y en la producción de CO_2 resultando incrementos del orden del 400 % con respecto a los controles (WINEGRAD y RENOLD, 1958).

Continuando los trabajos de GOMEZ-CAPILLA y LANGSLOW, (1977) se ha demostrado que la incorporación de glucosa a triglicéridos y su oxidación a CO_2 por parte del adipocito aislado de pollo, son procesos dependientes del tiempo de incubación y de la concentración de glucosa en el medio, son saturables con el tiempo y con la concentración de glucosa ; la insulina además ejerce un efecto significativo sobre la síntesis de triglicéridos y la producción de CO_2 a partir de glucosa, para cualquier concentración de ésta en el medio de incubación. La ruta cuantitativamente más importante en el tejido adiposo de pollo es la de oxidación de glucosa a CO_2 (VIVES, 1979) .

El metabolismo de la glucosa en el tejido adiposo aviar ha sido aclarado en los últimos años (GOMEZ-CAPILLA y LANGSLOW, 1977 ; VIVES 1979 ; SANCHO, 1979) así como los efectos que tiene la insulina sobre éste. Sin embargo, es escasa la información que se tiene sobre el metabolismo del acetato y sobre todo de los posibles efectos que la insulina pueda ejercer sobre él.

A.7. METABOLISMO DEL ACETATO

Volvemos a establecer diferencias entre las funciones del tejido adiposo en mamíferos y aves. Estudiando la incorporación de acetato marcado a lípidos no saponificables, ácidos grasos y CO_2 en piezas de tejido adiposo e hígado de rata, se ha demostrado que mientras que el tejido adiposo incorpora sólo cantidades insignificantes de acetato marcado en la fracción de lípidos no saponificables, en el hígado esta incorporación fué más importante. Sin embargo, la incorporación a FFA en tejido adiposo fué tan grande o más que la obtenida en piezas de hígado, resultando el porcentaje de ^{14}C encontrado en ésta fracción doble cuando se utilizó acetato-1- ^{14}C que con acetato-2- ^{14}C . Usando el acetato 1,2- ^{14}C se encontró una cantidad similar de radioactividad en FFA de tejido adiposo e hígado, aunque la incorporación fué más precoz que cuando se usó el acetato marcado en el carbono metilo. La posibilidad de que los carbonos individuales del acetato usen rutas metabólicas diferentes en tejido adiposo es discutible. Se usó entonces bicarbonato- ^{14}C para obtener información sobre el mecanismo por el cual el átomo de carbono carboxilo marcado contribuye más directamente a la síntesis de FFA en el tejido adiposo, analizando la posibilidad de que el carbono carboxilo pase a CO_2 antes de incorporarse a ácidos grasos, pero la recuperación de ^{14}C en los lípidos fué despreciable, eliminando la posibilidad de que el bicarbonato fuera un intermediario obligado en la conversión del carbono carboxilo del acetato a ácidos grasos en tejido adiposo (FELLER, 1954).

En piezas de tejido adiposo de rata, la insulina no estimula la oxidación hasta CO_2 y la incorporación a lípidos cuando se usa como precursor el acetato-1- ^{14}C ; sin embargo la adición de glucosa al medio de incubación estimuló la lipogénesis a partir de acetato por la insulina (WINEGRAD y RENOLD, 1958). Acorde con esta hipótesis ya señalaron LANGDON (1957) y SIPERSTEIN (1957) la relación aparente que existe entre la actividad lipogénica del tejido adiposo y el metabolismo de la glucosa. En opinión de estos autores el tejido adiposo es el lugar cuantitativamente mayor de acción de la insulina sobre la lipogénesis de la glucosa.

MANCHESTER (1963) observó que en diafragma aislado de rata, la incorporación de acetato-1- ^{14}C a grasas neutras y fosfolípidos, se activa con la adición de insulina en ausencia o no de glucosa. La proporción de incorporación de acetato cuando está presente sólo la glucosa, es superior a la producida sólo por la insulina. Estos resultados proporcionan evidencias de que la acción de la insulina sobre los procesos anabólicos en diafragma de rata, no dependen de la estimulación del transporte de glucosa acorde con las observaciones de LEVINE et al., (1950) y PARK & JOHNSON (1955).

Igualmente, es improbable que la influencia de la insulina sobre la incorporación de acetato-1- ^{14}C a grasas y fosfolípidos resulte de un estímulo de su captación. El acetato se incorpora presumiblemente primero a acetil-CoA, que se usa en la síntesis de ácidos grasos de lar-

ga cadena (MANCHESTER, 1963). Similares efectos a los observados por este autor, posee la insulina en la incorporación de acetato a grasa en el nervio ciático (FIELD y ADAMS, 1961).

El incremento en el peso graso del tejido adiposo de ratas tratadas con insulina, se debió al " relleno de lípidos " de los adipocitos vivos, y no al incremento de su celularidad (LEWIS y HAYES, 1978).

De los trabajos realizados in vitro por O'HEA y LEVEILLE (1968) se desprende que las piezas de tejido adiposo de pollo incorporan mayor cantidad de acetato por minuto a ácidos grasos que cuando se parte de glucosa, pero en cantidad insignificante en comparación con el tejido hepático que es extremadamente más activo, concordando con lo ya descrito por GOODRIDGE (1968a) y LEVEILLE (1969).

El acetato es mejor sustrato que la glucosa para la lipogénesis en tejido adiposo, aunque su significación metabólica permanece oscura . Estudiando la lipogénesis hepática y en tejido adiposo en el pavo resultó que la incorporación del acetato a lípidos en ambos tejidos fué más rápida usando el acetato que la glucosa, lo que condujo al establecimiento de que en las aves, el hígado es el principal responsable de la síntesis de ácidos grasos de novo , como mínimo del 70 % (LEVEILLE et al., 1968; BORRON y BRITON, 1977) sugiriendo que la función fundamental del tejido adiposo es la de almacenamiento y liberación de lípidos más que la de síntesis (al contrario del tejido adiposo de mamífero).

Los triglicéridos plasmáticos hallados como β - lipoproteínas de baja densidad, son la principal forma de transporte desde el hígado al tejido adiposo. Las posibles fuentes de FFA plasmáticos marcados, que aparecen poco después de la administración del acetato, no están aún establecidas.

En piezas de tejido adiposo aviar, se encuentra una buena capacidad para convertir la glucosa y el piruvato marcados a glicerol de glicéridos (GOODRIDGE y BALL, 1967c). Las rutas por las que el piruvato y tal vez los metabolitos del ciclo de Krebs son convertidos a glicerol en tejido adiposo de pollo no han sido dilucidadas. Hasta el momento, es razonable suponer que la vía implicada es semejante a la que funciona en el tejido adiposo de rata y de ratón (BALLARD et al., 1967 ; CHAKRABARTY y LEVEILLE, 1968).

Los resultados de BORRON y BRITON (1977) establecieron que el acetato - U - ^{14}C se incorpora más rápidamente que la glucosa marcada a los lípidos. Esta diferencia es debida probablemente a que el sustrato glucosa estaba siendo ciclado a través de la vía glucolítica.

Recientemente se ha comprobado que dosis fisiológicas de insulina estimulan la incorporación de acetato a triglicéridos y su oxidación a CO_2 en presencia de glucosa (VIVES, 1979).

II. RESUMEN Y PLANTEAMIENTOS

En esencia el metabolismo de aves y mamíferos es idéntico. No obstante, existen diferencias cuantitativas importantes en determinadas rutas metabólicas de algunos órganos y tejidos.

Las diferencias más importantes son las que se refieren a su regulación hormonal. Al contrario de lo que ocurre en mamíferos, se sabe muy poco de los efectos reguladores que posee la insulina en aves, por otra parte el papel que juega esta hormona queda en segundo plano con respecto al glucagón.

La concentración de insulina en el plasma de pollo es similar a la humana (30-40 μ U/ml). Las aves son por naturaleza resistentes a esta hormona, dosis tan altas como 5.000 UI/Kg de peso, apenas si producen convulsiones en estos animales y ante la pancreatometomía y administración de β -citotóxicos como la aloxana, no desarrollan diabetes.

Se ha descrito que tanto el hígado, como el músculo esquelético del ave necesita dosis farmacológicas de insulina para que su respuesta sea significativa (ANDERSON y LANGSLOW, 1.975; LANGSLOW, 1.970). Sin embargo dosis fisiológicas de insulina producen hipoglucemia en pollos. Por esta razón han de existir tejidos que respondan a la hormona captando la glucosa plasmática.

En 1.977 GOMEZ-CAPILLA y LANGSLOW describieron por primera vez que los adipocitos aislados de pollo responden a dosis fisiológicas de insulina; siguiendo la línea de investigación del primer autor, se ha descrito la cinética de la incorporación de glucosa a

triglicéridos, CO_2 y glucógeno en adipocitos de pollo (VIVES, 1.979) y la cinética de la incorporación de este azúcar a diversos tejidos in vivo SANCHEZ, 1.979) tanto en condiciones basales, como en presencia de insulina.

El propósito de este trabajo, ha sido estudiar el papel que el acetato tiene en los adipocitos aislados de pollo, así como la influencia que pueden desarrollar sobre él la insulina y la glucosa. De acuerdo con estos razonamientos y después de la revisión de bibliografía efectuada, nos proponemos estudiar:

- 1) El proceso de incorporación de acetato- $\text{U-}^{14}\text{C}$ a triglicéridos en los adipocitos aislados de pollo y su dependencia del tiempo de incubación, así como de la concentración de acetato.
- 2) La oxidación de acetato- $\text{U-}^{14}\text{C}$ a CO_2 en los adipocitos aislados de pollo y su dependencia del tiempo de incubación así como de las concentraciones de acetato.
- 3) Los efectos que la insulina a dosis fisiológicas tiene sobre los dos procesos anteriormente citados.
- 4) El efecto que diversas concentraciones de acetato, producen sobre la oxidación de la glucosa a CO_2 y sobre la incorporación de ésta a triglicéridos.

III. MATERIAL Y METODOS

A.- ANIMALES

Los pollos empleados en las experiencias han sido machos de la raza Leghorn blanca, suministrados por Avi-grana, S.A.; Granada. La edad a la que eran utilizados estaba comprendida entre el día del nacimiento y los 6 días de edad.

Para cada experiencia son usados unos 15 pollos, según la edad. Desde su nacimiento hasta el día de su utilización, los pollos se mantienen en jaulas con 12 horas de fotoperiodo, y una temperatura de 20-25°C. Durante este tiempo tenían libre acceso al agua y pienso para pollos.

B.- COMPUESTOS QUIMICOS Y HORMONAS

Se han empleado los siguientes:

SO_4H_2	Merck	SO_4Na_2	Merck
CLH	Merck	Etanol	Merck
NaOH	Merck	Cloroformo	Merck
CO_3Na	Merck	Metanol	Merck
CLNa	Merck	Tolueno	Merck
CLK	Merck	Cl_4C	Merck
Cl_2Ca	Merck	PO_4H_2K	Merck
		$SO_4Mg \cdot 7H_2O$	Merck

Diclorodimetilsilano Merck

2,2-p-Fenilen-bis-(5 feniloxazol) (POPOP) Merck

2,5-Difeniloxazol (PPO) Merck

Glucosa monohidrato Merck.

D-U-¹⁴C-Glucosa, de una actividad específica de 245 mCi/nmol; 1.30 mCi/mg; 65% de abundancia isotópica en todos los átomos de carbono.

Peso molecular: 188. The Radiochemical Centre. Amersham.

U-¹⁴C acetato de sodio de una actividad específica de 57'6 mCi/mmol peso molecular 86'5.

Hidróxido de metil bencetonio (Hyamina) 1 M en metanol, Sigma.

Alúmina bovina, 100% electroforéticamente pura, Behring.

Colagenasa, tipo GLS, actividad 126 u/mg. Worthington Biochemical Corporation.

Insulina bovina cristalina, Burroughs Wellcome Co., de 23'9 UI/mg.

Las distintas concentraciones empleadas en los experimentos eran preparadas a partir de una disolución madre de 1 mg/ml de solución salina a pH 4.

G.- MEDIO DE INCUBACION

El medio básico de incubación utilizado para los experimentos es el Krebs-Ringer tamponado con bicarbonato (KREBS, 1950). La preparación se realiza con las disoluciones y cantidades siguientes:

En una probeta de 100 ml se gasean 16 ml de CO₂ HNA al

1'3% durante 20 minutos con una mezcla de O₂ al 95% y CO₂ al 5%

Aparte, se mezclan en un matraz Erlenmeyer las siguientes disoluciones:

100 ml de ClNa al 0'9%

4 ml de ClK al 1'15%

3 ml de ClCa al 1'22%

1 ml de PO₄H₂ K al 2'11%

1 ml de SO₄Mg. 7H₂O al 3'52%

A los 16 ml de disolución gaseada se añaden 84 ml de la disolución del matraz. Este nuevo medio es suplementado con albúmina al 2% y se ajusta a pH 7'38 con Na OH.

Posteriormente se añade glucosa al medio de incubación a la concentración requerida, o acetato.

El aislamiento y la incubación se realiza en botes herméticamente cerrados con una atmósfera compuesta por O₂ al 95% y CO₂ al 5%.

D.- METODO DE AISLAMIENTO DE LOS ADIPOCITOS

Se ha seguido el método de ROBBELL (1.964) modificado por VIVES (1.979) incubando los adipocitos de pollo a 40°C.

Se sacrifican unos 15 pollos por dislocación cervical y rápidamente se les extrae el tejido de adiposo subcutáneo abdominal. El tejido adiposo extraído se lava en solución salina (ClNa al 0'9%) a 40°C y se seca sobre un papel de celulosa. Se trocea parcial

mente con una cuchilla y se introduce en un bote de plástico de una capacidad de 50 ml con tapón roscado y cierre hermético, conteniendo previamente 5 ml de KRB con albúmina al 2% y 2 mg/ml de colagenasa, sin glucosa, ni acetato.

Una vez que los botes contienen el tejido adiposo, se cierran en una atmósfera de O_2 al 95% y CO_2 al 5%. Se colocan en un baño termostático con agitación suave (40 oscilaciones por minuto), durante una hora. Pasado este tiempo, se abren los botes y se agitan con una varilla de plástico. Se vierte su contenido en tubos de centrifuga del mismo material completando su volumen con KRB al 2% de albúmina. Se agita suavemente y se vierte su contenido en una jeringa de plástico de 30 ml de capacidad, cuyo fondo ha sido sustituido por una malla de nylon. Se efectúa una presión suave con el émbolo, las piezas de tejido no disgregadas quedan retenidas en la malla. El filtrado así obtenido se centrifuga un minuto a 500 r.p.m. Al final del centrifugado, los adipocitos quedan flotando, mientras que las células conectivas, vasculares y sanguíneas sedimentan. Con una pipeta Pasteur con pera se extrae el sedimento y el KRB, dejando solo los adipocitos. Este lavado seguido de centrifugado se repite tres veces en las mismas condiciones.

Al finalizar estos procesos, las células vasculares y conectivas están ausentes, lo cual puede comprobarse por la claridad del medio y al examen microscópico. La grasa procedente de la ruptura de algunos adipocitos queda en la superficie y es extraída por aspiración.

Las células aisladas por este método se vierten en un vaso de precipitado de plástico de 50 ml de capacidad, conteniendo el medio de incubación y un inán teflonado para su agitación, pues los adipocitos tienden a flotar y esto dificultaría su recogida homogénea. Este medio de incubación está compuesto por KRB con albúmina al 2% al que se le ha añadido glucosa (a concentraciones variables según la experiencia) y glucosa U-¹⁴C, para que tenga una actividad específica de 0'4 µCi/ml; acetato sódico (a concentraciones variables según la experiencia) y acetato U-¹⁴C con una actividad de 0'4 µCi/ml. Se agitan las células y rápidamente se reparten con una pipeta automática de plástico de 1 ml en los botes donde serán incubadas.

Es importante que durante todo el proceso las células no toquen el vidrio, siempre deberán estar contenidas en recipientes de plástico o vidrio silanizado, ya que de lo contrario la membrana celular se daña, haciéndolo igualmente los receptores.

E .- METODO PARA LA DETERMINACION DE LA OXIDACION DE GLUCOSA y/o ACETATO

Se preparan frascos especiales de vidrio, silanizados, con una capacidad de 20 ml. En el fondo llevan soldado un pocillo central de un ml de capacidad. Van cerrados herméticamente con un tapón de goma. Para silanizarlos se prepara una disolución de dicloro dimetilsilano en tetracloruro de carbono al 2%. Con esta disolución se llenan los botes de vidrio y se dejan diez minutos. Se vacían y se enjuagan con agua destilada; poniéndolos en una estufa posteriormente (100°C) y se esperan que queden secos. Los botes se enumeran y

se les añaden insulina a la concentración deseada.

En los casos de experimentos con acetato variable, se coloca en cada serie de muestras la concentración requerida. A continuación se le añade, 1 ml de la solución de adipocitos aislados. El medio de incubación además del KRB al 2% de albúmina contiene acetato- $U-^{14}C$ con una actividad de $0.4 \mu Ci/ml$ y acetato frío a una concentración variable según se especifica en cada experimento; glucosa - 11 mM y glucosa $U-^{14}C$ con actividad idéntica al acetato.

Los frascos son gaseados con O_2 al 95% y CO_2 al 5%; se tapan y se incuban en un baño con agitación (40 oscilaciones por minuto). El tiempo de incubación depende de la experiencia. Ha estado comprendido entre los 60 y los 180 minutos, según se detalla en cada experimento.

Para la determinación del CO_2 producido por las células se sigue el método de GOODRIDGE (1.968). Una vez finalizado el tiempo previsto para la incubación, se inyecta (a través del tapón de goma) $0.4 ml$ de Hyamina en el pocillo central -para que absorba el CO_2 - y sobre la suspensión de células se añade $0.5 ml$ de SO_4H_2 6 N, para finalizar las reacciones metabólicas y convertir el CO_3H^- de la fase acuosa en CO_2 gaseoso. Dos horas después se abren los frascos y se extrae la hyamina, introduciéndola directamente en los botes de contador. Se le agrega 15 ml de tolueno: etanol (4:1 V/V), conteniendo PPO al 0.4% y POPOP al 0.01% como líquido de centelleo.

Todas las muestras son contadas en un contador de centelleo líquido LKB Wallac 1210 - 8100. Las correcciones para la eficiencia y extinción son determinadas por estandarización interna y externa.

F. METODO PARA LA DETERMINACION DE TRIGLICERIDOS

La incubación es llevada a cabo en tubos cilíndricos de plástico de 30 ml de capacidad con cierre hermético. Antes de añadirles la suspensión de células, se introduce en el fondo la cantidad requerida de insulina. Los botes se tienen preparados y numerados y cuando los adipocitos han sido aislados se añade un mililitro de la suspensión. Se gasea con O₂ al 95 % y CO₂ al 5 % y se cierran. Se incuban en un baño con agitación suave a 40° C durante el tiempo previsto para cada experiencia (60-180 minutos). Después se procede a la extracción de los lípidos siguiendo el método de FOLCH et al., (1957) modificado por GOMEZ-CAPILLA et al., (1975) para eliminar el material radiactivo no lipídico. A los botes se les agrega 5 ml de cloroformo-metanol-clorhídrico (200 : 100 : 1 v/v), con un dispensador automático. Se agitan los frascos y se vierten en un tubo de centrifuga de boca esmerilada de 15 ml. Se adicionan 5 ml de ClH 0'1 N y se agita vigorosamente el tubo durante 1 minuto. Se centrifugan a 1000 r.p.m. durante 10 minutos.

Terminada la centrifugación aparecen tres fases :
una superior acuosa con el material hidrosoluble; una intermedia que contiene las proteínas precipitadas, y otra inferior que está constituida

por el solvente orgánico (cloroformo) y material soluble en él.

Con una pipeta Pasteur conectada a una bomba de agua es aspirada la fase acuosa. Los tubos son inclinados cuidadosamente, y la fase inferior se decanta en otro tubo. Se repite la extracción para recuperar los restos de lípidos del tubo y del paquete proteico.

El solvente orgánico (cloroformo) se evapora al vacío en un Evapo-Mix (Buchler Instruments), quedando un residuo graso. A él se le añade 0'8 ml de tolueno, se agita en un agitador mecánico (Bortimixer) y con una pipeta automática se traspasa su contenido a tubos de contador. Se les añade 10 ml de líquido de centelleo (tolueno con el 0'5% de PPO y 0'01% de POPOP), contandose las muestras de la misma manera que la descrita para el CO_2 .

G.- MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos se someten a test estadístico:

Se comparan las medias de los controles respecto a la de los tratados con insulina con un test t de STUDENT.

G-1.- CÁLCULO DE LA MEDIA Y DEL ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA.

Sea x_1, x_2, \dots, x_n una muestra de una población; se define media muestral, que notaremos por \bar{x} , como el coeficiente:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

La varianza muestral se define mediante la expresión

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

La desviación típica, que es la raíz cuadrada de la varianza:

$$s = \sqrt{\frac{\sum x_i - n\bar{x}^2}{n-1}}$$

El error estándar de la media (S.E.M.):

$$S.E.M. = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

G-2.- TEST DE COMPARACION DE VARIANZAS

Sea una variable aleatoria x cuyos valores se estudian en 2 poblaciones distintas, de las cuales obtenemos 2 muestras (una de cada población) de tamaños n_1 y n_2 . Si en cada muestra hemos calculado la media \bar{x} y la varianza estimada s^2 de la variable x por el método descrito anteriormente, tendremos dos varianzas estimadas s_1^2 y s_2^2 , en donde s_i^2 es la estimación de la varianza σ_i^2 de la-

variable x en la población i . Se trata aquí de contrastar la hipótesis de que todas las s_i^2 estiman una misma varianza; es decir, - contrastar

$$H_2 = \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

Contra la alternativa de que esta igualdad no sea cierta.

Como se comparan 2 poblaciones -la varianza de cada una - el test es sencillo, y basta con calcular

$$F_{\text{exp}} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (s_1^2 \geq s_2^2)$$

En el numerador debe ir la varianza mayor. La cantidad resultante se compara con la F teórica, la cual se obtiene de las tablas F de SNEDECOR con (n_1-1) y (n_2-1) grados de libertad al nivel α de error deseado. El test consiste en:

$$\text{Si } F_{\text{exp}} \leq F_{\alpha} (n_1-1, n_2-1) \Rightarrow \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

Es decir, las dos varianzas son iguales.

$$\text{Si } F_{\text{exp}} > F_{\alpha} (n_1-1, n_2-1) \Rightarrow \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

o sea, las varianzas son distintas con un error de $\alpha \cdot 100\%$

G -3.- COMPARACION DE DOS MEDIAS

Sea una variable aleatoria normal que estudiamos en dos

poblaciones distintas, de medias μ_1 y μ_2 y de varianzas σ_1^2 y σ_2^2 . Para contrastar la hipótesis:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

contra la alternativa:

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

se toma una muestra de cada población y se calculan sus medias \bar{x}_1 , \bar{x}_2 y sus varianzas s_1^2 , s_2^2 estimadas.

El procedimiento varía según las varianzas sean iguales o distintas, de modo que un paso previo es realizar el test anteriormente descrito. Si las varianzas son iguales se calcula:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

en donde n_1 , n_2 son los tamaños muestrales y

$$s^2 = \frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

La t_{exp} anterior es comparada entonces con la t_{α} teórica buscada en la tabla de la t de STUDENT con (n_1+n_2-2) grados de libertad para el error α que se desee.

Cuando las varianzas son distintas, se calcula entonces:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

cantidad que se compara con la

$$t'_{\alpha} = \frac{\frac{s_1^2}{n_1} t_{1,\alpha} + \frac{s_2^2}{n_2} t_{2,\alpha}}{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}$$

En donde $t_{1,\alpha}$ (δ $t_{2,\alpha}$) se buscan en la misma tabla de -
STUDENT anterior con (n_1-1) o con (n_2-1) grados de libertad al error
 α deseado.

En ambos casos la decisión es:

Si $t_{\text{exp}} \leq t'_{\alpha}$ ambas medias son iguales ($\mu_1 = \mu_2$)

Si $t_{\text{exp}} > t'_{\alpha}$ $\mu_1 \neq \mu_2$

y las medias son distintas con un error .

IV. RESULTADOS

T A B L A 1

Incorporación de acetato U-¹⁴C a triglicéridos en adipocitos aislados de pollo, con distintas concentraciones de acetato frío en el medio de incubación.

CONCENTRACION DE ACETATO (mM)	nmoles acetato/g peso seco celulas		
1	80,07 ±	15,90	
5	333,77 ±	49,68	***
10	893,95 ±	134,30	***
20	2.304,15 ±	298,76	***
40	3.825,21 ±	495,30	***
80	7.250,25 ±	1.011,50	***

Medio de incubación: K R B con 2% de albúmina, acetato a la concentración indicada en la tabla y 0,4 μ Ci/ml de acetato marcado. Tiempo de incubación: 180 minutos. Cada valor representa la media de 4 observaciones \pm el error estandar de la media.

***: p < 0'001

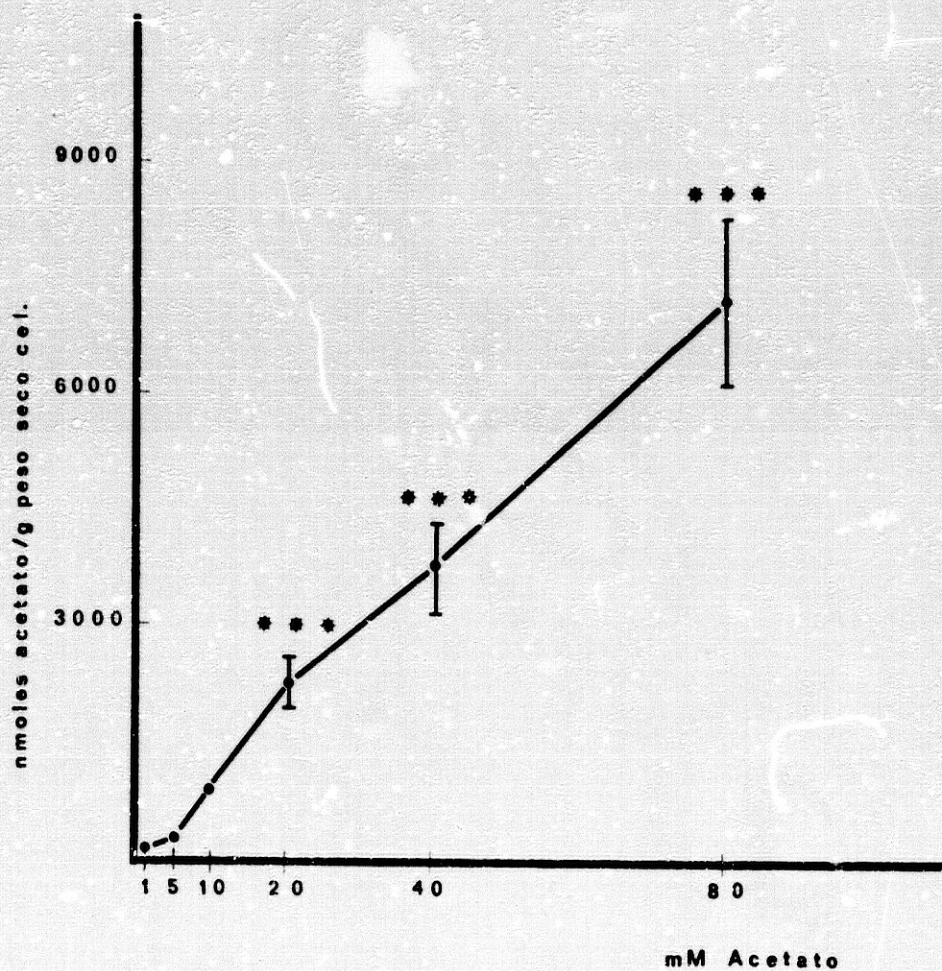


FIGURA 1.- Incorporación de Acetato U-¹⁴C a triglicéridos en adipocitos aislados de pollo, con distintas concentraciones de acetato frío en el medio de incubación. Representación gráfica de los datos recogidos en la Tabla 1.

***: $p < 0,001$.

T A B L A 2

Incorporación de acetato U- ^{14}C a triglicéridos en adipocitos aislados de pollo, con distintas concentraciones de acetato en el medio de incubación.

CONCENTRACION DE ACETATO (mM)	nmoles acetato/g peso seco células	
	CONTROLES	INSULINA (100ng/ml)
1	50,84 ± 3,83	51,04 ± 2,35 ns
5	170,06 ± 6,95	167,20 ± 6,32 ns
10	367,24 ± 17,43	374,14 ± 13,27 ns

Medio de incubación: KRB con 2% de albúmina, acetato a la concentración indicada en la tabla y 0,4 $\mu\text{Ci/ml}$ de acetato marcado. Tiempo de incubación: 180 minutos. Cada valor representa la media de 4 observaciones \pm el error estándar de la media.

ns: diferencias no significativas.

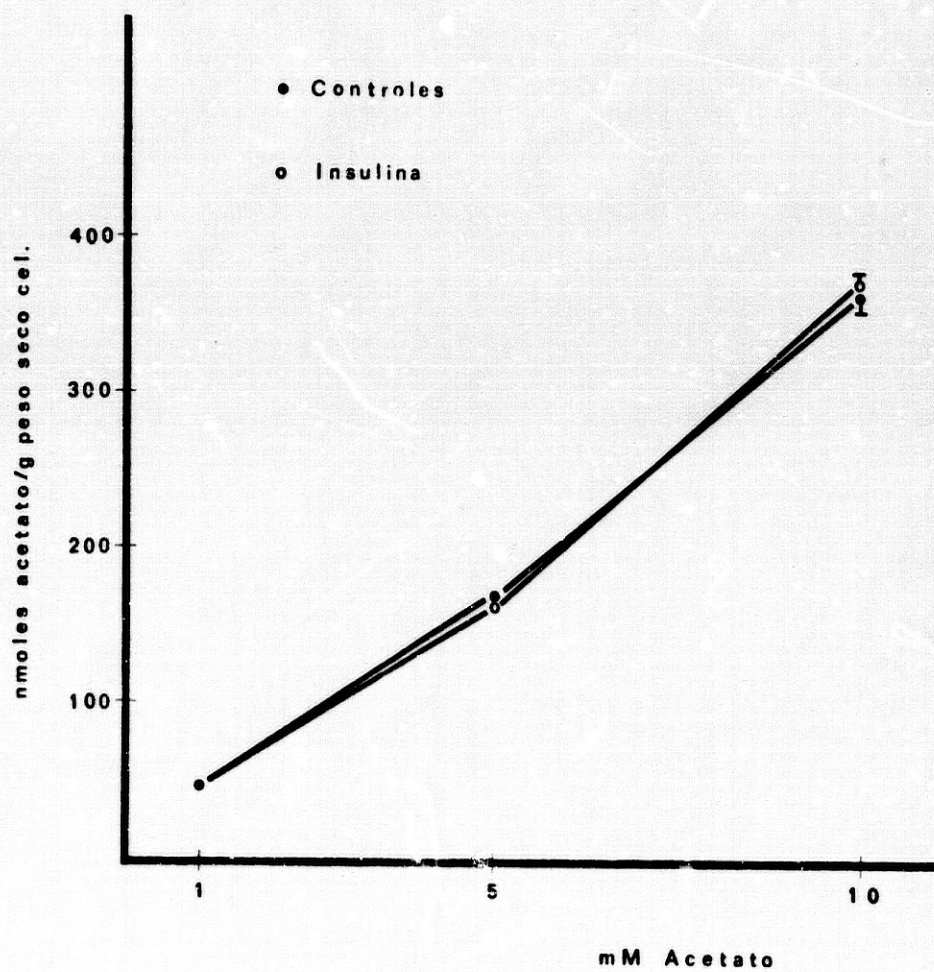


FIGURA 2.- Incorporación de Acetato U-¹⁴C a triglicéridos en adipocitos aislados de pollo, con distintas concentraciones de acetato en el medio de incubación. Representación gráfica de los datos recogidos en la Tabla 2.

T A B L A 3

Incorporación de acetato U-¹⁴C a triglicéridos en adipocitos aislados de pollo, en presencia de concentraciones crecientes de insulina.

CONCENTRACION DE INSULINA (ng/ml)	nmoles acetato/g peso seco células
0	91,54 ± 5,03
10	83,97 ± 3,77 ns
100	35,75 ± 3,67 ns
1.000	119,97 ± 12,83 *

Medio de incubación: KRB con 2% de albúmina, acetato 1 mM y 0,4 μ Ci/ml de acetato marcado. Tiempo de incubación: 180 minutos. Cada valor representa la media de 4 observaciones \pm el error estándar de la media.

ns: diferencias no significativas

* : $P < 0,05$

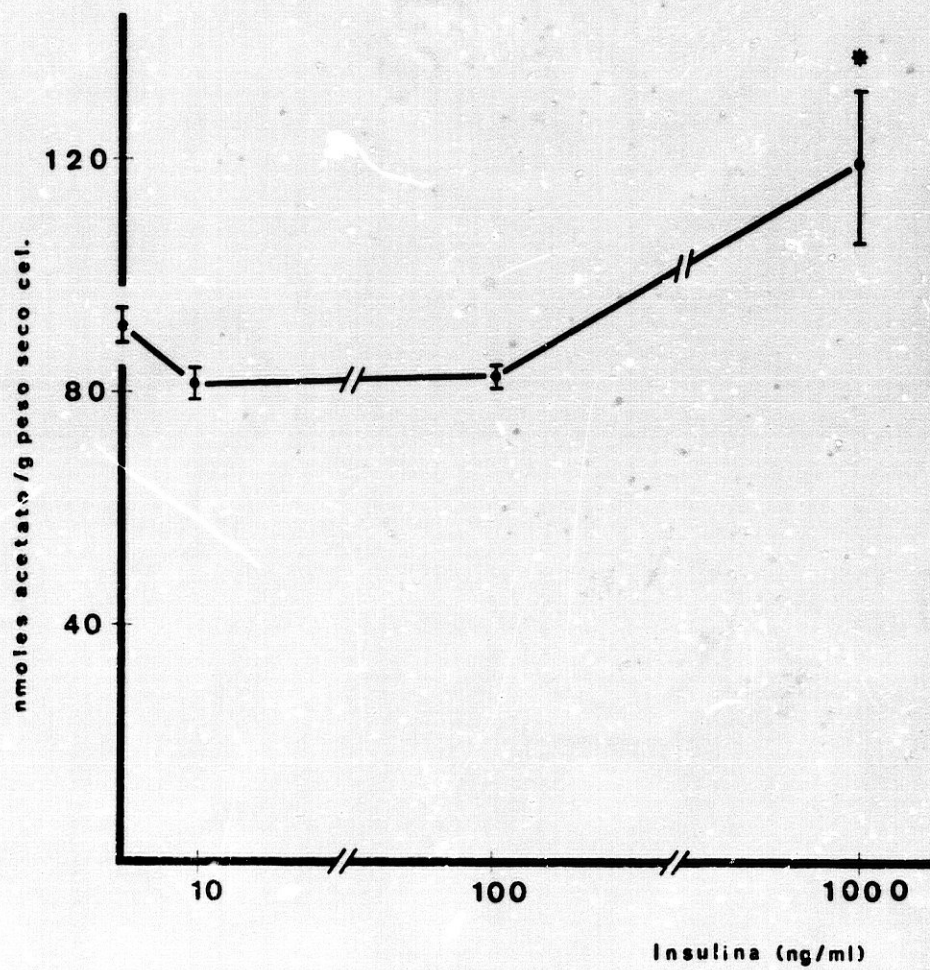


FIGURA 3.- Incorporación de Acetato U-¹⁴C a triglicéridos, en adipocitos aislados de pollo, en presencia de concentraciones crecientes de insulina. Representación gráfica de los datos recogidos en la Tabla 3.

* :p 0,05

T A B L A 4

Incorporación de acetato U-¹⁴C a triglicéridos en adipocitos aislados de pollo, durante distintos tiempos de incubación.

TIEMPO (minutos)	nmoles acetato/g peso seco células	
	CONTROLES	INSULINA (100 ng/ml)
60	75,43 ± 3,86	81,95 ± 5,62 ns.
120	113,40 ± 11,05	125,62 ± 13,33 ns.
180	110,80 ± 12,18	128,47 ± 4,23 ns.

Medio de incubación: KRB con 2% de albúmina, acetato 1 mM y 0,4 μ Ci/ml de acetato marcado. Cada valor representa la media de cuatro observaciones \pm el error estándar de la media.

ns: diferencias no significativas.

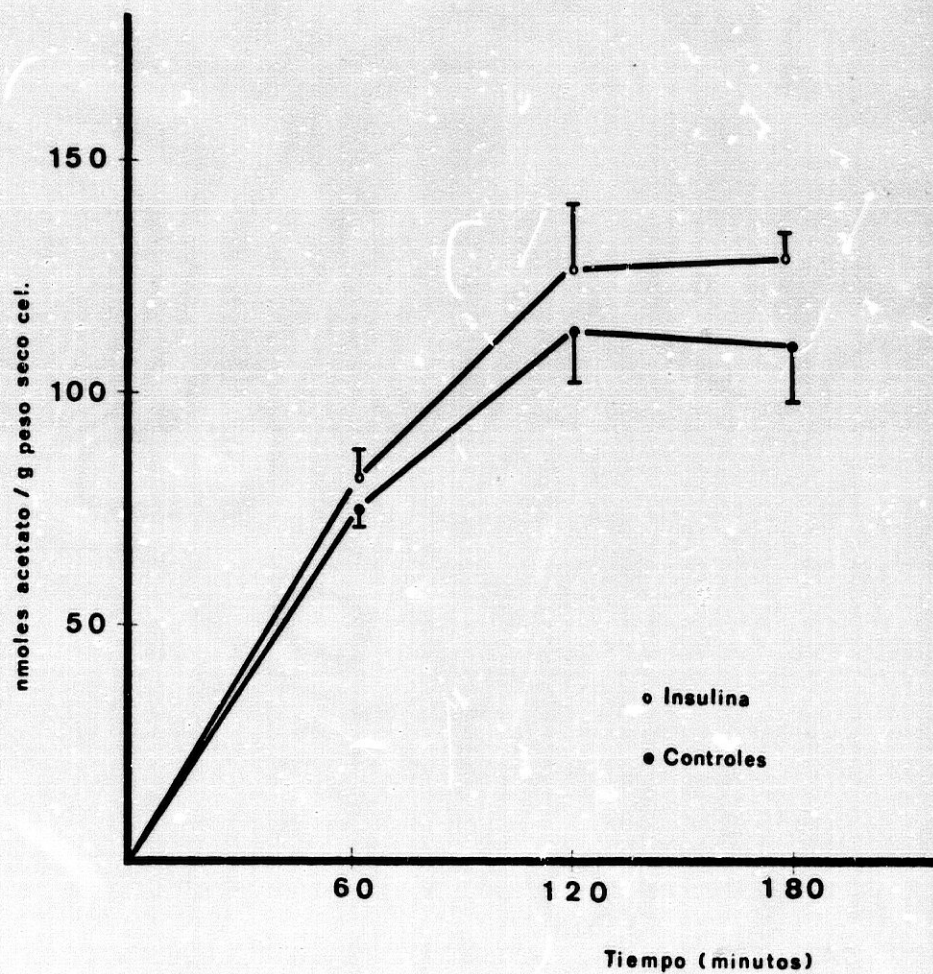


FIGURA 4.- Incorporación de Acetato $\text{U-}^{14}\text{C}$ a trigléricidos en adipocitos aislados de pollo, durante distintos tiempos de incubación. Representación gráfica de los datos recogidos en la Tabla 4.

T A B L A 5

Incorporación de glucosa U- ^{14}C a triglicéridos, en adipocitos aislados de pollo, en presencia de concentraciones variables de acetato.

CONCENTRACION DE ACETATO (mM)	nmoles de glucosa/g peso seco células		
0	234,30	± 11,30	
5	293,30	± 14,90	*
40	348,30	± 58,15	ns

Medio de incubación: K R B con 2% de albúmina, glucosa 11mM y 0,4 $\mu\text{Ci/ml}$ de glucosa marcada, acetato a la concentración indicada en la - tabla. Tiempo de incubación 180 minutos. Cada valor representa la media de cuatro observaciones \pm el error estándar de la media.

ns: diferencias no significativas

*: $p < 0,05$

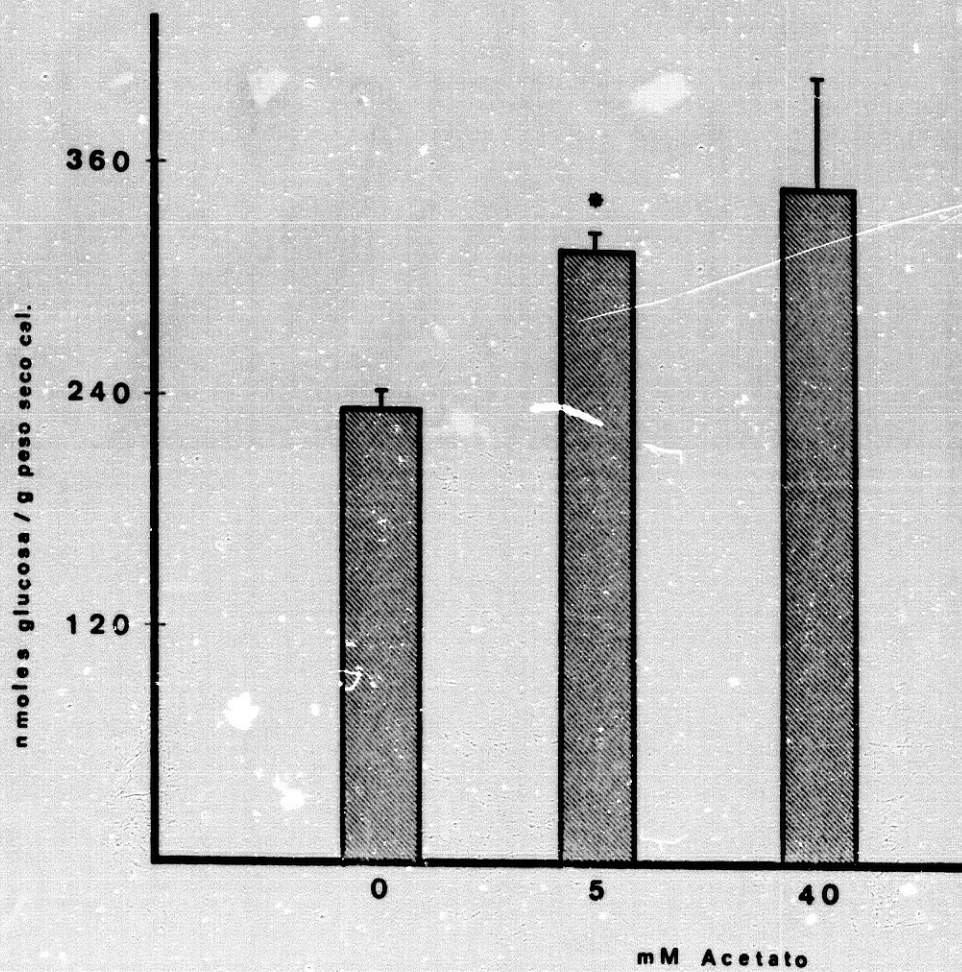


FIGURA 5.-Incorporación de Glucosa U-¹⁴C a triglicéridos, en adipocitos aislados de pollo en presencia de concentraciones variables de acetato en el medio de incubación. Representación gráfica de los datos recogidos en la Tabla 5.

* : $p < 0,05$

T A B L A 6

Oxidación de acetato U-¹⁴C a CO₂ en adipocitos aislados de pollo -
con distintas concentraciones de acetato frío en el medio de incuba -
ción.

CONCENTRACION DE ACETATO (mM)	nmoles acetato/g peso seco células		
1	1924,73 ±	49,55	
5	5815,52 ±	320,38	***
10	9554,97 ±	847,46	***
20	18680,59 ±	1149,86	***
40	40866,58 ±	1138,90	***
80	75738,37 ±	1873,17	***

Medio de incubación: K R B con 2% de albúmina, acetato a la concentración indicada en la tabla y 0,4 μ Ci/ml de acetato marcado. Tiempo de incubación 180 minutos. Cada valor representa la media de 4 observaciones \pm el error estándar de la media.

***:p < 0'001

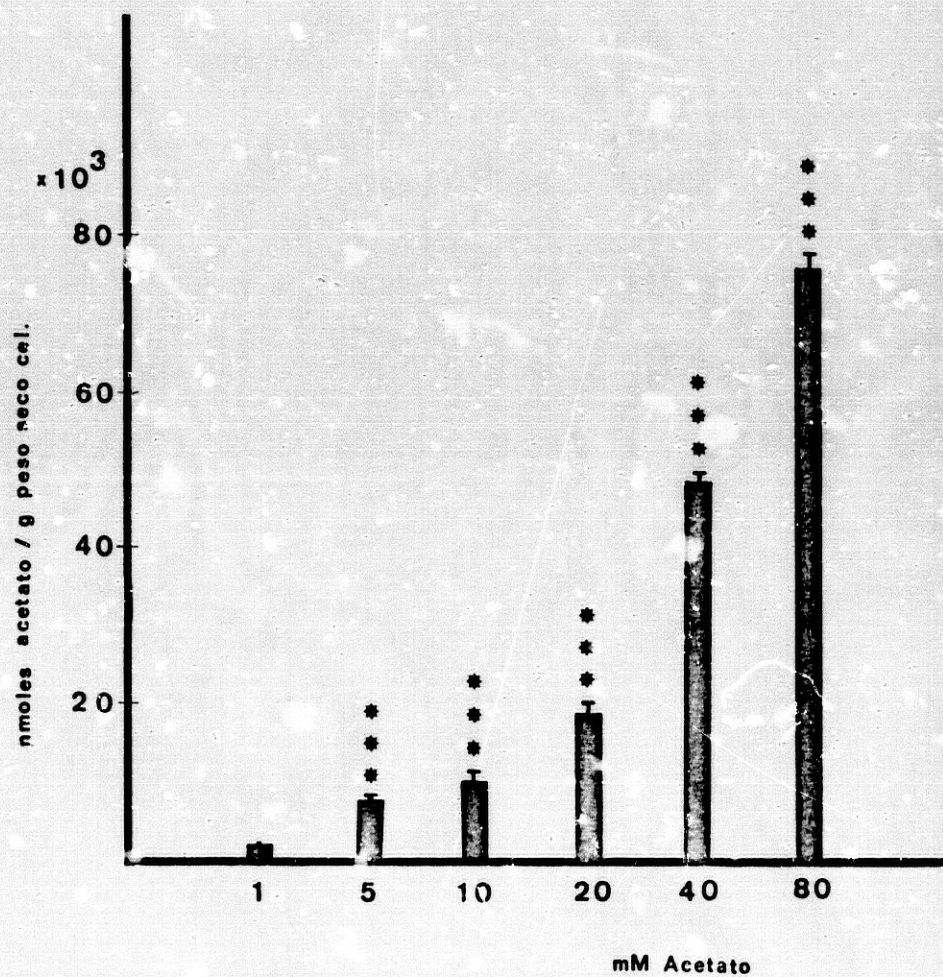


FIGURA 6. Oxidación de Acetato U-¹⁴C a CO₂, en adipocitos aislados de pollo, con distintas concentraciones de acetato frío en el medio de incubación. Representación gráfica de los datos obtenidos en la Tabla 6.

***: p < 0,001.

T A B L A 7

Oxidación de acetato U- ^{14}C a CO_2 en adipocitos aislados de pollo con distintos concentraciones de acetato frío en el medio de incubación.

CONCENTRACION DE ACETATO (mM)	nmoles acetato/g peso seco células	
	CONTROLES	INSULINA (100 ng/ml)
1	3.056,35 ± 367,15	3.227,00 ± 268,90 ns
5	6.120,02 ± 1.078,20	5.771,80 ± 310,15 ns
10	8.341,66 ± 179,45	8.971,90 ± 597,65 ns

Medio de incubación: KRB con 2% de albúmina acetato a la concentración indicada en la tabla y 0,4 uCi/ml de acetato marcado.

Tiempo de incubación 180 minutos. Cada valor representa la media de 4 observaciones ± el error estándar de la media.

ns: diferencias no significativas.

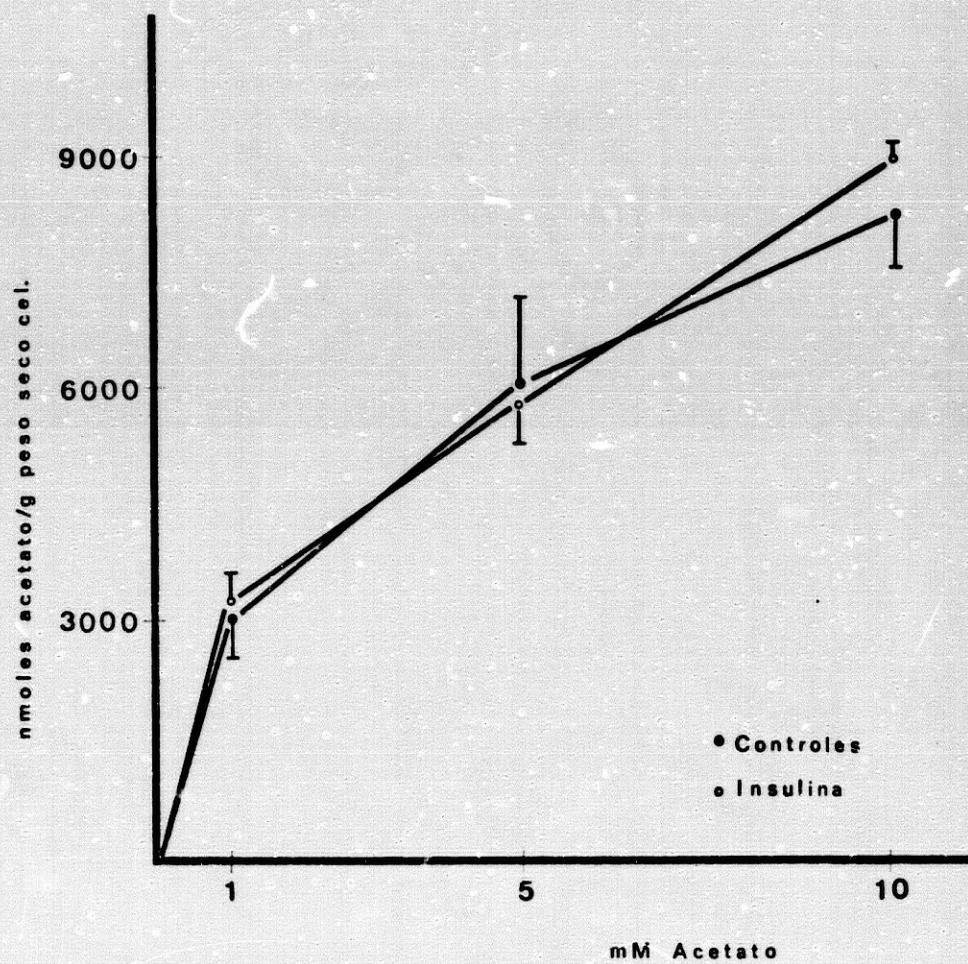


FIGURA 7.- Oxidación de Acetato U-¹⁴C a CO₂ en adipocitos aislados de pollo, con distintas concentraciones de acetato frío, en el medio de incubación. Representación gráfica de los datos recogidos en la Tabla 7.

T A B L A 8

Oxidación de acetato U-¹⁴C a CO₂ en adipocitos aislados de pollo -
en presencia de concentraciones crecientes de insulina.

CONCENTRACION DE INSULINA (ng/ml)	nmoles acetato/g peso seco células
0	1732,60 ± 93,41
10	2036,00 ± 149,10 ns
100	1640,00 ± 98,80 ns
1000	2216,00 ± 126,85 *

Medio de incubación: K R B con 2% de albúmina, acetato 1 mM y 0,4 -
μCi/ml de acetato. Tiempo de incubación: 180 minutos. Cada valor repre -
senta la media de 4 observaciones ± el error estándar de la media.

ns: diferencia no significativa.

* : p < 0'05

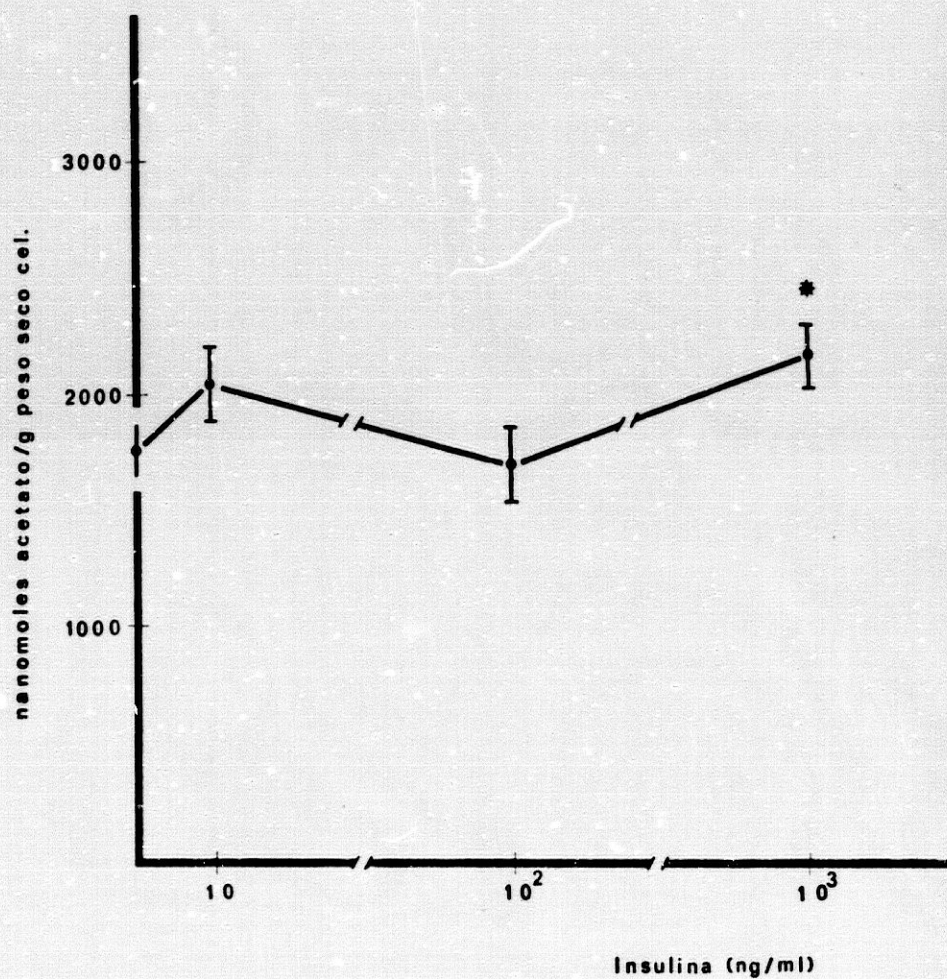


FIGURA 8.- Oxidación de Acetato U-¹⁴C a CO₂ en adipocitos aislados de pollo, en presencia de concentraciones crecientes de insulina. Representación gráfica de los datos recogidos en la Tabla 8.

* : p < 0,05

T A B L A 9

Oxidación de acetato U- ^{14}C a CO_2 en adipocitos aislados de pollo, -
durante distintos tiempos de incubación.

TIEMPO (minutos)	nmoles acetato/g peso seco células	
	CONTROLES	INSULINA (100 ng/ml)
60	1003,11 \pm 38,68	1007,00 \pm 59,33 ns
120	1470,02 \pm 75,26	1527,07 \pm 34,23 ns
180	1920,25 \pm 98,41	2729,32 \pm 86,48 ***

Medio de incubación: K R B con 2% de albúmina, acetato 1mM y 0,4 $\mu\text{Ci/ml}$ de acetato marcado. Cada valor representa la media de cuatro ob-
servaciones \pm el error estándar de la media.

ns: diferencias no significativas.

***: $P < 0,001$

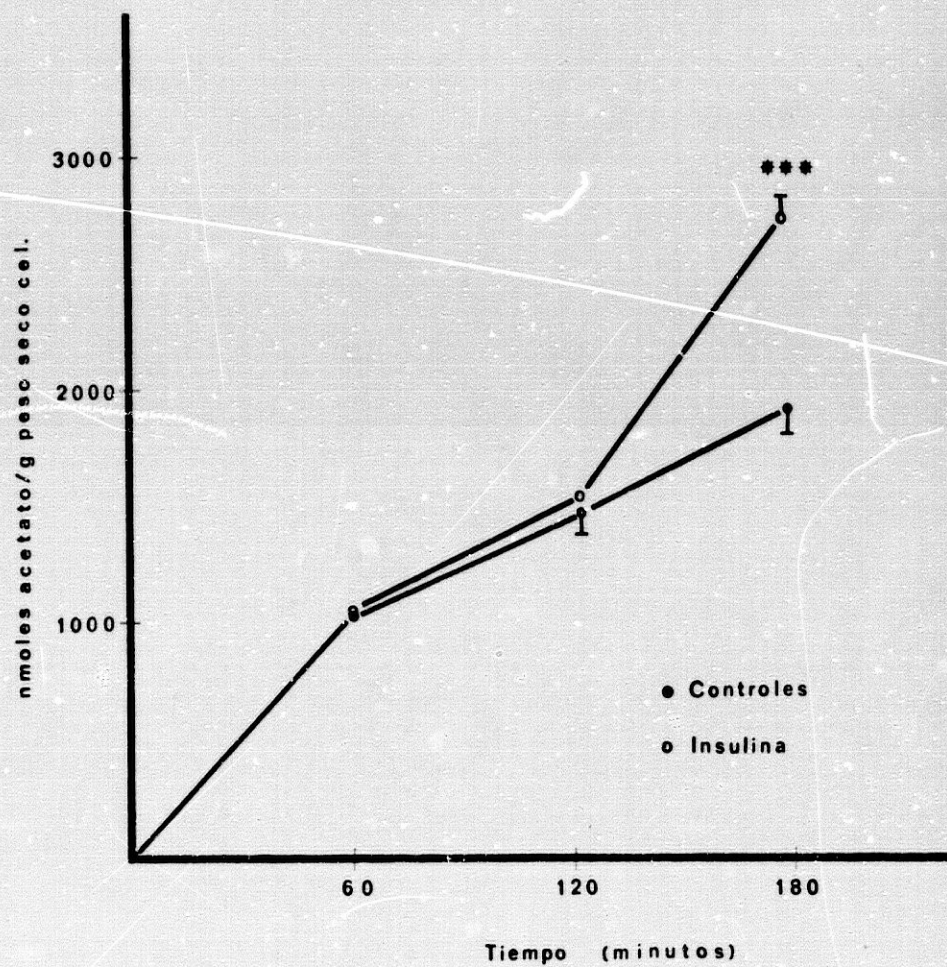


FIGURA 9.- Oxidación de Acetato U-¹⁴C a CO₂ en adipocitos aislados de pollo, durante distintos tiempos de incubación. Representación gráfica de datos recogidos en la Tabla 9.

*** :p < 0,001

T A B L A 10

Oxidación de glucosa U-¹⁴C a CO₂ en adipocitos aislados de pollo, -
 en presencia de concentraciones variables de acetato.

CONCENTRACION DE ACETATO (mM)	nmoles de glucosa/g peso seco células	
0	1257 ± 80,00	
5	829 ± 22,50	* *
40	886 ± 33,50	* *

Medio de incubación: K R B con 2% de albúmina, glucosa 11 mM y 0,4 -
 µCi/ml de glucosa marcada, acetato a la concentración indicada en la ta -
 bla. Tiempo de incubación 180 minutos. Cada valor representa la media de 4
 observaciones ± el error estándar de la media.

* *: p < 0'01

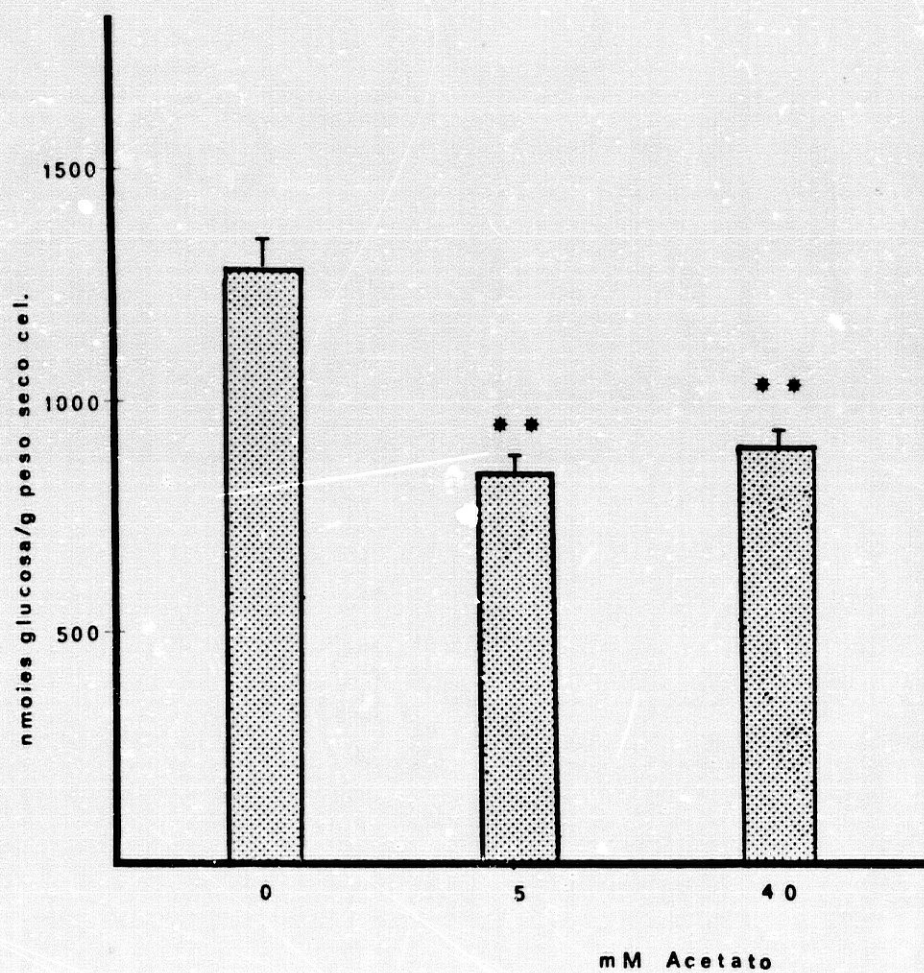


FIGURA 10.- Oxidación de glucosa U-¹⁴C a CO₂ en adipocitos aislados de pollo en presencia de concentraciones variables de acetato. Representación gráfica de los datos recogidos en la Tabla 10.

** : $p < 0,01$.

V. D I S C U S I O N

El metabolismo de los hidratos de carbono en las aves difiere en ciertos aspectos del de los mamíferos (GOLDEN y LONG, 1.942)

En los mamíferos, la insulina es la principal hormona que interviene en la regulación del metabolismo en los glúcidos; sin embargo en las aves, el papel que juega la insulina a este respecto esta aún sin dilucidar en muchos aspectos.

Desde el año 1.893 en que MINKOWSKI demostró que patos y gansos pancreatetectomizados no desarrollaban diabetes mellitus, estableciendo las diferencias existentes entre aves y mamíferos. Aunque la insulina de pollo existe en el plasma a una concentración de 30-40 $\mu\text{U/ml}$, la función reguladora de esta hormona no es bien conocida y parece ser que posee una escasa importancia en la regulación del metabolismo de los hidratos de carbono en las aves.

Las aves presentan una serie de peculiaridades en relación con la insulina, que las diferencia del mamífero; así por ejemplo son resistentes a la administración de grandes dosis de insulina (HAZELWOOD, 1.967), la liberación de insulina por el páncreas aviar necesita grandes fluctuaciones de glucosa para sufrir mínimas modificaciones (NABER y HAZELWOOD, 1.977). La concentración de glucosa plasmática parece que no depende de la insulina, sino más bien del glucagón (GRANDE, 1.969). Las aves son resistentes a las técnicas diabetógenas tanto quirúrgicas como iatrógenas (LANGSLOW et al., 1.970; LANGSLOW y FREEMAN, 1.972).

No obstante se conoce que la administración de dosis bajas

de insulina tales como 0'02 UI/Kg de peso, en pollos producen hipoglucemia, aumento de los FFA y descenso del nitrógeno de aminoácidos plasmáticos (HEALD, et al., 1.965; LANGSLOW, 1.970).

Así pues algún tejido o tejidos deben captar e utilizar glucosa por acción de la insulina, siendo de esta manera responsables de la hipoglucemia producida por esta hormona. Aunque cuando se examinan tejidos tales como hígado, músculo y tejido adiposo se necesitan grandes concentraciones de insulina para que sus efectos sean perceptibles. (ANDERSON y LANGSLOW, 1.975; LANGSLOW, 1.970).

En 1.964 ROBBELL describe un método para el aislamiento de adipocitos demostrándose que las células aisladas son más sensibles a la acción hormonal que las piezas de tejido y cinco años más tarde LANGSLOW y HALFS (1.969) observaron igualmente, que los adipocitos aislados del tejido adiposo aviar constituyen un sistema mucho más sensible a la acción de las hormonas.

Así usando este sistema pudo establecerse por primera vez (GOMEZ-CAPILLA y LANGSLOW, 1.977) que la insulina a dosis fisiológicas produce un claro efecto sobre la captación de glucosa, síntesis de triglicéridos y producción de CO_2 a partir de glucosa en el tejido adiposo aviar.

Tales resultados se han confirmado recientemente; estableciéndose además que la producción de CO_2 a partir de glucosa es una vía cuantitativamente más importante que la síntesis de triglicéridos a partir de este azúcar en el tejido adiposo (VIVES, 1.979).

Sin embargo la cuantía del efecto de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa en el T.A. de pollo no justifica por si sola la hipoglucemia producida por la insulina en las aves; así pues otros tejidos distintos del adiposo deben de contribuir a la captación y posterior utilización de la glucosa.

Hoy se conoce que tanto el hígado, corazón, músculo esquelético y músculo cardíaco son tejidos sensibles a la acción de la insulina y por tanto responsables junto al tejido adiposo de la hipoglucemia producida por esta hormona (SANCHO, 1.979).

Sin embargo muy poco se conocía del metabolismo del acetato y de los posibles efectos que la insulina pudiese ejercer sobre él. Nuestras experiencias recogen algunos resultados sobre el metabolismo del acetato y la acción de la insulina.

En la tabla 1 se recopilan los resultados de la síntesis de triglicéridos a partir de acetato- $U-^{14}C$ a concentraciones crecientes (1,5,10,20,40,80 mM) de éste en el medio de incubación, observándose que existe un aumento en la síntesis de triglicéridos proporcionado a la concentración de acetato. El aumento de la concentración de acetato desde 1 hasta 5 mM produce ya un incremento significativo de la lipogénesis de un 317% siendo este incremento de un 8.900% para concentraciones de acetato 80 mM.

Como puede observarse en esta tabla existe una dependencia entre la incorporación de acetato a triglicéridos y la concentración de acetato presente en el medio de incubación. Para el ran-

go de concentraciones estudiadas por nosotros, la incorporación de acetato a triglicéridos, es un proceso no saturable con la concentración de éste.

Este resultado contrasta marcadamente con la lipogénesis producida a partir de glucosa como precursor, en la que este proceso si es saturable con la concentración de glucosa, produciéndose la máxima lipogénesis a concentraciones de 9mM; para concentraciones superiores de este azúcar no se produce aumento paralelo en la síntesis de triglicéridos (VIVES, 1.979).

Cuando se estudia el efecto de la insulina sobre la incorporación de acetato- U-¹⁴C a triligéridos se observa, que dosis de insulina de 100 ng/ml no producen aumentos significativos en la síntesis de triglicéridos, a ninguna de las concentraciones de acetato estudiadas (Tabla 2).

La relación dosis de insulina/síntesis de triglicéridos, a partir de acetato- U-¹⁴C se recoge en la tabla 3 donde se observa que solo se producen incrementos significativos de la lipogénesis, cuando se usan dosis de insulina de 10^3 ng/ml, siendo éste incremento del orden del 31% respecto de los controles.

Para conocer la influencia que el tiempo de incubación tiene sobre la lipogénesis a partir de acetato, se realizaron experimentos cuyos resultados se reflejan en la tabla 4, donde se observa que la síntesis de triglicéridos a partir de acetato- U-¹⁴C es un proceso dependiente y saturable con el tiempo de incubación.

La máxima incorporación se produce a los 120 minutos, manteniéndose invariable hasta 180 minutos.

La insulina a dosis de 100 ng/ml no produce ningún incremento en la síntesis de triglicéridos tanto a los 60 como a 120 y 180 minutos de incubación.

Similares experimentos se han realizado con la vía metabólica que conduce al acetato hasta CO_2 y cuyos resultados corresponden a las tablas 6,7,8,9.

En la tabla 6 se recogen los resultados sobre la oxidación del acetato- $\text{U-}^{14}\text{C}$ hasta CO_2 , en función de la concentración de este sustrato en el medio de incubación, donde de igual manera que ocurría con la síntesis de triglicéridos se observa que la producción de CO_2 es un proceso dependiente de la concentración de acetato, siendo el CO_2 producido a concentraciones de acetato de 80 mM un 3.836% mayor, que el producido a concentraciones de 1 mM. De igual manera a lo que ocurría con la síntesis de triglicéridos la oxidación de acetato es un proceso no saturable por la concentración del mismo.

Cuando se añade insulina (100 ng/ml) al medio de incubación la producción de CO_2 a partir del acetato no se modifica, tanto para concentraciones de acetato 1 mM como para concentraciones de 5 y 10. Los resultados pueden verse en Tabla 7.

La presencia en el medio de incubación de concentraciones crecientes de insulina, desde 0 hasta 10^3 ng/ml (tabla 8) revela al igual que ocurría con la síntesis de triglicéridos, que la mayor dosis de insulina utilizada, esto es, la de 10^3 ng/ml, produce un aumento significativo de la incorporación al CO_2 del acetato- $\text{U-}^{14}\text{C}$; tomando este incremento un valor aproximado de un 28% respecto de los controles.

A diferencia de lo que ocurría con la síntesis de triglicéridos, la oxidación del acetato- $\text{U-}^{14}\text{C}$ es un proceso dependiente, pero no saturable con el tiempo de incubación; estos datos están de acuerdo con lo observado en hígado de pollo por LEVEILLE (1968). (Tabla 9).

Finalmente en las tablas 5 y 10 tenemos los resultados sobre el estudio de la influencia que el acetato tiene sobre el metabolismo de la glucosa, en los adipocitos aislados de pollo y donde claramente se obtuvo, que la presencia de acetato en el medio de incubación produjo una síntesis de triglicéridos a partir de glucosa- $\text{U-}^{14}\text{C}$ concomitante con un descenso igualmente significativo de la producción de CO_2 a partir de la glucosa- $\text{U-}^{14}\text{C}$.

Nuestros resultados están de acuerdo con previas observaciones hechas por O'HEA y LEVEILLE (1968) y LEVEILLE (1969) manifestando claramente que de las rutas metabólicas estudiadas, la de mayor importancia cuantitativa, es la que conduce el acetato a CO_2 . Similares observaciones se han obtenido al estudiar el metabolismo

de la glucosa en tejido adiposo (GOMEZ-CAPILLA y LANGSLOW, 1.977; VIVES, 1.979). (SANCHO, 1.979) lo cual viene a enfatizar sobre la escasa importancia que el tejido adiposo tiene en la síntesis de triglicéridos en las aves, mostrándose este tejido como un almacén de triglicéridos y correspondiendo al hígado la misión de sus sin tesis (GOODRIDGE, 1.964).

Sobre los efectos que la insulina tiene sobre el metabolismo del acetato en las aves se dispone de una escasa información y solo se conocen algunos aspectos de este problema en el mamífero.

En la rata la insulina favorece la síntesis de lípidos y la oxidación a CO_2 a partir de acetato, solo cuando la glucosa está presente en el medio de incubación, en ausencia de ésta, el efecto de la hormona no es significativo (WINEGRAD y RENOLD, 1.958).

De nuestras experiencias se deduce igualmente que la insulina a dosis fisiológicas no tiene efecto significativo sobre la síntesis de triglicéridos o la oxidación hasta CO_2 cuando partimos de acetato- $U-^{14}C$, para ninguna de las concentraciones de acetato o tiempos de incubación empleados.

A concentraciones de insulina superiores a las fisiológicas (10^3 ng/ml) se observó sin embargo, un ligero aunque significativo incremento de la síntesis de triglicéridos y de la producción de CO_2 .

Así pues nuestros resultados son consistentes con los pu-

blicados por WINEGRAD y RENOLD, (1.958), trabajando con ratas y por GOODRIDGE (1.964) en aves, quien observó que la insulina no posee ningún efecto sobre la incorporación de acetato a lípidos.

Sin embargo en nuestro laboratorio se ha observado que la insulina añadida in vitro, cuando la glucosa está presente (11mM) estimula significativamente tanto la oxidación de acetato a CO_2 como la síntesis de triglicéridos (VIVES, 1.979). Este efecto de la insulina fue cualitativamente similar a los efectos que producen, la adición de glucosa sobre la incorporación de acetato a CO_2 y triglicéridos (MONTES, resultados no publicados).

El hecho de que la insulina en nuestras experiencias, solo estimule la síntesis de triglicéridos y producción de CO_2 a partir de acetato- $\text{U-}^{14}\text{C}$ cuando la glucosa está presente en el medio de incubación, junto con la observación de que la glucosa por sí sola estimula la síntesis de triglicéridos a partir de acetato en el tejido adiposo de las aves, está de acuerdo con lo que ocurre en el tejido adiposo de mamífero (WINEGRAD y RENOLD 1.958) parece así que en mamíferos la insulina incrementa la disponibilidad de glucosa para el adipocito, requerida posteriormente para la lipogénesis.

Todas estas observaciones pueden ser explicadas sobre la base de una acción primaria de la insulina añadida in vitro, esto es una estimulación de la transformación de la glucosa extracelular en glucosa 6-P intracelular.

En nuestro trabajo el estudio del metabolismo del acetato en tejido adiposo se completa con las experiencias que se recogen en las tablas 5 y 10 y que muestran, el efecto de distintas concentraciones de acetato, añadidas al medio de incubación sobre el metabolismo de la glucosa y que muestran claramente por primera vez que el acetato estimula la síntesis de triglicéridos a partir de glucosa, paralelo a una depresión de la oxidación de la glucosa hasta CO_2 ; lo que sugiere que en el tejido adiposo de las aves, existe un control de las rutas metabólicas similar al de los mamíferos y que tiende a almacenar la glucosa en forma de triglicéridos (los cuales se almacenan en T.A.) en situaciones tales como cuando existe un exceso de energía respecto de las necesidades inmediatas de la misma.

VI. CONCLUSIONES

1º) La síntesis de triglicéridos a partir de acetato- U-¹⁴C y la oxidación de este hasta CO₂ en adipocitos aislados de pollo son procesos dependientes y no saturables con la concentración de acetato.

2º) La síntesis de triglicéridos a partir de acetato- U-¹⁴C y la oxidación de este hasta CO₂ en adipocitos aislados de pollo son procesos dependientes del tiempo de incubación, siendo el primero saturable y el segundo no saturable con el tiempo de incubación.

3º) La síntesis de triglicéridos a partir de acetato- U-¹⁴C y la oxidación de este hasta CO₂ en adipocitos aislados de pollo, solo se incrementa con la adición en el medio de incubación de dosis de insulina superiores a las fisiológicas (10³ ng/ml).

4º) La presencia de acetato en el medio de incubación inhibe la oxidación de la glucosa hasta CO₂, paralelo con una estimulación de la síntesis de triglicéridos a partir de glucosa, en adipocitos aislados de pollo.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- ANDERSON, C.E. and D.R. LANGSLOW. 1.975. Biochem. Soc. Trans., 3: 1.937-1.939.
- 2.- BALLARD, F.J.; HANSON, R.W. and G.A. LEVEILLE, 1.967. J. Biol. Chem. 242: 2.746-2.750.
- 3.- BELL, D.J. and P.D. STURKIE. 1.965. In: Avian Physiology. Comstock, Ithaca. New York.
- 4.- BORRON, D.C. and W.M. BRITON. 1.977. Poultry. Sci., 56: 353-355
- 5.- BUTCHER, R.W.; Ho, R.J.; MENG, H.C. and E.W. SUTHERLAND. 1.965. J. Biol. Chem., 240: 4.515.
- 6.- CARLSON L.A.; LILJEDAHLS, S.; VERDY; M. and C. WIRSEN, 1.964. Metabolism. 13: 227-231.
- 7.- CHAKRABARTY, K. and G.A. LEVEILLE. 1.968. Archs. Biochem. Biophys. 125: 259-268.
- 8.- COLCA, J.R. and R.L. HAZELWOOD. 1.976. Gen. Comp. Endocrinol., 28: 151-162.
- 9.- CORBIN, J.D.; REIMAN, E.M.; WALSH, D.A. and E.G. KREBS. 1.970. J. Biol. Chem. 245: 4.849
- 10.- CUATRECASAS, P. 1.971 a. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 68: 1.264-1.268.
- 11.- CUATRECASAS, P. 1.971 b. J. Biol. Chem., 246: 6.522-6.531.

- 12.- CUATRECASAS, P. 1.971c. J. Biol. Chem. 246: 6532-6542.
- 13.- CUATRECASAS, P. 1.971d J. Biol. Chem. 246: 7.265-7.274.
- 14.- CUATRECASAS, P. 1.972. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 69:
318-322.
- 15.- CUATRECASAS, P. and G. ILLIANO. 1.971. J. Biol. Chem.: 246:
4.938-4.946.
- 16.- DE METYS, P., KAHN, G.R. GINSBERG, B. and J. ROTH. 1.975.
Diabetes. 24 (Suppl. 2): 393.
- 17.- DOLE, V.P. 1.956. J. Clin. Invest., 35: 150.
- 18.- EPPLER, A. 1.965. Gen. Comp. Endocrinol. 5: 674.
- 19.- FAIN, J.N. and F.R. BUTCHER. 1.976. J. Cyclic. Nucleotide. Res.,
2: 71-78.
- 20.- FAVERGER, P. 1.965. Relative importance of different tissues
in the synthesis of fatty acids. In: Handbook of Physiology Adipose
Tissue. Washington, D.D. Am. Physiol. Soc. sect. 5, chapt. 4, p.p.
19-23.
- 21.- FELLER, D.D. 1.954. J. Biol. Chem., 206: 171-180.
- 22.- FIELD, R.A. and L.C. ADAMS. 1.961. Proc. 4th. Congr. Inter.
Diabetes. Fed., Editions Medecine et Hygiène., Gèneve, Vol I, p.603.

- 23.- FOLCH, J.; LEES, M, and G.H. SLOANE STANLEY. 1.957. J. Biol. Chem. 226: 497-509.
- 24.- FREDRICKSON, D.S. and R.S. GORDON, 1.958. Physiol. Rev., 38: 585.
- 25.- GIBSON, W.R. and A.V. NALVANDOV. 1.966. Am. J. Physiol., 211: 1.345-1.351.
- 26.- GOLDEN W.R.C. and C.N.H. LONG. 1.942. Am. J. Physiol. 136: 244-248.
- 27.- GOMEZ-CAPILLA, J.A.; MACARULLA, J.M. and C. OSORIO. 1.975. Rev. Esp. Fisiol., 31: 177-182.
- 28.- GOMEZ-CAPILLA, J.A. and D.R. LANGSLOW. 1.977. Int. J. Biochem., 8: 417-420.
- 29.- GOODRIDGE, A.G. 1.964. Comp. Biochem. Physiol., 13: 1-26.
- 30.- GOODRIDGE, A.G. 1.968a. Am. J. Physiol., 214: 897-901.
- 31.- GOODRIDGE, A.G. 1.968b. Am. J. Physiol., 214: 902-907.
- 32.- GOODRIDGE, A.G. and E.G. BALL, 1.965. Comp. Biochem. Physiol., 16: 367-381.
- 33.- GOODRIDGE, A.G. and E.G. BALL. 1.966. Am. J. Physiol. 211: 803-808.

- 34.- GOODRIDGE, A.G. and E.G. BALL. 1.967a. Am. J. Physiol. 213:
245-249.
- 35.- GOODRIDGE, A.G. and E.G. BALL. 1.967b. Biochem., 6: 1.676-
1.682.
- 36.- GOODRIDGE, A.G. and E.G. BALL. 1.967c. Biochem., 6: 2.335-2.343.
- 37.- GORDON, R.S. Jr. and A. CHERKES. 1.956. J. Clin Invest., 35:
206-212.
- 38.- GORDON, R.S. Jr. and A. CHERKES. 1.958. Proc. Soc. Exp. Biol.
Med., 27: 150.
- 39.- GRANDE, F. 1.968. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 128: 532-536.
- 40.- GRANDE, F. 1.969. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 131: 740.
- 41.- GRANDE, F. 1.976. In: Reflections Biochemistry. Proc. Int.
Symp. Enzym. Mech. Biosynth. Cell. Funct. Pergamon. Press, Oxford.
Ed, A. Kornberg.
- 42.- GRANDE, F. and W.F. PRIGGE. 1.970. Am. J. Physiol., 218:
1.406-1.411.
- 43.- HALES, C.N. and P.J. RANDLE. 1.963. Biochem. J., 8: 137.
- 44.- HANSBERGER, F.Y.; MILSTEIN. S.W. and R.J. RUTMAN. 1.954. J.
Biol. Chem., 208: 431-438.

- 45.- HARVEY, S. and C.G. SCANES. 1.977. J. Endocr., 70: 50 P.
- 46.- HARVEY, S.; SCANES, C.G.; CHADWICK, P. and N.J. BOLTON. 1.978. J. Endocr., 76: 501-506.
- 47.- HAZELWOOD, R.L. 1.958. Endocrinol. 63: 611-616.
- 48.- HAZELWOOD, R.L. 1.965. In: Avian Physiology. (P.D. Sturkie. Ed.) 3^a ed. pp. 313. Ithaca, N.Y. Cornell University Press.
- 49.- HAZELWOOD, R.L. 1.967. En: Fisiologia Aviar. Editado por P.D. Sturkie. Ed. Acribia, Zaragoza.
- 50.- HAZELWOOD, R.L. 1.971. Poultry. Sci., 50: 9-18.
- 51.- HAZELWOOD, R.L. 1.972. In: Avian Biology. Vol II Chap. 8. pp. 472-526. Ed. by V.S. Farner and J.R. King. Academic. Press. New York and London.
- 52.- HAZELWOOD, R.L. 1.973. Amer. Zool., 13: 669-709.
- 53.- HAZELWOOD, R.L. and F.W. LORENZ 1.957. Endocrinol. 61: 520-527.
- 54.- HAZELWOOD, R.L. and F.W. LORENZ. 1.959. Am. J. Physiol., 197: 47-51.
- 55.- HAZELWOOD, R.L.; KIMMEL, J.R. and H.G. POLLOCK. 1.968. Endocrinol., 83: 1.331-1.336.

- 56.- HAZELWOOD, R.L. and D.R. LANGSLOW. 1.978. J. Endocr., 76:
449-459.
- 57.- HEALD, P.S.; MGLACHLAN, P.M. and K.A. ROKLEDGE. 1.965. J.
Endocr., 33: 85-95.
- 58.- HOUFF, T.R. 1.958. Poultry Sci., 37: 1.452.
- 59.- HUTCHENS, T.T.; VAN BRUGGEN, J.T.; COCKBURN R.M. and E.S.
WEST. 1.954. J. Biol. Chem. 208: 115-122.
- 60.- ILLIANO, G.; TELL, G. P.E., SIEGEL, M.I. and P. CUATRECASAS.
1.973. Proc. Nat. Acad. Sci. 70: 2.443-2.447.
- 61.- JOHNSTON, D.W. 1.971. Comp. Biochem. Physiol., 40 A: 1.107-1.108.
- 62.- KILSHEIMER, G.S.; WEBER, D.R. and J. ASHMORE. 1.960. Proc.
Sc. Exp. Biol. Med., 104: 515-518.
- 63.- KIMMEL, J.R.; POLLOCK, H.G. and R.L. HAZELWOOD. 1.968. Endo-
crinol., 83: 1.323-1.330.
- 64.- KIMMEL, J.R.; HAYDEN, L.S. and H.G. POLLOCK. 1.975. J. Biol.
Chem., 250: 9.369-9.376.
- 65.- KING, D.L. and R.L. HAZELWOOD. 1.976. Am. J. Physiol., 231:
1.830-1.839.
- 66.- KREBS, H.A. 1.950. Biochem. Biophys. Acta. 4: 249-269.

- 67.- LANGDON, R.G. 1.957. J. Biol. Chem. 226: 615.
- 68.- LANGSLOW, D.R. 1.970. Ph. D. Thesis, University of Cambridge.
Citado por su autor.
- 69.- LANGSLOW, D.R. 1.971. Biochim. Biophys. Acta. 239: 33-37.
- 70.- LANGSLOW, D.R. 1.972. Comp. Biochem. Physiol., 43B: 689-701.
- 71.- LANGSLOW, D.R. and C.N. HALES. 1.969. J. Endocrinol. 43: 285-294.
- 72.- LANGSLOW, D.R. and C.N. HALES. 1.970. J. Endocrinol. 46: 243.
- 73.- LANGSLOW, D.R.; BUTLER, E.J.; HALES, C.N. and A.W. FEARSON.
1.970. J. Endocr., 46: 243-260.
- 74.- LANGSLOW, D.R. and C.N. HALES. 1.971. In: Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl. Bell, D.J. and B.M. Freeman ed.
vol 1: 521-548. London: Academic. Press.
- 75.- LANGSLOW, D.R. and B.M. FREEMAN. 1.972. Diabetologia, 8: 206-210.
- 76.- LANGSLOW, D.R. and R.L. HAZELWOOD. 1.975. Diabetologia. 11: 375-381.
- 77.- LAURELL, S. 1.957. Acta. Physiol. Scand. 41: 158.

- 78.- LEPKOVSKY, S., DIMICK, M.K.; FURUTA, F.; SHAPIR, M., PARK, R.;
NARITA, N. and K. KOMATSU. 1.967. Endocrinology, 31: 1.001-1.006.
- 79.- LEVEILLE, G.A. 1.969a. Comp. Biochem. Physiol.; 28: 431-435.
- 80.- LEVEILLE, G.A. 1.969b. Comp. Biochem. Physiol., 28: 733-740.
- 81.- LEVEILLE, G.A.; O'HEA, E.K. and K. CHACKRABARTY. 1.968. Proc. Soc. Exp. Med., 128: 298-401.
- 82.- LEVINE, R.GOLDSTEIN, M.S.; HUDDLESTON, B. and S.P. KLEIN. 1.950.
Am. J. Physiol. 163:70.
- 83.- LEWIS B.M. and T.M. HAYES. 1.978. Horm. Metab. Res., 10: 386-389.
- 84.- LUCKENBILL, L.M. and A.S. COHEN. 1.966. J. Cell. Biol., 31:
195-199.
- 85.- MANCHESTER, K.L. 1.963. Biochim. Biophys. Acta. 70: 208-210.
- 86.- Mc. CUMBER, W.D. and R.L. HAZELWOOD. 1.978. Gen. Comp. Endocri-
nol., 34: 421-427.
- 87.- MINKOWSKI, O. 1.893. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 31: 85.
- 88.- MIRSKY, F.A. and S. GITELSON. 1.957. Endocrinology, 51: 148-
152.
- 89.- MIRSKY, I.A. and S. GITELSON. 1.958. Endocrinology. 63: 345-
348.

- 90.- NABER, S.P. and R.L. HAZELWOOD. 1.977. Gen. Comp. Endocrinol.,
32: 495-504.
- 91.- NEWSHOLME, E.A. and G. START. q.973. Regulation in Metabolism.
Bristol, John Wiley and Sons. Ltd. London.
- 92.- O'HEA, E.K. and G.A. LEVEILLE. 1.968. Comp. Biochem. Physiol.,
26: 111-120.
- 93.- O'HEA, E.K. and G.A. LEVEILLE. 1.969. Comp. Biochem. Physiol.,
30: 149-159.
- 94.- PARK, G.R. and L.H. JOHNSON. 1.955. Am. J. Physiol., 182: 17.
- 95.- RENOLD, A.E. and G.F. CAHILL. 1.965. Adipose tissue, Section
5, Handbook of Physiology. Washington D.C., Am. Physiol. Soc.
- 96.- REYNAERT, R., DE PAEPE, M.; MARCUS, S. and G. PEETERS. 1.975.
J. Endocr., 66: 213-224.
- 97.- RODBELL, M. J. Biol. Chem. 239: 375-380.
- 98.- SAMOLS, E.; MARRI, G. and V. MARKS. 1.965. Lancet, 2: 415-416.
- 99.- SANCHO, J. 1.979. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Univer-
sidad de Granada.

- 100.- S CHOENHEIMER, R. and D. RITTEMBERG. 1.935. J. Biol. Chem.,
111: 175.
- 101.- SCHOENHEIMER, R. and D. RITTEMBERG. 1.936. J. Biol. Chem.,
114: 3rd-396.
- 102.- SCHOENHEIMER, R. 1.942. The dynamic state of Body Constitu-
ents. Cambridge, Mass., Harvard University Press.
- 103.- SCHUR, H. and A. LOW. 1.928. Wiener. Klin. Wochenschrift.,
41: 261.
- 104.- SHAPIRA, N., NIR, I. and P. BUDOWSKI. 1.978. Br. J. Nutr.,
39: 151-157.
- 105.- SIFERSTEIN, M.D. and V.M. FAGAN. 1.957. Science, 126: 1.012.
- 106.- SIMON, J.; FREYCHET, P. and G. ROSSELIN. 1.974. Endocrinolo-
gy, 25: 1.439-1.449.
- 107.- SIMON, J.; FREYCHET, P. and G. ROSSELIN. 1.977. Diabetologia,
13: 219-228.
- 108.- SMITH, L.F. 1.966. Amer. J. Med., 40: 662-666.
- 109.- STEINBERG, D. 1.963. In: Control of Lipid Metabolism, p III. Ed.
J.K. Grant, London and New York: Academic Press.
- 110.- SUTHERLAND, E.W. and T.W. RALL, 1.960. Pharmacol. Rev., 12:

265-299.

- 111.- SUTHERLAND, E.W.; Ø I. and BUTCHER, R.W. 1965. Rec. Prog. Horm. Res., 21 : 623.
- 112.- TURNER, S.D. and N. MCINTYRE, 1966. Lancet., 1 : 351-352.
- 113.- UNGER, R.H. and A.M. EISENTRAUT. 1969. Arch. Int. Med., 123 : 261.
- 114.- VIVES, F. 1979. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.
- 115.- VYDELINGUM, N.; KISSEBAH, J.H. and V. WYNN. 1978. Horm. Metab. Res., 10 : 38-46.
- 116.- WEIS-FOGH, T. 1967. In : Insects and Physiology, p. 143. Ed. J.W. Beament and J.E. Treherne. Edinburgh : Oliver and Boyd.
- 117.- WERTHIMER, E. and E. SHAPIRO. 1948. Physiol. Rev. 28 : 451.
- 118.- WEST, G.C. and M.S. MENG. 1968. Comp. Biochem. Physiol., 25 : 535-540.
- 119.- WHITE, J.E. and F.L. ENGEL. 1958. Clin. Res. 6 : 266.
- 120.- WINEGRAD, A.I. and A.R. LENOLD. 1958. J. Biol. Chem., 233 : 267-272.