

TESIS DOCTORAL DE
D. JOAQUIN SANCHO MARTIN
PARA ARCHIVO EN LA SECRETARIA DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS

* ESTUDIO IN VIVO DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN EL
GALLUS DOMESTICUS. EFECTO DE LA INSULINA. *

TESIS DOCTORAL



Biblioteca Universitaria de Granada



01533983

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Ciencias

Fecha 16 DIC. 1978

ENTRADA NUM. 3559

T
14
4

" ESTUDIO IN VIVO DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN EL
GALLUS DOMESTICUS. EFECTO DE LA INSULINA. "

Joaquin Sancho Martin

Granada, Diciembre 1.978

*El que suscribe este' conforme
que ser Ponente de este tesis*

*Fermín Sánchez de Medina Cantos
Director del Dept. de Bioquímica*

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 01965814 X
Nº Copia 121204448

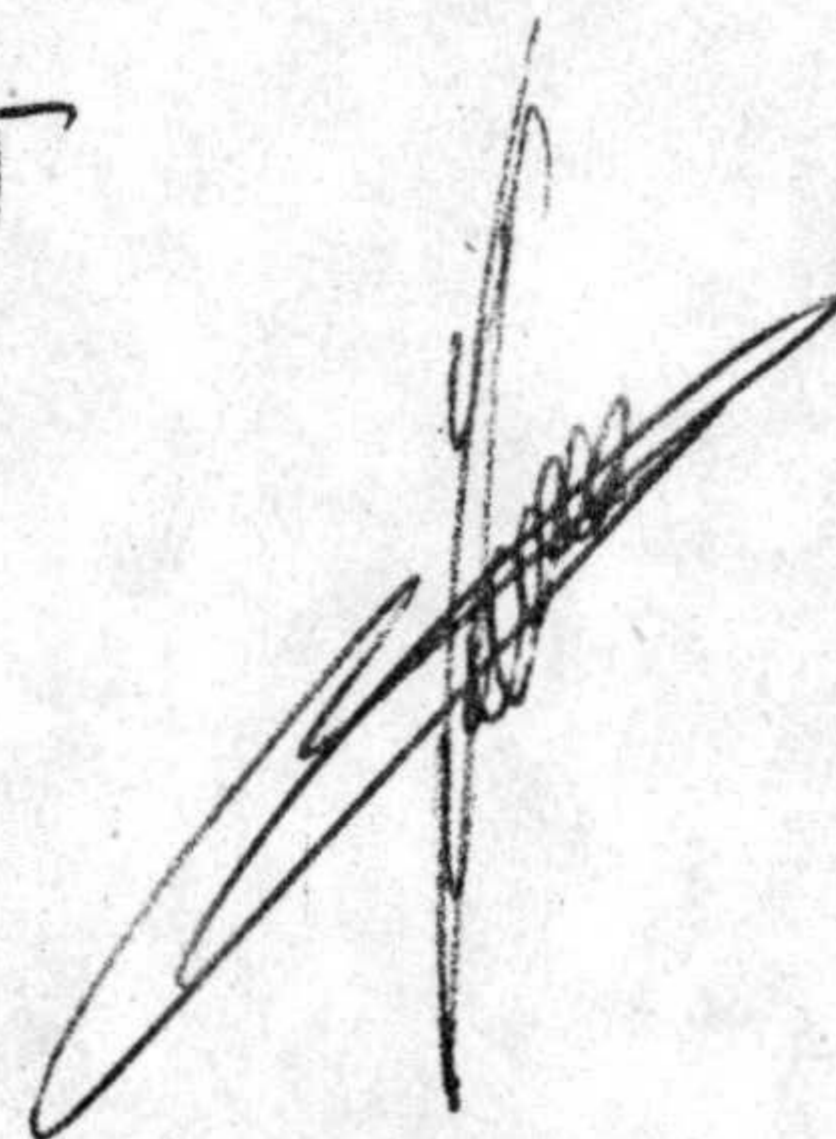
D. CARLOS OSORIO PELAEZ, Catedrático de Fisiología General, Química Biológica y Fisiología Especial, y D. JOSE ANTONIO GOMEZ CAPILLA, Profesor Adjunto de Fisiología General y Especial de la Facultad de Medicina de Granada.

CERTIFICAN : Que la Tesis Doctoral presentada, por D. JOAQUIN SANCHO MARTIN, a juzgar por el Tribunal que designe la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada sobre el tema :

" ESTUDIO IN VIVO DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN EL GALLUS DOMESTICUS. EFECTO DE LA INSULINA ", ha sido realizada bajo nuestra dirección durante los cursos 1.975 - 76, 1.976 - 77, 1.977 - 78, acreditando la capacidad técnica e interpretativa de su autor, los méritos suficientes para obtener el título de Doctor en Ciencias, siempre que así lo considere el Tribunal nombrado a tal efecto.

Granada, Diciembre 1.978.

@Oron

A large, stylized handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke at the bottom.

Mi sincero reconocimiento a :

D. Carlos Osorio Pelaez, por concederme la oportunidad de trabajar en su equipo de investigación.

D. Jose Antonio Gomez Capilla, por su apoyo y asesoramiento en la realización del presente trabajo.

D. Juan De Dios Luna Del Castillo, por su ayuda en la interpretación estadística de los resultados.

Así como a todos los compañeros del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, que de un modo u otro han colaborado en la realización de la presente Tesis Doctoral.

INDICE

	<u>Página</u>
INTRODUCCION	1
I.- Aspecto energético de los hidratos de carbono en las aves	5
II.- Regulación hormonal de los hidratos de carbono en las aves	13
III.-Papel de la insulina en el metabolismo hidrocarbonado de las aves.....	23
IV.- Resumen y planteamiento del trabajo	39
MATERIAL Y METODOS	43
Material Biológico	44
Administración de insulina	44
Obtención del extracto lipídico	47
Cromatografía en capa fina para lípidos neutros	49
Recogida y contaje de fracciones	52
Determinación de DNA.....	52
Método estadístico	56
Expresiones Generales	57
Test para la comparación de dos muestras independien- tes	66
Aplicación de los modelos teóricos	70

	<u>Página</u>
RESULTADOS	73
Tratamiento estadístico de los resultados	82
Primera Prueba (Análisis de la Varianza)	83
Primera Prueba (Comparación de Medias)	88
Segunda Prueba (Análisis de la Varianza)	94
Segunda Prueba (Comparación de Medias)	96
 GRAFICAS	 100
 DISCUSION	 125
Efecto Hipoglucemiante de la Insulina	126
Incorporación de Glucosa U ¹⁴ C a Triglicéridos.....	129
Incorporación de Glucosa U ¹⁴ C a Acidos Grasos Libres	134
Incorporación de Glucosa U ¹⁴ C a Colesterol	138
Incorporación de Glucosa U ¹⁴ C a Fosfolípidos	143
Efecto de la Insulina sobre el metabolismo de Gluco- sa U ¹⁴ C.....	147
Efecto de la Insulina sobre la incorporación de Glu- cosa U ¹⁴ C a Triglicéridos	148
Efecto de la Insulina sobre la incorporación de Glu- cosa U ¹⁴ C a Acidos Grasos Libres	149

	<u>Página</u>
Efecto de la Insulina sobre la incorporación de Glu- cosa U ¹⁴ C a Colesterol	153
Efecto de la Insulina sobre la incorporación de Glu- cosa U ¹⁴ C a Fosfolípidos	153
Consideraciones Finales	155
CONCLUSIONES	158
BIBLIOGRAFIA	161

INTRODUCCION

En contraste con el mamífero, sobre el que existe una gran cantidad de bibliografía sobre el metabolismo de carbohidratos y su regulación hormonal, en el ave ha sido escasa la información bibliográfica a tal respecto.

Tan sólo en los últimos años se ha desarrollado en este campo una serie de esfuerzos por parte de diversos autores para esclarecer el metabolismo de los hidratos de carbono durante el desarrollo pre y neonatal del "Gallus Domesticus", así como su control por las secreciones hormonales que regulan dicho metabolismo.

Desde que en 1.893 Minkowski observó que patos y gansos pancreactomizados no desarrollaban diabetes Mellitus como los mamíferos, el campo del metabolismo hidrocarbonado de las aves ha sido objeto de investigación comparativa respecto al de los mamíferos.

Ya en las primeras investigaciones pudo comprobarse la típica resistencia de las aves a la acción de la insulina, cifrada en leves hipoglucemias para dosis tan elevadas como 50 U.I./Kg de peso cuerpo.

Los trabajos que fueron punto de partida en la investigación del metabolismo de los hidratos de carbono en las aves,

fueron los que describían la forma en que estos circulaban por el plasma. Así, en el siglo pasado se pudo comprobar que la glucosa circulante en plasma aviar lo hacía en forma de D - Glucosa, y que la fructosa y galactosa acompañaba a la primera en concentraciones más pequeñas (4 mgrs. % y 1 mgrs. % respectivamente) , Sturkie, (1.967) ,

También interesó conocer desde los primeros trabajos los niveles de concentración de estos hidratos de carbono en plasma aviar, demostrándose que los niveles glucémicos del pollo eran doble que los del mamífero, Bell y Sturkie, (1.965) . Respecto a la comparación en contenido de glucógeno entre otros tejidos, aves y mamíferos poseen similares contenidos de glucógeno en músculo esquelético e hígado, siendo el contenido en corazón cuatro veces menor en aves que en mamífero, Sturkie, (1.967) .

Haupt (1.958) , trabajando con pollitos recién nacidos estudió la relación entre el estado nutricional del ave y los niveles de glucosa en plasma, observando que al ser sometidos los pollitos a periodos de ayuno prolongado se les producía una leve hipoglucemia en contraste con el mamífero, a quien los efectos del ayuno le producía aguda hipoglucemia.

En esta línea de trabajo Golden y Long (1.942) , con

pollitos de más edad, hallaron que a las 24 horas de ayuno, se producía un descenso de los niveles de glucosa aproximadamente de 10 mgrs. % , una caída en los niveles de glucógeno del hígado desde el 3,0 % al 0,5 % , y una caída en músculo pectoral desde el 1.000 mgr. % hasta 750 mgr. % . Más recientemente Hazelwood y Lorenz (1.959) , sometiendo pollos adultos a ayunos más prolongados, observaron que de 24 a 36 horas después de haber comenzado el periodo de ayuno, se producía una elevación progresiva de la glucosa sanguínea alcanzando un máximo seis días después de haber comenzado el periodo de ayuno. Simultáneamente, el glucógeno hepático deplecionado al comienzo del ayuno por un posible proceso de glucogenolisis, es restaurado al transcurrir el periodo de ayuno por gluconeogenesis.

Respecto al glucógeno cardiaco, se ha podido comprobar que durante las primeras doce horas de ayuno aumenta a más del doble sobre los niveles basales del preayuno, hasta alcanzar un máximo a las 48 horas del ayuno, para progresivamente ir descendiendo a medida que continua el periodo de ayuno.

I - ASPECTO ENERGETICO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO EN LAS AVES

Otros aspectos del metabolismo hidrocarbonado que han sido objeto de amplia investigación ha sido el estudio sobre la misión energética de los hidratos de carbono en el pollo.

Ya se conocía desde hacía tiempo que la clara y la yema de huevo conjuntamente, son las únicas fuentes de nutrición tanto para el cigoto y el embrión, durante el periodo de incubación. El huevo posee el 1 % de hidratos de carbono de los cuales el 75 % se hallan en la clara, habiéndose comprobado que cierta cantidad de los mismos se hallan en combinación con proteínas de la clara, mientras que la glucosa era la de mayor concentración en los hidratos de carbono libres del huevo : Romanoff y Romanoff, (1.949) .

En cuanto a la yema parece ser que el 60 % de los hidratos de carbono están sin combinar, mientras que los que se hayan en forma combinada, parecen ser que son del tipo de manosa - glucosamina (ovovitelina y ovolivetina) encontrándose también las combinaciones de lípidos - hidratos de carbono (ovolecitina y varios cerebrosidos) . Experiencias realizadas con embriones demostraron que los hidratos de carbono eran las prin

cipales fuentes de energía al comienzo de todos los procesos de crecimiento y diferenciación orgánica del embrión. Tal hecho ve
nía corroborado por el valor del coeficiente respiratorio del embrión (1,0), así como por homogeneizados de embriones totales, los cuales contenían cantidades substanciales de todos los productos de degradación intermediarios de la vía glucolítica de Embden-Meyeroff, Stumpf, (1.947), habiéndose comprobado así mis
mo que tales homogeneizados poseen completos los mecanismos de fosforilación .

De importancia considerable fué el hecho de que tales intermediarios glucolíticos como la G- 1 -P, G- 6 -P, F- 6 -P, F- D -P y trisafosfato son prácticamente iguales a los hallados en tejidos aviares adultos, Novikoff, Potter y Le Page (1.948).

En 1.953 Kun usando membranas corioalantoideas, pudo comprobar que los tejidos oxidaban aerobicamente la G- 6 -P, y la F- 6 -P, suponiendo la existencia de una fuente de trifosfopiridin nucleótido (T P N). Tal conjetura hizo pensar que el ciclo de las pentosas funcionaba en una edad precoz, concluyendo que la vía Embden-Meyeroff podía no ser la única ruta de liberación de energía asequible al embrión.

Los investigadores al considerar a los hidratos de car
bono como la principal fuente de energía en los procesos de desa

rollo, no excluían en sus trabajos otras fuentes de energía durante tales procesos. Así Spratt (1.949, y 1.950) trabajando con blastodermos explantados a medios sintéticos con diferente concentración de los nutrientes, pudo comprobar que no era la glucosa la que solamente participaba en los procesos de diferenciación y morfogénesis, sino que también intervenían la manosa, la fructosa, la galactosa y la maltosa.

La evolución sufrida por los sustratos energéticos en el desarrollo del embrión, va desde un uso casi exclusivo de hidratos de carbono en los primeros días de la incubación, para dar paso la segunda semana al uso prioritario de proteínas, para finalizar con los lípidos.

Este progresivo uso de los diferentes sustratos energéticos se confirma por el distinto valor del coeficiente respiratorio de la última semana del periodo de desarrollo netamente inferior (0,7), Romijn y Lokhorst (1.960) respecto al observado en los primeros días de desarrollo, George e Iype (1.962) .

Dentro de las posibles sustituciones entre los distintos hidratos de carbono, la manosa puede sustituir en los primeros días del desarrollo embrionario a la glucosa, no ocurriendo así con la galactosa, lo que hace pensar que este último monosa-

carido no encuentra el enzima que sea capaz de convertir la galactosa en glucosa - 1 - fosfato.

Trabajos de Mac Callion y Wong (1.956) demuestran que el propio glucogeno es usado como fuente energética por el embrión. Debido a la exigua cantidad de hidratos de carbono del huevo, no se excluye la posibilidad de que la gluconeogénesis funcionara en el hígado del embrión tan activamente como las necesidades energéticas lo requiriesen, produciendo glucosa para su uso inmediato, o bien para ser acumulada en hígado y músculo esquelético en forma de glucógeno : Kilsheimer, Weber y Ashmore (1.960) , Ballar y Oliver (1.963) .

Tal hecho se confirmó, por la comprobación de la entrada en actividad de los enzimas gluconeogénicos tales como piruvato carboxilasa, fosfopiruvato carboxilasa, hexosa difosfatasa y glucosa - 6 - fosfatasa , Rinaudo (1.961) , Nelson , Yarnell y Wagle (1.966) , Feliciolli , Gabrielli y Rossi (1.967) .

La evolución del contenido en glucógeno del embrión oscila desde pequeñas cantidades, detectadas en hígados de embriones sobre el sexto día incubación , Dalton (1.937) , hasta un máximo al final del proceso de incubación : Gill (1.938) , Ballard y Oliver (1.963) , produciendose antes del nacimiento

una rápida metabolización del glucógeno hepático concomitante con una subida de la glucosa plasmática , Freeman (1.969) , dando a entender que el glucógeno sirve además como fuente de energía para el nacimiento. Pudiéndose observarse de igual modo un descenso en las actividades de la hexosadifosfatasa y glucosa - 6 - fosfatasa despues del nacimiento, Rinaudo (1.961) , Nelson y colaboradores (1.966) y Wallace (1.967) .

Durante el periodo embrionario, tambien es observado un aumento en los depósitos de grasa, hasta alcanzar un máximo justo antes del nacimiento : Langslow y Lewis (1.972) , obteniendo Goodridge(1.968a) y Raheja y colaboradores (1.972) parecidas conclusiones, produciendose el mencionado cambio de trigliceridos por hidratos de carbono en el nacimiento.

Raheja y colaboradores (1.972) encuentran incrementadas las concentraciones de glucosa plasmática y de insulina en plasma despues del nacimiento y alimentación del pollito. Sin embargo poco es conocido de los cambios de concentración de la glucosa plasmática en los momentos que rodea al nacimiento, así como de la concentración de acidos grasos libres en ese tiempo concreto de la eclosión.

La mayoría de los trabajos dedicados al aspecto energé

tico de los hidratos de carbono concluían que los procesos de morfogénesis, utilizan menos energía exógena que los procesos de diferenciación a la vez que las necesidades nutritivas para el crecimiento del embrión es muy diferente al de los procesos anteriormente mencionados, Sturkie (1.967) .

Los procesos de absorción intestinal y transporte de los hidratos de carbono son indudablemente imprescindibles para un buen conocimiento del metabolismo hidrocarbonado.

En 1.957 Bogner comprobó que diferentes azúcares poseían diferentes coeficientes absorción, presentándose en el periodo embrionario un valor máximo para la galactosa y un valor mínimo para la fructosa. En estudios comparativos entre aves y mamíferos se pudo comprobar que la absorción aunque cualitativamente es mayor en aves, era idéntica respecto al orden decreciente seguido por la absorción de los diferentes azúcares.

La absorción de glucosa y galactosa, por un proceso activo, ha sido demostrado en embriones de 18 días y en pollitos de 2, 4 , y 8 días de edad, siendo mayor la utilización de la glucosa por pollitos de dos días de edad, mientras que la utilización de la galactosa no incrementa con la edad : Bogner y Haines (1.960) , Bogner y Haines (1.961) .

Los coeficientes de absorción intestinal obtenidos " in vivo " en el pollito, son más altos comparándolos con aquellos obtenidos " in vitro " ; Sato, Homma and Gotoh (1.960) a la vez que se demostró que el pollito posee " in vivo " una velocidad de absorción de glucosa de 3 a 4 veces más alta que el mamifero.

Una vez absorbidos por el tracto intestinal, los hidratos de carbono se transportan hasta el hígado , vía vena porta.

En el hígado pueden seguir tres caminos :

- a) Ser almacenados como glucógeno
- b) Transformados en grasa
- c) Ser degradados a CO_2 , H_2O y energía.

II - REGULACION HORMONAL DE LOS HIDRATOS DE CARBONO EN LAS AVES

En este apartado se va a tratar de la regulación hormonal del metabolismo de los hidratos de carbono, por lo cual estudiaremos aquellos organos implicados en el control metabólico de los mismos, es decir : el pancreas, el tiroides y la hipófisis .

Henckerman en 1.955, trabajando con pancreas de embriones de tres días encontró células insulares primarias (precursoras de las adultas) , que persisten hasta el día 17 de incubación. A igual conclusión usando técnicas más avanzadas como es la de la microscopía electrónica, se pudo detectar la aparición de las células α y β en el pancreas del embrión en el tercer día de incubación Przybylski, (1.967) .

Las células oscuras pancreáticas (rojas), aparecen el día 6 de incubación y seran las que sobre el día 10 daran lugar a las células α secretoras de glucagón.

Se ha podido demostrar la existencia de células α y β antes de que aparezcan sus respectivos gránulos secretorios, o incluso la formación de insulina la cual ha sido demostrable histoquímicamente por vez primera sobre el día 7 de incubación Lièvre , (1.957), que coincide con los hallazgos de Guidotti y

Foá (1.961); Leibson (1.965) ; Bondareva (1.970) , al compro
bar que los tejidos embrionarios son sensibles a la insulina, des
de el septimo día de incubación, demostrando el importante papel
de la insulina endógena para esta edad.

En el plasma del embrión, la insulina está presente por
el día 12 de incubación Grillo, (1.961) ; Leibson , Zheludkova
y Chilingaryan , (1.961).

Sin embargo no existen indicaciones respecto a la presen
cia de insulina en líquidos o tejidos extraembrionarios, así como
no se ha percibido efecto de ningún agente beta-citotóxico sobre
la morfogénesis o diferenciación de las células secretoras de insu
lina .

Aunque la insulina circulante aparece el día 13 de incu
bación tal fenómeno no implica que haya un proceso anterior de in
sulinogénesis, liberándose cantidades muy pequeñas de insulina in
capaces de ser detectadas por los métodos analíticos, pero sufici
entes para ser fisiológicamente activas en el desarrollo del embri
ón.

Otros trabajos fueron encaminados a conocer las posibles
interacciones de otros organos diferentes al pancreas que podían
afectar a la regulación del metabolismo hidrocarbonado.

La médula adrenal libera catecolaminas , que son conocidas como poderosos agentes glucogenolíticos, tanto en aves como en mamíferos. Evidencia de lo anterior se consiguió inyectando epinefrina en los sacos aéreos de embriones de once a dieciocho días, produciéndose glucogenolisis hepática en un espacio de tiempo relativamente corto.

En 1.954, Königsberg, estudiando el metabolismo hidrocarbonado en embriones decapitados, observó una hiperglucemia progresiva desde el día 8 al día 12 de incubación con una concomitante glucogénesis hepática, existiendo bastante duda acerca de la secreción hipofisaria responsable de este efecto.

Basándose en estudios realizados en mamíferos, existía una gran probabilidad de que estas secreciones fuera el ACTH y la hormona de crecimiento (GH). Los embriones hipofiseotomizados, retornan a la normalidad por el día 16 de incubación reflejando este hecho, el haber comenzado la liberación de insulina por el páncreas embrionario.

La liberación de T S H a los 12 o 14 días del desarrollo coincide con notables alteraciones en los niveles de los hidratos de carbono del hígado y del plasma. Respecto a las influencias de la hormona tiroidea, se ha demostrado que tiroxina inyectada en los

compartimentos alantoideos de embriones de cinco días, origina la hidrólisis del glucógeno hepático tres días después.

Por último estudiando los efectos de la hormona de crecimiento durante la última mitad de la embriogénesis, se observó una serie de efectos sobre los tejidos, que en la mayoría de los casos están relacionados con la síntesis proteica y el crecimiento óseo. La administración de hormona crecimiento corialantoidea en el día 13 del desarrollo embrionario produce la elevación de la glucemia del plasma del embrión, Hiesh, Wang y Blumenthal; Wang, Wang y Blumenthal, (1.952).

En el ave adulta, siguió mereciendo especial atención conocer el papel a jugar por los tejidos endocrinos más relacionados con el metabolismo hidrocarbonado.

Los primeros pasos en tal sentido se centraron igual que en los embriones sobre la composición del tejido pancreático aviar pudiéndose comprobar a) que las células α (secretoras de glucagon) poseían unos núcleos ovales o redondos; b) que las células β (secretoras de insulina) de mayor tamaño poseían núcleos esféricos y pequeños gránulos citoplasmáticos, Hellman (1.961) y Hellerström (1.963), existiendo la posibilidad de encontrar otras posibles fuentes de insulina en hígado y riñones del ave.

La distribución de las células α y β en pollos de diversas edades ha sido estudiada por Oakberg, (1.949) , comprobándose que existe una gran uniformidad y reparto de células β por toda la glándula. En los islotes pancreáticos de las aves adultas, las células α están en menor número que las células β a la vez que el pancreas de la gallina contiene más glucagón que el pancreas de mamífero, lo cual justifica parcialmente los niveles glucémicos más altos de las aves. Experiencias realizadas en mamíferos consideran al glucagón como la secreción natural de las células α , que al actuar sobre las células hepáticas activa la fosforilasa hepática desencadenando glucogenolisis produciendo la correspondiente hiperglucemia, obteniéndose idéntico resultado en las aves.

Investigaciones más recientes no han demostrado aún si el glucagón aviar estimula la liberación de las catecolaminas que son capaces de producir un rápido efecto glucogenolítico, tal como ha sido probado en mamífero : Sarcione, Back, Sokal, Mehlman y Knoblock (1.963) .

Respecto a los niveles de insulina en pancreas de embriones al final del periodo de incubación, así como en gallinas adultas se parece al encontrado en mamíferos, siempre que tal

comparación sea referida al mismo peso del tejido. Dicho contenido insulínico del pancreas aviar puede ser influenciado por diversos factores tales como : el ayuno, las dietas ricas en grasa y la administración de insulina exógena.

Estudios comparativos entre aves y mamíferos, realiza-
dos con tratamiento de aloxana, Scott, Harris y Chen (1.945) ,
demostraron que mientras en mamíferos se producía una pronunciada
hiperglucemia , en las aves tan sólo se originaba una leve necro-
sis de células β manteniéndose la glucemia en valores basales,
llegando a la conclusión de que la destrucción de las células
por la aloxana no posee efectos sobre el metabolismo hidrocarbonado
aviar.

Siguiendo dentro de los efectos de las hormonas implicadas en el metabolismo hidrocarbonado, las catecolaminas producian una rápida hiperglucemia originada por la acentuada glucogenolisis llevada a cabo en los depósitos de glucógeno hepático y/o muscular. Los trabajos de Golden y Long (1.942) demostraron claramente que no habia diferencias entre aves y mamíferos cuando eran sometidos al tratamiento con epinefrina, respecto a su metabolismo hidrocarbonado.

Sin embargo existen diferencias, entre aves y mamíferos

en su metabolismo lipídico cuando son tratados con catecolaminas evidenciado por un aumento de la liberación de ácidos grasos libres en el mamífero, mientras que en el ave no se produce ningún aumento en la movilización de lípidos , Carlson, Liljedahl, Verdy y Wirsen (1.964) .

Dentro de las hormonas corticoadrenales, las más relacionadas con el metabolismo de los hidratos de carbono en mamíferos, son fundamentalmente los corticoesteroides 11 - oxigenados, mientras que los glucocorticoides más implicados en el metabolismo hidrocarbonado son : la cortisona, hidrocortisona y la 11-des hidrocorticosterona , Sturkie (1.967) .

Dentro de la fisiología aviar, la corticosterona y el cortisol son los glucocorticoides de mayor influencia sobre el metabolismo de los azúcares, Greenman y Zarrow (1.961) , mientras que la cortisona poseía baja actividad en contraste con el mamífero. Hazelwood y colaboradores (1.962) y Siegel (1.962) demostraron que el A C T H del mamífero puede y debe estimular la liberación de glucocorticoides, habiéndose experimentado que a grandes dosis se provoca hiperglucemia en pollos pocas horas después de su inyección.

Respecto a las posibles influencias del tiroides, en

mamíferos, el hipertiroidismo está asociado con la movilización del glucógeno del hígado, produciéndose una débil hiperglucemia, lo que facilita la transferencia de los hidratos de carbono a través de la pared intestinal, aumentando la captación de glucosa por los tejidos periféricos en muchos animales.

Respecto a las aves, la tiroidectomía disminuye el nivel de glucosa en sangre, Riddle y Opdike (1.947); encontrándose que la tiroxina administrada a palomos depleciona los niveles de glucógeno del hígado y produce una ligera hiperglucemia.

Tratando a las aves con tiouracilo, se produce un aumento del glucógeno hepático concomitante con un aumento notable de los lípidos hepáticos, Snedecor y King (1.960). Otros órganos que pueden influir sobre el metabolismo de los hidratos de carbono son las gonadas; así tanto Bell (1.957) como Tapper y Kare (1.956), pudieron demostrar que la administración de andrógenos (tanto exógenos como endógenos) alteraban los niveles de glucosa sanguínea circulante por un posible incremento de los glóbulos rojos.

La temperatura ambiental y posiblemente ciertos controles neurogénicos influyen sobre el metabolismo de los hidratos de carbono. Al producirse una bajada de la temperatura

(hipotermia) disminuye la glucemia en un 41 % por debajo de los valores controles. La vuelta a la temperatura basal, produce un retorno de los niveles glucémicos, sin embargo la producción de un estado febril en el ave eleva en un 18 % los valores de glucemia por encima de los controles, Rodbard y Goldstein (1.950) .

III - PAPEL DE LA INSULINA EN EL METABOLISMO HIDROCARBONADO DE LAS AVES

La insulina fué considerada desde su descubrimiento como la principal hormona implicada en el metabolismo de los hidratatos de carbono en especial por su acción reguladora sobre los niveles de glucosa en sangre.

Desde hace tiempo son conocidas sus propiedades más características en mamíferos, tales como la de producir hipoglucemia, ser anticetónica, inhibir la glucogeneogénesis, así como de disminuir el fósforo y el potasio de la sangre, Hazelwood, (1.967).

En las aves, tanto pollitos como palomos tratados con insulina en dosis de (50 - 120) UI/ Kgr de peso de cuerpo, producen una elevación de la glucemia en 24 horas después de su administración ; Opdyke , (1.942), Riddle y Opdyke (1.947). Si se continúa el tratamiento en días sucesivos, Honeywell y Riddle (1.923), observaron un ensanchamiento de la glándula adrenal, produciéndose un incremento de la mitosis celular en la corteza y médula adrenal.

La hiperglucemia de rebote a las 24 horas de tratamiento con altas dosis de insulina, se trató de justificar de diversas maneras : En primer lugar se pensó que la causa podía ser la hiperactividad adrenal compensatoria de la hipoglucemia inducida

por la insulina, sugerencia apoyada por evidencias histológicas: Miller y Riddle , (1.941) .

Esta idea fué apoyada más tarde por Hazelwood y Lorenz (1.959) quienes usando insulina libre de glucagón, concluían que el aumento de la actividad de la glándula adrenal liberaban catecolaminas glucogenolíticas, las cuales a su vez favorecían la liberación de glucosa a la corriente sanguínea. Otra posible explicación a esta hiperglucemia fué realizada por Snedecor y colaboradores (1.959) , quienes la justificaban por una posible contaminación de la insulina por el glucagon.

Hazelwood y Lorenz en 1.959, usando insulina contaminada llegaron a parecidas conclusiones con unas dosis de insulina inferiores a las utilizadas por Snedecor y con unos tiempos de medida de la glucemia superiores a los del citado autor.

Una tercera explicación es que la liberación del glucagon endógeno pueda ser la causa en tal hiperglucemia, resulta más atractiva debido al alto contenido de glucagon del pancreas aviar: Vuylsteke y De Duve , (1.953), pudiendo disminuir rápidamente, ya que otras hiperglucemias de rebote han sido previamente inducidas en aves despancreatizadas : Riddle y Opdyke (1.947).

No obstante de todas las posibles justificaciones a es

ta hiperglucemia inducida en pollitos a las 24 horas de tratamiento con altas dosis de insulina, la más ampliamente aceptada, es aquella que la considera como resultado de un aumento de la actividad de la glándula adrenal.

Un capítulo que apasionó a todos los investigadores fué la diferente respuesta a la insulina entre aves y mamíferos.

En este sentido se compararon la respuesta de la glucosa plasmática a dosis graduales de insulina en diversas especies aviares y se encontró que el canario, el palomo y el pato eran 500 veces más resistentes a los efectos de la insulina que el perro, la rata o el conejo : Chen , Anderson y Maze , (1.945) .

En 1.925 Casidy y colaboradores informaron que sucesivas dosis diarias de insulina poseían efecto acumulativo, pero que la administración de dosis sencillas de insulina, del orden de 4 - 130 UI / Kgr poseían igual potencia hipoglucémica que las dosis diarias de insulina .

Se pensó en primer lugar que la resistencia aviar a la insulina se podía deber a un sistema hepático de destrucción de la hormona ya que pollitos hepatectomizados son hipersensibles a bajas dosis de la hormona : Hazelwood , (1.958) .

No obstante otros factores de hecho contribuían de algún

lina de pollito , indicaban que no había diferencias en la captación de glucosa, usando tanto insulinas aviares como las de mamífero, dando a entender que los receptores de tejido de mamífero " in vitro " no discriminaban entre los dos tipos de insulina, no reconociendo de este modo las diferencias estructurales entre los dos tipos de hormonas : Hazelwood y colaboradores , (1.968) .

Varios investigadores : Groen y colaboradores (1.952); Bornstein, (1.953) ; Randle , (1.957) ; Willebrands y colaboradores (1.958) ; Ball y Merrill, (1.961) ; Huber y Gershoff, (1.966) , apoyaban la idea de la existencia de sustancias presentes en el plasma las cuales reducían la potencia biológica de las diversas insulinas realizadas en los ensayos " in vitro " .

Otro aspecto de la regulación hormonal de hidratos de carbono por la insulina, es el de las respuestas metabólicas producidas por el suministro de drogas en aves que podían simular los efectos de la hormona pancreática.

Era conocido por ciertas sulfonil ureas, administradas vía oral eran efectivas para disminuir el síndrome diabético en el hombre . Así el pollito y el pato, respondían a la acción de la tolbutamida a dosis tan bajas como 10 mgrs/ kgr de peso de cuerpo causando una hipoglucemia más rápida que la observada con

insulina exógena : Hazelwood y Lorenz, (1.957) .

Mirsky y Gitelson, (1.957) demostraron que tratando con tolbutamida a pollitos aloxanizados, patos despancreatectomizados y completamente enterectomizados (por traslado del intestino) , desarrollaban una pronunciada hipoglucemia después del tratamiento con tolbutamida. Estos autores concluyen que la disminución de la glucemia por la tolbutamida en estas aves no dependía de la presencia de células β .

Una excepción según los mismos autores era el ganso, para el que encontraron una respuesta igual a la tolbutamida que la hallada en mamíferos, mientras estuviese presente el páncreas del ave. Posteriormente el propio Hazelwood (1.958) encontró que no había diferencia en respuesta a la tolbutamida en las aves que previamente habían sido hepatectomizadas y pancreatectomizadas, lo cual hacía pensar que en aves distintas al ganso la acción hipoglucemiante de las sulfonil ureas, fuera debida a un proceso de insulinogénesis, lo cual implica la existencia de una fuente extrahepática y extrapancreática de insulina aviar.

Otros aspectos de la regulación hormonal de los hidratos de carbono por la insulina, es conocer que alteraciones metabólicas se producen, por el bloqueo de la secreción pancreática,

ya sea usando agentes citotóxicos o por la extirpación del páncreas.

Con tal motivo fué Beckman, (1.956) quien sometiendo a aves alimentadas al tratamiento con sintalina A , observó la degranulación de las células α de los islotes de Langherans, produciéndose en el ave una transitoria hiperglucemia seguida de una pronunciada hipoglucemia . La inicial y transitoria hiperglucemia observada en los pollitos tratados con sintalina A , puede ser debida a una posible liberación de catecolaminas endógenas más que a una propia acción de la sintalina A ya que la respuesta se reducía si las aves previamente habían sido tratadas con reserpina: Langslow y Freeman , (1.973) .

En cuanto a la posterior hipoglucemia de las aves tratadas con sintalina A, simultáneamente había un descenso en los niveles de insulina en plasma que Langslow (1.973), sugirió que podía ser debida al estado hipoglucémico de las aves.

La suposición inicial de Beckmann , de que la sintalina A poseía una acción directa sobre células α pancreáticas, fué desechada.

Himmelman y Kern (1.971) , suponían que eran el riñón , el hígado y el intestino los tejidos más implicados en la actuación de la sintalina A , y sus efectos tóxicos se perciben

en el transporte , uso y síntesis de la glucosa. Tales efectos tóxicos producen en aves alimentadas hipoglucemias que en poco tiempo pueden ser letales, sino funcionan los mecanismos compensatorios .

Otro agente antidiabético como el phenformin, originaba igualmente una hipoglucemia producida por la inhibición del transporte de glucosa a través de las paredes intestinales : Stower y Bewisher, (1.967) , Czyzyk y colaboradores , (1.968) .

Así pues en los intentos de bloquear la actividad pancreática por agentes citotóxicos, no dieron buen resultado, ni los tratamientos con aloxana, Scott y colaboradores , (1.945) , Luckens , (1.948) ; Mirsky and Gitelson , (1.957) ; Langslow y colaboradores , (1.970) , así como tampoco el tratamiento con streptozotocina , Langslow (1.970) .

Serían los métodos quirúrgicos los que ofrecían una mayor seguridad en producir deficiencia de insulina en el ave. No obstante por la dificultad intrínseca de conseguir una total pancreatectomía, la mayor parte de los intentos producían solamente una parcial pancreatectomía.

Los informes recibidos sobre los niveles plasmáticos de glucosa, después de la pancreatectomía han sido conflictivos :

Mikami y Ono , (1.962) encontraban que parcial pancreatectomía producía una aguda y letal hipoglucemia , mientras que Koike, (1.964) y Lepkosky (1.967) encontraban que total pancreatectomía producía pocos cambios en los niveles de glucosa.

Los resultados de los trabajos de Mikami y Ono , (1.962) tenían su fundamento en que los lóbulos de pancreas extirpados eran ricos en islotes α y deficientes en islotes β , siendo razonable suponer que la hipoglucemia producida reflejaba una deficiencia de glucagón, produciendo en tales pollitos una caída en plasma de las concentraciones de ácidos grasos libres.

En las experiencias de Langslow y Freemann, (1.972) , se advertía que después de la parcial pancreatectomía en el pollito, había una marcada y persistente caída de concentración de insulina en plasma siendo independiente del estado nutricional del ave, no observándose ninguna hiperglucemia a continuación de cualquier intervención quirúrgica.

Comparando las experiencias de Langslow y Freemann donde el lóbulo esplénico pancreático quedaba intacto, con los hallazgos de Mikami y Ono, los primeros autores encontraron la mencionada caída de insulina en plasma , pero unos normalizados valores de glucagón.

Diversos tipos de aves fueron ensayadas. Así en el pato la parcial pancreatectomía dependía de la naturaleza del tejido remanente: Miahle (1.955a, 1.958), mientras que total pancreatectomía producía aguda hipoglucemia y muerte Miahle (1.955b). Similares resultados han sido obtenidos con gansos por Sitbon , (1.967) y Miahle (1.969) aunque Mirsky y Gitelson (1.958) encontraban por contraste hiperglucemia y glucosuria a continuación de la pancreatectomía.

Otro modo más actual de bloquear la acción de la insulina en el pollo fue la realizada por Bondareva, (1.970) , tratando al ave con suero antiinsulina, resultando una pronunciada hiperglucemia a continuación del tratamiento inmunológico.

Mereció interés especial el estudio de la relación existente entre el contenido pancreático y plasmático de insulina y su relación con los niveles de glucosa plasmática, así como con la concentración de ácidos grasos libres tanto en embriones como en pollos recién nacidos.

Glucosa per os o vía intracardiaca producía un incremento en las concentraciones plasmáticas de insulina en pollitos (Langslow y colaboradores , (1.970) , observándose que el nivel de glucosa circulante disminuía muy poco en los pollitos par-

cialmente pancreatetectomizados, mientras que las concentraciones de acidos grasos libres en plasma se veían afectadas al someter a pollitos despancreatizados a una carga de glucosa en contraste con los resultados obtenidos en el ave intacta , Langslow y Freeman (1.972) .

La cantidad total de insulina presente en el embrión es extremadamente pequeña para el día catorce de incubación, produciéndose un rápido incremento entre el día 16 y el día 19, Langslow , (1.975) . La rápida caída en el contenido del pancreas del embrión era aceptable. No produciéndose aparentemente ningún cambio en los niveles de glucosa plasmática o de acidos grasos libres, que pudiera estar relacionado con estas pérdidas de insulina por el pancreas.

La concentración de insulina pancreática en pollitos de un día de edad es aproximadamente de 4,6 U / ml y no incrementa hasta que el pollito es alimentado con una alta dieta de hidratos de carbono , Raheja y colaboradores , (1.972) . El incremento en la concentración de glucosa plasmática es probablemente debida a un incremento en la velocidad de gluconeogenesis, mejor que a un decrecimiento en la utilización de la misma.

El tiempo para el cual cesa el incremento de glucosa en

plasma, coincide con un rápido decrecimiento de las reservas pancreáticas de insulina, sugiriendo que durante el nacimiento la hormona pancreática juega un importante papel en el control metabólico de hidratos de carbono y lípidos, Langslow, (1.974) ,

En cuanto a la sensibilidad de los tejidos a la acción de la hormona pancreática, como hemos visto en otro apartado de esta introducción, los tejidos embrionarios dan respuesta a la acción de la insulina desde el día septimo de incubación : Guidotti y Foa (1.961) , Leibson (1.965) , Bondareva (1.970) .

Con la excepción de la respuesta glicogenolítica del músculo hepático y periperal , el ave parece responder a la hormona en la misma dirección pero a un grado menor que los mamíferos, Hazelwood (1.967) .

En otros tejidos , adiposo y muscular, se produce la captación y oxidación de la glucosa solamente con altas concentraciones de insulina, así como la incorporación de glucosa en glucógeno, mientras que la lipólisis no se ve afectada por estímulo de la insulina : Goodridge , (1.968a) ; Langslow, (1.971) ; Langslow y Hales , (1.971) .

Respecto a la captación de glucosa por el músculo cardíaco, también parece ser insensible al estímulo con dosis mode-

radas de insulina , siendo mucho más sensible a la captación de aminoácidos : Guidotti y colaboradores , (1.968) .

Poco es conocido del efecto de las secreciones endocrinas del páncreas sobre el metabolismo de los hidratos de carbono en el hígado , pero existe una razonable especulación de que la insulina puede jugar un papel importante en la regulación del metabolismo de la glucosa en este tejido : Langslow y Freemann , (1.972) .

A pesar de la insensibilidad de los tejidos del pollito a la insulina " in vitro " , se ha observado que la fuerte tolerancia a la glucosa mostrada por los pollitos en la parcial pancreatoclectomía sugiere que la insulina juega un fuerte papel en el uso y metabolización de la glucosa , Langslow y Freemann , (1.972) .

Conocido era desde Gordon, Dole y Cherkas , (1.956) que mamíferos tratados con insulina o administración de glucosa disminuían los niveles de los ácidos grasos libres en plasma, suponiéndose que tales descensos eran promovidos por un decrecimiento de las reservas de los ácidos grasos libres de los depósitos de grasa : Shoemaker, Carruther, Elwyn y Ashmore , (1.962) ; Bierman , Schwartz y Dole , (1.957) .

En mamíferos igualmente la insulina inhibía la liberación de ácidos grasos libres del tejido adiposo, confirmado por experiencias realizadas " in vitro " , confirmadas por Engels (1.962); Raben (1.965); Steinberg (1.965) y Vaughan (1.962).

En contraste, lo contrario ocurre en pollitos donde la insulina incrementa los niveles de los ácidos grasos libres plasmáticos. Así Heald y colaboradores trataron de explicarlo por una posible intervención de la insulina, que actuaba promoviendo un incremento en la liberación del glucagón del páncreas, siendo el glucagón quien actuaba directamente sobre los tejidos adiposos aviares, acelerando el desprendimiento de tales ácidos grasos libres.

Debido a que el glucagón poseía un marcado efecto en estimular la liberación de los ácidos grasos libres del tejido adiposo del pollito : Heald y colaboradores (1.965); Carlson y colaborad. (1.964); podía haber sido prematuro suponer que el incremento en plasma de los niveles de los ácidos grasos libres era debido a la contaminación de las preparaciones de insulina por el glucagón así como las experiencias realizadas en pollitos sin páncreas indican que la insulina " per se " produce la elevación de los niveles de ácidos grasos libres circulantes en plasma :

Langslow y Freemann , (1.972) .

Otros investigadores trabajando " in vitro " observan que la insulina no poseía efectos sobre la velocidad de lipolisis en el tejido adiposo abdominal del palomo pudiéndose comprobar que para altas concentraciones de insulina (0,5 UI / ml) se produce un ligero incremento en la lipolisis, aunque tal vez fuera atribuido este incremento a trazas del glucagón contaminante en las preparaciones de insulina .

Igualmente Goodridge , (1.964) , observaba que la insulina no poseía efecto sobre la incorporación de acetato a lípidos en la grasa abdominal de ciertas aves como el gorrión.

IV - RESUMEN Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

El papel que la insulina juega regulando el metabolismo de los hidratos de carbono en las aves es todavía incierto.

Desde las observaciones de Minkowski en el año 1.893 referentes a que patos y gansos no desarrollaban diabetes " mellitus " posterior a la pancreatectomía, se estableció las diferencias existentes entre las aves y los mamíferos.

Tampoco el aloxano : Scott (1.945), Lukens (1.948), Mirsky y Gitelson (1.957), Langslow y colaboradores (1.970) ni la streptosotocina : Langslow (1.970), Langslow y colaboradores (1.970), tienen un efecto específico sobre las células β de los islotes de Langherans, y no modifican los niveles plasmáticos de glucosa, ácidos grasos libres e insulina.

Una parcial pancreatectomía (extirpación del 99 % del páncreas) producía solo efectos pasajeros sobre los niveles plasmáticos de glucosa y de insulina y no evita la hipoglucemia inducida por la tolbutamida secundaria a la liberación de insulina : Colca y Hazelwood (1.976).

Los pollos son extremadamente insensibles a la insulina, habiéndose encontrado que esta hormona produce un aumento en la concentración plasmática de ácidos grasos libres y un decenso de la concentración de N_2 de aminoácidos en el plasma :

Hazelwood y Lorenz (1.959) ; Heald y colaboradores (1.965) ;
Langslow y colaboradores (1.970) .

Los estudios realizados sobre el efecto de la insulina referente al metabolismo de la glucosa en los tejidos del pollo, han revelado que esta hormona solo produce pequeñas estimulaciones requiriéndose para ello grandes dosis de insulina mucho más altas que la concentración de insulina en el plasma del pollo : Langslow (1.970) ; Goodridge (1.968 a) ; Goodridge (1.968 b) ; Langslow y Hales (1.969) ; Langslow (1.971) .

Sin embargo Gomez - Capilla y Langslow (1.977) han publicado por vez primera, que dosis fisiológicas de insulina estimulan la captación de glucosa síntesis de triglicéridos y producción de CO_2 a partir de glucosa en adipocitos aislados del tejido adiposo de pollo.

Por lo tanto el interés de este trabajo experimental se centró en estudiar los posibles efectos que dosis fisiológicas de insulina pudieran producir sobre el metabolismo de la glucosa en diversos tejidos del pollo usando experimentos " in vivo " .

Para ello se estudiará :

- 1).- El efecto de distintas dosis de insulina sobre los niveles de glucosa plasmática.
- 2).- El efecto de la insulina (a la dosis mínima que produce la mayor hipoglucemia, obtenida del experimento anterior), sobre la glucosa plasmática a distintos tiempos desde la administración de la hormona .
- 3).- El efecto de la insulina sobre la incorporación de glucosa U ^{14}C a Triglicéridos en tejido adiposo, hígado, músculo esquelético, músculo cardíaco, y plasma a distintos tiempos desde la administración de la hormona.
- 4).- El efecto de la insulina sobre la incorporación de glucosa U ^{14}C a Acidos Grasos Libres en tejido adiposo, hígado, músculo esquelético, músculo cardíaco y plasma a distintos tiempos desde la administración de la hormona.
- 5).- El efecto de la insulina sobre la incorporación de glucosa U ^{14}C a Colesterol Libre y Colesterol Esterificado en tejido adiposo, hígado, músculo esquelético, músculo cardíaco y plasma a distintos tiempos desde la administración de la hormona.
- 6).- El efecto de la insulina sobre la incorporación de glucosa U ^{14}C a Fosfolípidos en tejido adiposo, músculo esquelético, músculo cardíaco, y plasma a distintos tiempos desde la administración de la hormona.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Para las experiencias se usaron pollitos de 1 día de edad de la raza Leghor Blanca, suministrados por la casa Avigrana S.A. Para nuestro trabajo se eligieron pollos comprendidos entre 38 y 41 gramos de peso, haciéndose dos lotes : un lote fué tratado con solución salina que se utiliza como control y el otro lote se trató con insulina.

La insulina fué proporcionada por Burroughs Welcome and C.O. (23,9 UI/mgr) .

ADMINISTRACION DE INSULINA

Con el objeto de determinar las dosis de insulina que produce la mayor hipoglucemia, se tomaron lotes de cinco pollitos a los cuales se les inyectó vía intracardiaca 25 μ l de disoluciones de insulina de distinta concentración. La inyección se realizó con microjeringa de 100 μ l Precisión Sampling Corporation. Las dosis de insulina que se usaron para este experimento fueron de 6, 3, 1'5, 0'75, y 0'375 UI/Kgr de pollo. Otro lote de cinco pollitos que se usaron como controles, se les administró también vía intracardiaca 25 μ l de disolución salina.

A los treinta minutos de la administración de la solución salina o de la insulina los animales se sacrifican por decapitación y una muestra de sangre se recoge en tubos preparados con cristales de fluoruro-oxalato para la determinación de glucosa.

Para determinar el efecto de la insulina a diversos tiempos de su administración, se inyectaron lotes de 5 pollos cada uno, con insulina (0,75 UI/Kgr pollo) vía intracardíaca, sacrificándose los animales por decapitación a los 10, 30, 60, 120 y 180 minutos después de la administración de insulina . Como controles se usaron pollos a los que se les inyectó 25 μ l de solución salina .

Inmediatamente después del sacrificio de los animales se tomaron muestras de sangre para la determinación de glucosa.

DETERMINACION DE GLUCOSA

La glucosa se determinó por el método de la glucosa oxidasa - peroxidasa utilizando un Kit comercial de la Boehringer Mannheim GMBH .

ADMINISTRACION DE GLUCOSA U-¹⁴C E INSULINA

En esta experiencia, se utilizarón para cada tiempo de sacrificio de los animales por decapitación (10, 30, 60 y 120 minutos), dos lotes de cuatro pollos cada uno : Un lote (controles) se inyectó vía intracardiaca con 50 μ l que contenían 10 μ Ci de glucosa ¹⁴C uniformemente marcada suministrada por Radiochemical Centre (Amersham). El segundo lote de pollitos se inyectó con 50 μ l conteniendo 10 μ Ci de glucosa ¹⁴C más 25 μ l de una disolución de insulina equivalente a 0,75 UI/Kgr pollo.

EXTRACCION DEL TEJIDO

Los pollitos una vez sacrificados por decapitación, fueron inmediatamente manipulados con ayuda de pinzas y tijeras adecuadas para la extracción de los correspondientes trozos de tejido.

En primer lugar se recogía el plasma sobre tubos con gotas de heparina de la casa comercial Leo. Con ayuda de unas pinzas y tijeras se extraían trozos de pesos comprendidos (80- 400) mgr de los tejidos : adiposo, muscular esquelético, hepático y cardiaco. Previamente a la pesada de las muestras en balanza de

precisión, se procedía a su secado sobre un papel absorbente con objeto de reducir al máximo el contenido acuoso de los tejidos.

De cada trozo de tejido se obtenían dos muestras una para determinación de lípidos totales y otra para determinación de DNA.

OBTENCION DEL EXTRACTO LIPIDICO

Material utilizado :

Homogeneizadores de la casa Pobel.

Tubos esmerilados de 15 ml de capacidad de la casa Pobel.

Cloroformo de la casa Merck.

Metanol de la casa Merck.

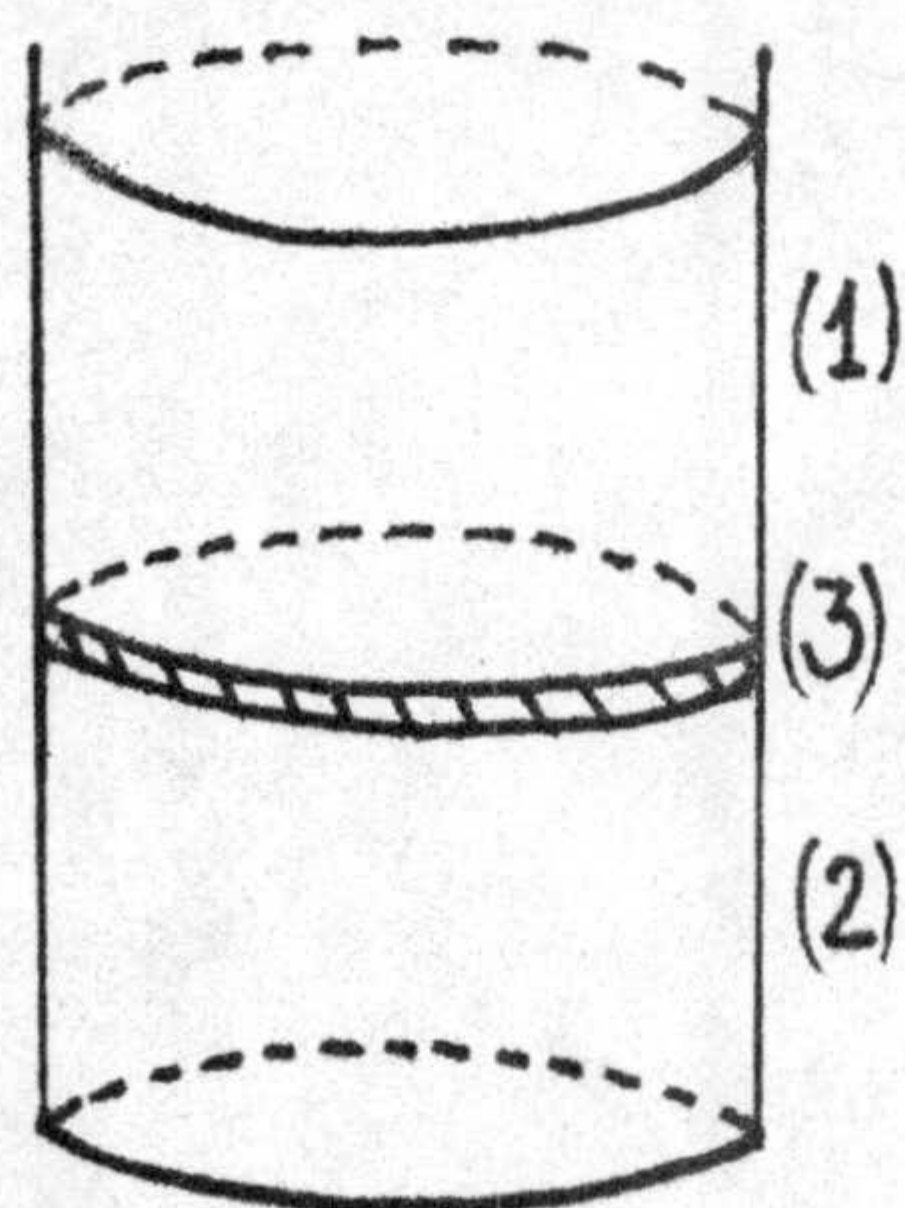
Acido Clorhídrico de la casa Merck.

El extracto lipídico fué obtenido de los distintos tejidos siguiendo el método de Santiago y colaboradores, (1.968).

Se utilizó un homogeneizador Pobel ; en él se deposita un trozo del tejido que se homogeneizó con 2,5 ml de la mezcla cloroformo : metanol : clorhídrico (200 : 100 : 1) .

Se homogeneiza durante cinco minutos y se vierte el ho-

geneizado en un tubo de 15 ml, de boca esmerilada. El homogenizador se lava con 2,5 ml de la misma mezcla y se reune con la precedente de la primera extracción . Se añade 5 ml de clorhídrico 0,1 N , se agita vigorosamente el tubo durante 1 minuto, y se pone acentrifugar a 1.000 x g durante 10 minutos . Terminada la centrifugación aparecen tres fases :



La fase superior (1) es acuosa.
La fase inferior (2) es orgánica .
La fase intermedia (3) está formada por proteínas .

Con una pipeta Pasteur adaptada a una bomba de agua se succiona y elimina la fase acuosa (1). Haciendo una pequeña inclinación al tubo, el paquete de proteínas, que constituye la fase intermedia (3) , da vista a la fase cloroformica (2) , la cual se decanta cuidadosamente a otro tubo de 15 ml. de boca esmerilada ; mientras que las proteínas de la interfase se someten a una segunda extracción siguiendo el mismo procedimiento , y la fase cloroformica de esta segunda extracción se mezcla con la procedente de la primera.

Las dos fracciones orgánicas procedentes de las dos extracciones se secan en corriente de N_2 . A continuación se añade 1 ml de cloroformo, y de esta disolución se toman las alícuotas para cromatografía.

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA PARA LIPIDOS NEUTROS

Material utilizado :

Silica Gel de Merck.

Matraz aforado de 500 ml.

Extensor Shandon Unoplan .

Placas de vidrio 20 x 20 cm.

Micropipetas de 100, μ l

Cubetas de cromatografía de 25 x 15 cm.

Cloroformo de Merck.

Benceno de Merck.

Iodo sublimado de Probus.

Preparación de las placas

Se usaron placas de vidrio de 20 x 20 cm, las cuales se sitúan en lotes de 5 sobre un extensor Shandon Unoplan, lavándose después con cloroformo.

Preparación de la papilla de silica - gel

A 50 gr. de silica Gel G de Merck se le agregan 100 ml. de agua destilada agitando vigorosamente durante 2 minutos, al cabo de los cuales se vierte el contenido integro sobre el extensor adaptado para obtener un espesor de capa de 400 micras.

Secado de las placas

Las muestras se aplican a 2 cm. del borde inferior de la placa, longitudinalmente y con una extensión no superior a 2,5 cm. Desde esta distancia se prefija un frente de 15 cm , haciendo un corte en la placa con ayuda de un punzón.

Desarrollo de la placa

El desarrollo de la placa se lleva a cabo en cubetas de vidrio de 25 x 15 cm con tapa esmerilada. El solvente cloroformo-benceno (60 : 40) Corominas , (1.970) , estuvo en la cubeta durante 18 horas como mínimo antes de introducir las placas . En el interior de la cámara se coloca un papel de filtro , con objeto de conseguir una total saturación.

Una vez alcanzado el frente prefijado se saca la placa y se seca con secador de aire al objeto de evitar el goteo y la

difusión posterior .

Revelado de la placa

Se sitúa Iodo sublimado en una cubeta en la que se introduce la placa. El Iodo se sublima fijándose a los dobles enlaces, apareciendo una mancha de tono marrón amarillento.

Se saca la placa de la cámara y se marcan las manchas con ayuda de un punzón, punteando alrededor de la mancha.

Inmediatamente después se colocan las placas en estufa durante unos minutos hasta la desaparición total del Iodo, visualizándose las manchas solamente por el punteo practicado sobre la silica.

Las distintas fracciones lipídicas aparecerán en la placa en el siguiente orden de arriba hacia abajo :

Ester colesterol Rf	0,77
Triglicéridos	0,58
Colesterol libre	0,21
Acidos grasos libres	0,06
Fosfolípidos	0,0

RECOGIDA Y CONTAJE DE LAS FRACCIONES

Reactivos utilizados :

2,2' -p- Fenilen bis (5 - Feniloxazol) POPOP de Merck.

2,5 Diphenyloxazol PPO de Merck.

Tolueno de Merck.

Una vez que el Iodo se ha sublimado, se procede al raspado de las fracciones lipídicas y posterior recogida sobre viales de centelleo.

A dichos viales se les añadió 10 ml de una disolución en tolueno PPO- POPOP (5 gr/ litro - 0'1 gr/ litro) y puestos a contar en un contador de centelleo líquido LKB Wallac 81000.

DETERMINACION DE DNA

Reactivos utilizados :

DNA de timo de ternera de la casa Merck.

Difenilamina de la casa Merck.

Cloroformo de la casa Merck.

Metanol de la casa Merck.

Acido Perclórico de la casa Merck.

Acido Acético glacial de la casa Merck.

Hidróxido sódico de la casa Merck.

Acetaldehido Analar.

Para la determinación de DNA se siguió el método de Bur
ton, (1.956) .

Preparación de la solución de trabajo

Se prepara unos momentos antes de usarla. Se añade por cada 20 ml de reactivo de difenilamina, 0,1 ml de disolución de acetaldehido.

Preparación reactivo de difenilamina

Se añade 1,5 grs. de difenilamina a 100 ml de acido acético glacial, agregando posteriormente 1,5 ml de SO_4H_2 concen
trado. (Se aconseja guardar la disolución una vez preparada en frasco de cristal opaco) .

Preparación de la disolución de acetaldehido

1 ml de acetaldehido Analar en 50 ml de agua destilada resultando una disolución de 16 mgr/ ml.

Preparación del standar de DNA

Se disuelve 40 mgr. de DNA de timo de ternera en 100 ml

de NaOH 5 milimolar, obteniéndose 100 ml de disolución madre de 0,4 gr/ml de DNA .

Se toman 5 ml de esta disolución, agregándole 5 ml de ácido perclórico al 5 % , llevándose a una digestión de 15 minutos a 80° C transcurrido este tiempo se lleva hasta un volumen de 20 ml con ácido perclórico al 5 % . La solución resultante contiene 100 mgr/ml de DNA Hidrolizado.

Para la preparación de las distintas concentraciones de patrón de DNA se toman las siguientes alícuotas :

0'25 ml	que contienen	25 mgr DNA
0'5 ml	que contienen	50 mgr DNA
1 ml	que contienen	100 mgr DNA
2 ml	que contienen	200 mgr DNA

Cada alícuota se enrasa hasta un volumen de 2 ml con ácido perclórico al 5 % añadiéndose a continuación 2 ml de la solución de trabajo.

Se agitan y se dejan en reposo toda una noche a temperatura ambiente, procediendo a su lectura a 600 nm , en un espectrofotómetro espectronic 710 .

Determinación de DNA en las muestras de tejido

Una alícuota del tejido adiposo, muscular, hepático y cardíaco se pesa y se introduce en su respectivo homogenizador.

Se añade 2'5 ml de la mezcla de extracción de lípidos cloroformo - metanol (2 : 1) , recogién~~do~~se al homogenizado en un tubo de 15 ml. de boca esmerilada . Se vuelve a lavar el homogenizador con 2'5 ml. y se vuelve a recoger en el tubo de 15 ml. de boca esmerilada.

A continuación se procede a la centrifugación (4000 xg) durante 5 minutos con objeto de precipitar las proteínas , los precipitados se vuelven a lavar con 2'5 ml de la mezcla de extracción lipídica, y una vez que han sido decantados se les agregan 2 ml de ácido perclórico al 5 %

Se digieren a continuación durante 15 minutos a 80° C. Terminada la digestión se centrifuga (2000 xg) durante cinco minutos.

A 1 ml del sobrenadante se agrega 2 ml de la solución de trabajo. Se dejan toda la noche a temperatura ambiente para proceder a su lectura a 600 n m. en un espectrofotómetro spectronic 710 .

METODO ESTADISTICO

EXPRESIONES GENERALES

Vamos a reseñar y explicar a continuación los modelos teóricos que se han usado para resolver las cuestiones planteadas, en un apartado posterior se explicaran como se han aplicado esos modelos teóricos a los casos concretos y un tercer y último apartado se llevará a cabo el estudio y la explicación de los resultados obtenidos.

ANALISIS DE LA VARIANZA PARA DOS FACTORES

Consideremos dos factores X e Y (o factor fila y factor column, respectivamente) cada uno de los cuales posee diferentes niveles o estados del factor.

Supongamos entonces que se desea comprobar la influencia de cada uno de estos factores en una variable de respuesta y se desea comprobar esa influencia de una forma individual de cada uno de los factores y en combinación.

Más concretamente al problema que da respuesta el análisis de la varianza para dos factores es el problema que plantea la exactitud o inexactitud de las tres hipótesis siguientes :

1ª Hipótesis .- El factor fila no tiene efecto sobre la varia

ble de respuesta. Es decir, la modificación del nivel dentro del factor fila no cambia la media de la población de respuesta.

2ª Hipótesis .- El factor columna no tiene efecto sobre la variable de respuesta. Es decir, la modificación del nivel dentro del factor columna no cambia la media de la población de respuesta.

3ª Hipótesis .- Los factores fila y columna no reaccionan entre sí. O sea, que el efecto, sobre la variable de respuesta, de modificar el nivel del factor fila es el mismo para cada nivel del factor columna, o viceversa.

Este problema se resuelve con el modelo que hemos llamado análisis de la varianza de dos factores que consiste, en último término, en el cálculo de unas determinadas cantidades que llamaremos F experimentales que compararemos con otras cantidades, obtenidas a un cierto nivel de confianza o error, y que llamaremos F teóricas y de su comparación aceptaremos o rechazaremos las hipótesis antes planteadas. Antes de proseguir, explicaremos detenidamente la nomenclatura que usaremos en este apartado.

Llamaremos casilla a un par formado por un nivel fijo del factor y un nivel fijo del factor columna (en cada casilla habrá un cierto número de observaciones correspondientes a esa

fila y a esa columna) . Supongamos que sean " m " en las observaciones en cada casilla.

Supongamos que el factor fila tiene r niveles distintos, o sea r filas, y que el factor columna posee c niveles diferentes, o sea c columnas. Llamaremos i al índice de la fila (o sea al índice del nivel del factor fila) .

Llamaremos j al índice de la columna individual de una casilla.

Llamaremos X_{ijk} a la K - ésima observación de la i - ésima fila y la j - ésima columna.

Llamaremos X_{ij} a la media de las observaciones en la casilla (i, j), es decir, en la fila i y la columna j.

Llamaremos $X_{i..}$ a la media de las observaciones de la i - ésima fila.

Llamaremos $X_{.j}$ a la media de las observaciones de la j - ésima columna.

Llamaremos \bar{X} a la media de todas las observaciones de todas las filas y todas las columnas.

Llamaremos T_{ij} a la suma de todas las observaciones de la casilla (i, j) es decir a todas las observaciones de la fila i columna j.

Llamaremos R_i a la suma de todas las observaciones de la fila i .

Llamaremos C_j a la suma de todas las observaciones de la columna j .

Llamaremos T a la suma de todas las observaciones correspondientes a todas las filas y todas las columnas.

Llamaremos $n = r.c.m.$ o sea al número total de observaciones.

Llamaremos L_R a la gran suma de cuadrados de las filas y que responde a la expresión :

$$L_R = r \sum_{i=1}^r R_i^2 - T^2$$

Llamaremos M_R a la gran media de cuadrados de las columnas y que responde a la expresión :

$$M_R = \frac{L_R}{r - 1}$$

o sea, la gran suma de cuadrados correspondientes a las filas dividida por el número de grados de libertad de las filas que es el número de filas menos 1.

Llamaremos L_C a la gran suma de cuadrados de las columnas y que responde a la expresión :

$$L_C = C \sum_{j=1}^C C_j^2 - T^2$$

Llamaremos M_C a la gran media de cuadrados de las columnas u que responderá por razones totalmente análogas a las filas a la expresión :

$$M_C = \frac{L_C}{C - 1}$$

Llamaremos L_I a la gran suma cuadrática de la interacción y que responderá a la fórmula :

$$L_I = rc \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^C T_{ij}^2 - r \sum_{i=1}^r R_i^2 - c \sum_{j=1}^C C_j^2 + T^2$$

Llamaremos M_I a la gran media cuadrática en la interacción y que como es lógico responderá a la fórmula :

$$M_I = \frac{L_I}{(p-1)(q-1)}$$

Llamaremos L_W a la gran suma cuadrática entre casillas y que responde a la expresión :

$$L_W = n \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \sum_{K=1}^m X_{ijk}^2$$

Llamaremos M_W a la gran media de cuadrados dentro de las casillas y que responde a la fórmula:

$$M_W = \frac{L_W}{rc(m-1)}$$

El primer paso para realizar el análisis de la varianza para dos factores es formar la tabla siguiente :

FUENTE	GRAN SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	GRAN MEDIA DE CUADRADOS	$F_{exp.}$
Filas	L_R	$r - 1$	M_R	$F_A = \frac{M_R}{M_W}$
Columnas	L_C	$c - 1$	M_C	$F_B = \frac{M_C}{M_W}$
Interacción	L_I	$(r - 1)(c - 1)$	M_I	$F_{AB} = \frac{M_I}{M_W}$

Una vez formada dicha tabla se comparan F_A ; F_B y F_{AB} con F_A teo. , F_B teo. , F_{AB} teo. , respectivamente y que se encuentran en las tablas de la distribución F de Snedecor a un error del 2 % y con los siguientes grados de libertad :

F_A teórico con (p-1) y r c (m-1) grados de libertad.

F_B teórico con (q-1) y r c (m-1) grados de libertad.

F_{AB} teórico con (p-1) (q-1) y r c (m-1) grados de libertad.

Las comparaciones se realizan de la siguiente manera :

1ª) Se compara F_A con F_A teórico , si $F_A > F_A$ teórico se rechaza la 1ª Hipótesis antes expuesta, es decir rechazamos el que las filas no tienen efectos sobre la variable de respuesta o sea se acepta que el factor fila sí tiene influencia sobre la variable de respuesta ; también se podría decir que entre los diferentes niveles del factor A existen diferencias significativas con respecto a la variable de respuesta.

En el caso de que $F_A \leq F_A$ teórico admitiremos la 1ª Hipótesis.

2ª) Se compara F_B con F_B teórico , de forma análoga al apartado anterior si $F_B > F_B$ teórico hemos de rechazar la 2ª Hipótesis o lo que es lo mismo hemos de afirmar que los diferentes niveles del factor columna presentan entre ellos diferencias significativas sobre la variable de respuesta. En el caso de que $F_B \leq F_B$ teo. admitiremos la 2ª hipótesis.

3ª) Se compara F_{AB} con F_{AB} teórico , análogamente al caso anterior si $F_{AB} > F_{AB}$ teórico habremos de rechazar la 3ª Hipótesis o lo que es lo mismo admitir que los factores fila y columna reaccionan entre sí, es decir que el efecto que se produce sobre la variable de respuesta al modificar el factor fila no es el mismo para cada nivel del factor columna. Si se verifica que $F_{AB} \leq F_{AB}$ teórica aceptaremos la 3ª hipótesis.

Por último, hay que hacer resaltar la importancia de esta tercera prueba si aceptamos la 3ª hipótesis o no, ya que si resulta que hemos de rechazar la 3ª hipótesis, o sea hemos de admitir que el efecto que se produce sobre la variable de respuesta al modificar el factor fila no es el mismo para cada nivel del factor columna, despues habremos de realizar un test de comparación de medias para cada uno de los factores filas y variando para cada uno de ellos el factor columna para ver donde residen

realmente las diferencias.

TEST PARA LA COMPARACION DE DOS MUESTRAS INDEPENDIENTES

Sea una muestra de n_1 valores de $X = (X_1, X_2, \dots, X_{n_1})$
y sea otra muestra de n_2 valores de $Y = (Y_1, Y_2, \dots, Y_{n_2})$.
Deseamos comprobar si el valor medio de la variable X es igual o
no al valor medio de la variable Y . Para ello se calcula :

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n_1} \quad S_X^2 = \frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n_1 - 1}$$
$$\bar{Y} = \frac{\sum Y_i}{n_2} \quad S_Y^2 = \frac{\sum (Y_i - \bar{Y})^2}{n_2 - 1}$$

donde se entiende que las \sum son sobre todos los valores de X o
de Y .

El primer paso sería ver si las varianzas de ambas variables
pueden considerarse homogéneas o no ; para ello se calcula
la cantidad :

$$F_{\text{exp}} = \frac{S_X^2}{S_Y^2} \quad (\text{en el numerador se pondrá la varianza mayor}) , \text{ ésta cantidad}$$

se compara con una $F_{\text{teórica}}$ que se busca en las tablas de Snedecor

con $(n_1 - 1, n_2 - 1)$ grados de libertad al α % de error.

Cuando $F_{\text{exp}} < F_{\text{teórica}}$ entonces, ambas varianzas pueden considerarse iguales (homogéneas) y entonces calcularemos :

$$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{X} - \bar{Y}}{S \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{siendo}$$

$$S^2 = \frac{(n_1 - 1) S_X^2 + (n_2 - 1) S_Y^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

La cantidad t_{exp} se compara con una $t_{\text{teórica}}$ buscada en la tabla 2 (tabla de Student) con $(n_1 + n_2 - 2)$ grados de libertad y con el error α deseado, entonces :

Si $t_{\text{exp}} > t_{\text{teórica}}$ las variables X e Y tienen medias distintas con un error del α %.

Si $t_{\text{exp}} \leq t_{\text{teórica}}$ las variables X e Y poseen iguales medias y estas no son significativamente distintas.

En el caso de que la $F_{\text{exp}} > F_{\text{teórica}}$ entonces ambas varianzas pueden considerarse distintas y el test que acabamos de formular para la media no nos vale ; por tanto habrá de calcularse ahora :

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\bar{X} - \bar{Y}|}{\frac{\frac{S_X^2}{n_1} + \frac{S_Y^2}{n_2}}$$

Ahora la cantidad t_{exp} se compara con una de las dos cantidades teóricas t_1 t_2 , obtenidas buscando al $\alpha\%$ de error en la tabla 2 con $(n_1 - 1)$ y $(n_2 - 1)$ grados de libertad respectivamente.

Finalmente la comparación se realiza así :

Si $t_{\text{exp}} < \text{mínimo} (t_1, t_2)$ entonces ambas medias, diremos son iguales.

Si $t_{\text{exp}} \geq \text{máximo} (t_1, t_2)$ entonces ambas medias son significativamente distintas con un error del $\alpha\%$.

Si la t_{exp} estuviera comprendida entre t_1 y t_2 se calcularía :

$$t_{\text{teórica}} = \frac{t_1 \frac{S_X^2}{n_1} + t_2 \frac{S_Y^2}{n_2}}{\frac{S_X^2}{n_1} + \frac{S_Y^2}{n_2}}$$

y entonces si $t_{\text{exp}} \leq t'_{\alpha}$ diremos que ambas medias son iguales.

Y si $t_{\text{exp}} > t'_{\alpha}$ diremos que ambas medias son distintas con un error del α %.

APLICACION DE LOS MODELOS TEORICOS ANTES EXPLICADOS AL CASO PARTICULAR

Disponiamos de un conjunto de observaciones de una cierta variable de respuesta (cantidad de una determinada fracción en un determinado tejido), realizadas en pollos recién nacidos. Estas observaciones se encontraban divididas en dos grupos : uno, el grupo de observaciones realizadas en pollos tratados con insulina (tratados) y otro el grupo de observaciones realizadas con pollos sin tratar con insulina (controles) . En cada uno de estos dos grupos se habian realizado observaciones para cada uno de los siguientes tejidos : Tejido Adiposo , Músculo , Hígado, Plasma y Corazón . Dentro de cada uno de estos tejidos se habian realizado observaciones para las siguientes fracciones : Colesterol Esterificado , Triglicéridos , Colesterol libre , FFA y Fosfolípidos ; dentro de cada una de estas fracciones se habían hecho observaciones a los tiempos : 10 m , 30 m , 60 m , y 120 m .

Entonces las pruebas que se proponían eran las siguientes :

1ª Prueba.

En cada uno de los tejidos estudiar las diferencias para cada una de las fracciones entre individuos controles y tratados en los diferentes tiempos ; y en su caso señalar en que tiempos concretos se producen esas diferencias.

2ª Prueba.

Dentro de los individuos controles, para cada una de las fracciones estudiar diferencias entre los diferentes tejidos en los diferentes tiempos ; y en su caso señalar en que tiempos concretos se establecían las diferencias.

Las dos pruebas se han resuelto de una forma análoga ; la primera parte de las pruebas se han resuelto con un estudio del tipo del análisis de la varianza que nos ha dado una orientación de si existían de una forma macroscópica, diferencias o no; esta prueba se ha realizado a los tiempos y con las fracciones y tejidos que se indican en las tablas. En los casos que no ha sido posible un análisis de la varianza se han realizado directamente comparaciones de medias entre muestras independientes.

En el caso de que en dicho análisis de la varianza hubiera

Resultado que existía una interacción entre los factores fila y columna, se realizaban una serie de contrastes de hipótesis para medias de muestras independientes que nos daban a que tiempos se producían esas diferencias significativas .

Los resultados se han dado siempre a los niveles de significación 5 % y 1 % .

Hemos de resaltar que en las pruebas de tests de comparación de medias no se reseña explícitamente cuando se ha debido realizar el test de Cochran , ya que hubiera sido duplicar la extensión de este informe , sino que se pone directamente en la tabla la $t_{teórica}$ a usar.

En todas las tablas van incluidas dos columnas en las que se refleja si existen diferencias significativas o no en la prueba planteada, esto se ha hecho con objeto de facilitar el uso de dichas tablas.

Hemos de resaltar también que en las pruebas de análisis de la varianza que se han realizado las hipótesis que nos interesaban eran las hipótesis referentes al factor fila y a la interacción y nunca al factor columna que siempre ha sido el tiempo.

RESULTADOS

TABLA 1.- Efecto de distintas dosis de insulina sobre los niveles de glucosa plasmática

DOSES INSULINA	0 UI/Kg pollo	0.375 UI/Kg pollo	0.75 UI/Kg pollo	1.5 UI/Kg pollo	6 UI/Kg pollo
mg de glucosa por 100 ml.	261	226	151	167	188
	281	154	142	158	123
	282	221	161	196	177
	271	177	180	181	173
	291	217	142	194	170
$\bar{X} \pm S.D.:$	$277,2 \pm 11.49$	199 ± 31.8	$155,25 \pm 15.9$	179.2 ± 16.6	166.2 ± 25.09

TABLA 2.- Efecto de la insulina sobre la glucosa plasmática a diversos tiempos desde su administración

(Los datos se expresan en mg. de glucosa por 100 ml).

(Al final de cada tiempo se expresan sus correspondientes $\bar{X} \pm SD$).

0 MINUTOS	10 MINUTOS		30 MINUTOS		60 MINUTOS		120 MINUTOS		180 MINUTOS	
	CONTROLES	TRATADOS	CONTROLES	TRATADOS	CONTROLES	TRATADOS	CONTROLES	TRATADOS	CONTROLES	TRATADOS
238	247	298	248	195	235	182	229	209	255	222
225	228	278	230	167	259	183	227	203	252	235
223	268	205	228	175	217	143	217	174	252	204
240	292	203	225	195	258	142	213	201	251	257
228	280	207	220	181	256	160	226	155	230	203
$230,80 \pm 7,27$	$263 \pm 25,67$	$238 \pm 46,02$	$230,2 \pm 10,63$	$182,6 \pm 12,36$	$245 \pm 18,5$	162 ± 2	$222,4 \pm 6,98$	$188,4 \pm 23,01$	$248 \pm 10,17$	$224,20 \pm 22,66$

Los pollitos controles son inyectados con 25 μ l de solución salina.

Los pollitos tratados son inyectados con 1'25 μ gr de Insulina equivalente a 0'75 UI/Kg pollo.

TABLA 3.- Valores de DNA

(Los valores se expresan en $\mu\text{gDNA}/\text{gr.tejido}$ ($\bar{X} \pm \text{SD}$) Numero de determinaciones:4)

TIEMPO	TEJIDO	ADIPOSO	MUSCULAR	HEPATICO	CARDIACO
10 MINUTOS	CONTROLES	289,61 \pm 43,65	1761,42 \pm 75,98	1990,49 \pm 131,52	2377,60 \pm 127,45
	TRATADOS	339,59 \pm 25,33	1685,04 \pm 81,72	2093,85 \pm 213,46	2372,86 \pm 55,97
30 MINUTOS	CONTROLES	328,11 \pm 14,36	1963,02 \pm 63,82	2238,77 \pm 168	2371,29 \pm 198,80
	TRATADOS	319,48 \pm 29,67	1945,12 \pm 229,74	2164,34 \pm 121,67	2495,88 \pm 224,32
60 MINUTOS	CONTROLES	316,73 \pm 24,63	1913,33 \pm 88,20	2265,15 \pm 135,12	2405,22 \pm 63,45
	TRATADOS	309,63 \pm 19,25	1844,71 \pm 96,87	2052,44 \pm 153,16	2363,78 \pm 94,30
120 MINUTOS	CONTROLES	333,64 \pm 8,37	1964,43 \pm 162,38	2214,94 \pm 67,68	2353,01 \pm 117,81
	TRATADOS	311,97 \pm 26,15	1930,67 \pm 128,93	2243,95 \pm 109,95	2363,61 \pm 100,01

TABLA 4.- Valores de incorporación de Glucosa U ¹⁴C a TRIGLICERIDOS

(Los resultados se expresan como $\bar{X} \pm$ S.D. N° de determinaciones : 4)

POLLOS	TEJIDO	10 MINUTOS	30 MINUTOS	60 MINUTOS	120 MINUTOS
		DPM/100 μ g.DNA	DPM/100 μ g.DNA	DPM/100 μ g.DNA	DPM/100 μ g.DNA
CONTROLES	Adiposo	-	-	271 \pm 64,09	347 \pm 41,80
	Muscular	-	34,5 \pm 4,43	50 \pm 5,35	133 \pm 25,0
	Hepatico	259 \pm 61,74	1.633 \pm 155,90	1.579 \pm 170,33	342 \pm 30,6
	Cardiaco	126 \pm 16,97	77 \pm 10,68	68 \pm 10,50	97 \pm 20,7
	Plasma	-	2.970 \pm 98,30	1.504 \pm 174,02	1.147 \pm 123,5
INSULINA	Adiposo	-	-	508 \pm 54,60	507 \pm 124,70
	Muscular	-	109 \pm 17,33	160 \pm 19,50	232 \pm 32,30
	Hepatico	244 \pm 77,03	2.199 \pm 183,40	3.280 \pm 89,50	1.198 \pm 202,00
	Cardiaco	120 \pm 32,35	127 \pm 6,94	306 \pm 39,35	187 \pm 36,20
	Plasma	-	3.832 \pm 16,41	2.975 \pm 245,30	1.389 \pm 138,30

Por necesidad de tabulación se ha encuadrado el plasma debajo del resto de los tejidos, expresandose sus valores en DPM/ml.

TABLA 5.- Valores de incorporación de Glucosa U ¹⁴C a ACIDOS GRASOS LIBRES

(Los resultados se expresan como $\bar{X} \pm S.D.$ N° de determinaciones : 4)

		10 MINUTOS	30 MINUTOS	60 MINUTOS	120 MINUTOS
POLLOS	TEJIDO	DPM/100 μ g.DNA	DPM/100 μ g.DNA	DPM/100 μ g.DNA	DPM/100 μ g.DNA
CONTROLES	Adiposo	-	-	-	-
	Muscular	44 \pm 7,67	89 \pm 10,03	34 \pm 7,50	89 \pm 13,47
	Hepático	76,3 \pm 6,18	300 \pm 48,13	181 \pm 32,13	86 \pm 11,32
	Cardiaco	97 \pm 9,96	132 \pm 84,57	70 \pm 11,91	82 \pm 15,26
	Plasma	-	1340 \pm 107,53	711 \pm 163,98	600 \pm 143,24
INSULINA	Adiposo	-	-	-	-
	Muscular	42 \pm 6,65	119,3 \pm 28,3	257 \pm 39,20	142 \pm 28,90
	Hepático	78 \pm 12,36	279 \pm 57,6	217 \pm 39,00	109 \pm 34,90
	Cardiaco	102 \pm 13,90	324 \pm 47,00	860 \pm 86,60	153 \pm 37,60
	Plasma	-	2.104 \pm 156,60	996 \pm 129,50	561 \pm 83,90

Por necesidad de tabulación se ha encuadrado el plasma debajo del resto de los tejidos, expresandose sus valores en DPM/ml.

TABLA 6.- Valores de incorporación de Glucosa U¹⁴ - C a COLESTEROL LIBRE

(Los resultados se expresan como $\bar{X} \pm$ S.D. N° de determinaciones : 4)

		10 MINUTOS	30 MINUTOS	60 MINUTOS	120 MINUTOS
POLLOS	TEJIDO	DPM/100 μ g.DNA	DPM/100 μ g.DNA	DPM/100 μ g.DNA	DPM/100 μ g.DNA
CONTROLES	Adiposo	-	-	-	-
	Muscular	-	-	-	-
	Hepatico	-	79 \pm 6,13	63 \pm 8,34	-
	Cardiaco	-	-	-	-
	Plasma	-	-	-	-
INSULINA	Adiposo	-	-	-	-
	Muscular	-	-	-	-
	Hepatico	-	82 \pm 13,8	65 \pm 11,58	-
	Cardiaco	-	-	-	-
	Plasma	-	-	-	-

Por necesidad de tabulación se ha encuadrado el plasma debajo del resto de los tejidos, expresándose sus valores en DPM/ml.

TABLA 7.- Valores de incorporación de Glucosa U ¹⁴C a COLESTEROL ESTERIFICADO

(Los resultados se expresan como $\bar{X} \pm$ S.D. N° de determinaciones : 4)

POLLOS	TEJIDO	10 MINUTOS	30 MINUTOS	60 MINUTOS	120 MINUTOS
		DPM/100 μ S.DNA	DPM/100 μ S.DNA	DPM/100 μ S.DNA	DPM/100 μ S.DNA
CONTROLES	Adiposo	-	-	-	-
	Muscular	-	-	-	-
	Hepatico	-	100 \pm 14,11	54 \pm 11,70	-
	Cardiaco	-	-	-	-
	Plasma	-	-	-	-
INSULINA	Adiposo	-	-	-	-
	Muscular	-	-	-	-
	Hepatico	-	117 \pm 11,58	103 \pm 19,40	103 \pm 6,70
	Cardiaco	-	-	-	-
	Plasma	-	-	621 \pm 72,04	709 \pm 29,7

Por necesidad de tabulación se ha encuadrado el plasma debajo del resto de los tejidos, expresandose sus valores en DPM/ml.

TABLA 8.- Valores de incorporación de Glucosa U ^{14}C a FOSFOLIPIDOS

(Los resultados se expresan como $\bar{X} \pm \text{S.D.}$ N° de determinaciones : 4)

		10 MINUTOS	30 MINUTOS	60 MINUTOS	120 MINUTOS
POLLOS	TEJIDO	DPM/100 $\mu\text{g.DNA}$	DPM/100 $\mu\text{g.DNA}$	DPM/100 $\mu\text{g.DNA}$	DPM/100 $\mu\text{g.DNA}$
CONTROLES	Adiposo	-	-	-	-
	Muscular	32 \pm 5,12	71 \pm 8,84	68 \pm 21,2	190 \pm 28,9
	Hepatico	151 \pm 8,22	521 \pm 23,18	749 \pm 63,8	503 \pm 67,5
	Cardiaco	95 \pm 13,02	157 \pm 8,34	202 \pm 55,2	220 \pm 33,1
	Plasma	606 \pm 79,29	1.101 \pm 88,5	816 \pm 98,82	1.950 \pm 546,3
INSULINA	Adiposo	-	-	-	-
	Muscular	38 \pm 10,81	122 \pm 12,90	104 \pm 12,12	213 \pm 59,10
	Hepatico	156 \pm 43,56	710 \pm 22,68	911 \pm 59,94	833 \pm 76,60
	Cardiaco	91 \pm 10,40	122 \pm 12,90	104 \pm 12,12	213 \pm 59,1
	Plasma	602 \pm 20,02	1.308 \pm 132,00	1.030 \pm 181,57	1.141 \pm 275,4

Por necesidad de tabulación se ha encuadrado el plasma debajo del resto de los tejidos, expresandose sus valores en DPM/ml.

TRATAMIENTO ESTADISTICO

DE LOS

RESULTADOS

PRIMERA PRUEBA

I PARTE : ANALISIS DE LA VARIANZA

Nota.- No se ha realizado el análisis de la varianza entre los individuos controles y tratados del tejido ADIPOSEO así como en determinadas fracciones de otros tejidos, por la anulación anterior parcial o total de los datos correspondientes a la incorporación de Glucosa U ¹⁴C al mencionado tejido y a esas determinadas fracciones.

Resultados del análisis de la varianza entre individuos controles y tratados,
 en las fracciones y tiempos abajo reseñados para MÚSCULO.

FRACCION	FUENTE DE VARIACION	GRAN SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	GRAN MEDIA DE CUADRADOS	F _{exp.}	F teórica		SIGNIFICACION	
						5 %	1 %	5 %	1 %
Triglicéridos (30, 60 y 120 m.)	Entre Filas	53.487,04	1	53.487,04	133,72	4,41	8,29	SI	SI
	Entre Columnas	51.702,58	2	25.851,29	64,63	3,55	6,01	SI	SI
	Interacción	1.305,58	2	652,79	1,63	3,55	6,01	NO	NO
Acidos Grasos Libres (10,30,60 y 120 m.)	Entre Filas	45.075,03	1	45.075,03	115,56	4,26	7,82	SI	SI
	Entre Columnas	44.854,34	3	14.951,45	38,33	3,01	4,72	SI	SI
	Interacción	61.284,10	3	20.428,03	52,37	3,01	4,72	SI	SI
Fosfolípidos (10,30,60 y 120 m.)	Entre Filas	6.844,50	1	6.844,50	10,30	4,26	7,82	SI	SI
	Entre Columnas	117.775,13	3	39.258,38	59,08	3,01	4,72	SI	SI
	Interacción	2.184,25	3	728,08	1,10	3,01	4,72	NO	NO

Resultados del análisis de la varianza entre individuos controles y tratados, en las fracciones y tiempos abajo reseñados para HIGADO.

FRACCION	FUENTE DE VARIACION	GRAN SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	GRAN MEDIA DE CUADRADOS	F _{exp.}	F _{teórica}		SIGNIFICACION	
						5 %	1 %	5 %	1 %
Colesterol Esterificado (30 y 60 m.)	Entre Filas	4.455,56	1	4.455,56	21,04	4,75	9,33	SI	SI
	Entre Columnas	3.690,56	1	3.690,56	17,42	4,75	9,33	SI	SI
	Interacción	1.040,06	1	1.040,06	4,91	4,75	9,33	SI	NO
Triglicéridos (10,30,60 y 120m.)	Entre Filas	4.826.724,50	1	4.826.724,50	263,64	4,26	7,82	SI	SI
	Entre Columnas	24.237.817,62	3	8.079.272,54	441,30	3,01	4,72	SI	SI
	Interacción	3.064.449,25	3	1.021.483,08	55,80	3,01	4,72	SI	SI
Colesterol Libre (30 y 60 m.)	Entre Filas	27,56	1	27,56	0,26	4,75	9,33	NO	NO
	Entre Columnas	1.105,56	1	1.105,56	10,30	4,75	9,33	SI	SI
	Interacción	0,063	1	0,063	0,001	4,75	9,33	NO	NO
Acidos Grasos Libres (10,30,60 y 120m.)	Entre Filas	840,50	1	840,50	0,84	4,26	7,82	NO	NO
	Entre Columnas	231.192,00	3	77.064,00	77,18	3,01	4,72	SI	SI
	Interacción	3.740,00	3	1.246,67	1,25	3,01	4,72	NO	NO
Fosfolípidos (10,30,60 y 120 m.)	Entre Filas	235.641,13	1	235.641,13	89,31	4,26	7,82	SI	SI
	Entre Columnas	2.018.495,00	3	672.831,67	255,02	3,01	4,72	SI	SI
	Interacción	106.517,38	3	35.505,79	13,46	3,01	4,72	SI	SI

Resultados del análisis de la varianza entre individuos controles y tratados,
en las fracciones y tiempos abajo reseñados para CORAZON.

FRACCION	FUENTE DE VARIACION	GRAN DE SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	GRAN MEDIA DE CUADRADOS	F ^{exp.}	F ^{teórica}		SIGNIFICACION	
						5 %	1 %	5 %	1 %
Trigliceridos (10,30,60 y 120 m.)	Entre Filas	69.006,13	1	69.006,13	112,86	4,26	7,82	SI	SI
	Entre Columnas	31.040,25	3	10.346,75	16,92	3,01	4,72	SI	SI
	Interacción	65.704,63	3	21.904,88	35,83	3,01	4,72	SI	SI
Acidos Grasos Libres (10,30,60 y 120m.)	Entre Filas	676.575,28	1	676.575,28	250,16	4,26	7,82	SI	SI
	Entre Columnas	883.342,84	3	294.447,62	108,87	3,01	4,72	SI	SI
	Interacción	720.476,84	3	240.158,95	88,80	3,01	4,72	SI	SI
Fosfolípidos (10,30,60 y 120 m.)	Entre Filas	2.000,28	1	2.000,28	3,06	4,26	7,82	NO	NO
	Entre Columnas	81.829,84	3	27.276,62	41,76	3,01	4,72	SI	SI
	Interacción	3.470,59	3	1.156,87	1,78	3,01	4,72	NO	NO

Resultados del análisis de la varianza entre individuos controles y tratados en las fracciones y tiempos abajo reseñados para PLASMA .

FRACCION	FUENTE DE VARIACION	GRAN SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	GRAN MEDIA DE CUADRADOS	F _{exp.}	F _{teórica}		SIGNIFICACION	
						5 %	1 %	5 %	1 %
Triglicéridos (30,60 y 120 m.)	Entre Filas	4.419.558,37	1	4.419.558,37	164,17	4,41	8,29	SI	SI
	Entre Columnas	18.231.771,58	2	9.115.885,79	338,62	3,55	6,01	SI	SI
	Interacción	1.509.260,25	2	754.630,13	28,03	3,55	6,01	SI	SI
Acidos Grasos Libres (30,60, y 120 m.)	Entre Filas	680.403,38	1	680.403,38	38,05	4,41	8,29	SI	SI
	Entre Columnas	5.680.896,75	2	2.840.448,38	158,84	3,55	6,01	SI	SI
	Interacción	653.244,75	2	326.622,38	18,27	3,55	6,01	SI	SI
Fosfolípidos (10,30,60 y 120 m.)	Entre Filas	76.440,50	1	76.440,50	1,36	4,26	7,82	NO	NO
	Entre Columnas	3.861.078,00	3	1.278.026,00	22,94	3,01	4,72	SI	SI
	Interacción	1.409.077,50	3	469.692,50	8,37	3,01	4,72	SI	SI

PRIMERA PRUEBA

II PARTE : COMPARACION DE MEDIAS

Nota.- No se ha realizado la comparación de medias entre individuos controles y tratados en diversas fracciones de distintos tejidos así como en determinados tiempos de trabajo, por la anulación anterior parcial o total de los datos correspondientes a la incorporación de Glucosa U ¹⁴C a tales fracciones y tiempos de trabajo.

Resultados de la comparación de medias entre individuos controles y tratados, en las fracciones y tiempos abajo reseñados para T. ADIPOSEO.

FRACCION	TIEMPO	t _{exp.}	t teórica		SIGNIFICACION	
			5 %	1 %	5 %	1 %
Trigliceridos	60 m.	7,53	2,45	3,70	SI	SI
	120 m.	2,33	2,45	3,70	NO	NO

Resultados de la comparación de medias entre los individuos controles y tratados, en las fracciones y tiempos abajo reseñados para MUSCULO.

FRACCION	TIEMPO	$t_{exp.}$	$t_{teórica}$		SIGNIFICACION	
			5 %	1 %	5 %	1 %
Trigliceridos	30 m.	8,33	3,18	5,84	SI	SI
	60 m.	10,86	3,18	5,84	SI	SI
	120 m.	4,84	2,45	3,70	SI	SI
Acidos	10 m.	0,40	2,45	3,70	NO	NO
Grasos	30 m.	2,67	2,45	3,70	SI	NO
Libres	60 m.	11,19	3,18	5,84	SI	SI
	120 m.	3,27	3,18	5,84	SI	NO
Fosfolípidos	10 m.	1,00	2,45	3,70	NO	NO
	30 m.	6,49	2,45	3,70	SI	SI
	60 m.	3,01	2,45	3,70	SI	NO
	120 m.	0,71	2,45	3,70	NO	NO

Resultados de la comparación de medias entre los individuos controles y tratados, en las fracciones y tiempos abajo reseñados para HIGADO.

FRACCION	TIEMPO	t _{exp.}	t _{teórica}		SIGNIFICACION	
			5 %	1 %	5 %	1 %
Colesterol Esterificado	30 m.	1,89	2,45	3,70	NO	NO
	60 m.	4,37	2,45	3,70	SI	SI
Trigliceridos	10 m.	0,31	2,45	3,70	NO	NO
	30 m.	4,70	2,45	3,70	SI	SI
	60 m.	17,69	2,45	3,70	SI	SI
	120 m.	8,37	3,18	5,84	SI	SI
Colesterol Libre	30 m.	0,37	2,45	3,70	NO	NO
	60 m.	0,35	2,45	3,70	NO	NO
Acidos Grasos Libres	10 m.	0,33	2,45	3,70	NO	NO
	30 m.	0,67	2,45	3,70	NO	NO
	60 m.	1,44	2,45	3,70	NO	NO
	120 m.	1,27	2,45	3,70	NO	NO
Fosfolipidos	10 m.	0,23	3,18	5,84	NO	NO
	30 m.	11,68	2,45	3,70	SI	SI
	60 m.	3,61	2,45	3,70	SI	NO
	120 m.	6,47	2,45	3,70	SI	SI

Resultados de la comparación de medias entre los individuos controles y tratados, en las fracciones y tiempos abajo reseñados para CORAZON .

FRACCION	TIEMPO	$t_{exp.}$	$t_{teórica}$		SIGNIFICACION	
			5 %	1 %	5 %	1 %
Trigliceridos	10 m.	0,36	2,45	3,70	NO	NO
	30 m.	7,85	2,45	3,70	SI	SI
	60 m.	11,70	3,18	5,84	SI	SI
	120 m.	4,31	2,45	3,70	SI	SI
Acidos Grasos Libres	10 m.	0,80	2,45	3,70	NO	NO
	30 m.	15,98	2,45	3,70	SI	SI
	60 m.	18,08	3,18	5,84	SI	SI
	120 m.	3,51	2,45	3,70	SI	NO
Fosfolípidos	10 m.	0,51	2,45	3,70	NO	NO
	30 m.	7,48	2,45	3,70	SI	SI
	60 m.	0,95	3,18	5,84	NO	NO
	120 m.	0,26	3,18	5,84	NO	NO

Resultados de la comparación de medias entre los individuos controles y tratados, en las fracciones y tiempos abajo reseñados para PLASMA .

FRACCION	TIEMPO	$t_{exp.}$	$t_{teórica}$		SIGNIFICACION	
			5 %	1 %	5 %	1 %
Trigliceridos	30 m.	9,00	2,45	3,70	SI	SI
	60 m.	9,78	2,45	3,70	SI	SI
	120 m.	2,61	2,45	3,70	SI	NO
Acidos Grasos Libres	30 m.	8,07	2,45	3,70	SI	SI
	60 m.	2,73	2,45	3,70	SI	NO
	120 m.	0,47	2,45	3,70	NO	NO
Fosfolípidos	10 m.	0,11	3,18	5,84	NO	NO
	30 m.	2,61	2,45	3,70	SI	NO
	60 m.	2,08	2,45	3,70	NO	NO
	120 m.	0,47	2,45	3,70	NO	NO

SEGUNDA PRUEBA

I PARTE : ANALISIS DE LA VARIANZA

Nota.- No se ha realizado el análisis de la varianza entre los individuos controles en diversas fracciones y tejidos, por la anulación anterior parcial o total de los datos correspondientes a la incorporación de Glucosa U ¹⁴C a tales fracciones y tiempos de trabajo.

Resultados del análisis de la varianza entre los individuos controles, en las fracciones y tiempos bajo reseñados para MUSCULO, HIGADO Y CORAZON .

FRACCIÓN	FUENTE DE VARIACION	GRAN SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	GRAN MEDIA DE CUADRADOS	F _{exp.}	F _{teórica}		SIGNIFICACION	
						5 %	1 %	5 %	1 %
Acidos Grasos Libres (10, 30, 60 y 120 m.)	Entre Filas	132.707,79	2	66.353,90	130,35	3,32	5,39	SI	SI
	Entre Columnas	116.900,06	3	38.966,69	76,55	2,92	4,51	SI	SI
	Interacción	544.009,38	6	90.668,23	178,11	2,42	3,47	SI	SI
Fosfolípidos (10, 30, 60 y 120 m.)	Entre Filas	1.366.877,17	2	683.438,58	574,03	3,32	5,39	SI	SI
	Entre Columnas	427.573,23	3	142.524,41	114,08	2,92	4,51	SI	SI
	Interacción	395.815,83	6	65.969,31	52,80	2,42	3,47	SI	SI

SEGUNDA PRUEBA

II PARTE : COMPARACION DE MEDIAS

Nota.- No se ha realizado la comparación de medias entre los individuos controles en las fracciones COLESTEROL LIBRE Y ESTERIFICADO, así como en determinados tiempos de trabajo de otras fracciones, por la anulación anterior parcial o total de los datos correspondientes a la incorporación de Glucosa U ¹⁴C a tales fracciones y tiempos de trabajo.

Resultados de la comparación de medias entre los individuos controles,
en los tejidos y tiempos abajo reseñados para la fracción TRIGLICERIDOS.

TEJIDOS	TIEMPO	$t_{exp.}$	$t_{teórica}$		SIGNIFICACION	
			5 %	1 %	5 %	1 %
Adiposo y Musculo	60 m.	6,86	3,18	5,84	SI	SI
	120 m.	8,79	2,45	3,70	SI	SI
Adiposo e Higado	60 m.	14,38	3,18	5,84	SI	SI
	120 m.	0,16	2,45	3,70	NO	NO
Adiposo y Corazón	60 m.	6,25	3,18	5,84	SI	SI
	120 m.	10,73	2,45	3,70	SI	SI
Musculo e Higado	30 m.	20,50	3,18	5,84	SI	SI
	60 m.	17,95	3,18	5,84	SI	SI
	120 m.	10,62	2,45	3,70	SI	SI
Musculo y Corazón	30 m.	7,39	2,45	3,70	SI	NO
	60 m.	2,97	2,45	3,70	SI	NO
	120 m.	2,23	2,45	3,70	NO	NO
Higado y Corazón	10 m.	4,14	3,18	5,84	SI	NO
	30 m.	19,92	3,18	5,84	SI	SI
	60 m.	17,72	3,18	5,84	SI	SI
	120 m.	17,72	3,18	5,84	SI	SI

Resultados de la comparación de medias entre los individuos controles,
 en los tejidos y tiempos abajo reseñados para la fracción ACIDOS GRASOS LIBRES.

TEJIDOS	TIEMPO	$t_{exp.}$	$t_{teórica}$		SIGNIFICACION	
			5 %	1 %	5 %	1 %
Musculo e Higado	10 m.	6,59	2,45	3,70	SI	SI
	30 m.	8,57	3,18	5,84	SI	SI
	60 m.	8,91	3,18	5,84	SI	SI
Musculo y Corazón	120 m.	0,43	2,45	3,70	NO	NO
	10 m.	23,52	3,18	5,84	SI	SI
	30 m.	0,52	2,45	3,70	NO	NO
	60 m.	5,08	2,45	3,70	SI	SI
Higado y Corazón	120 m.	0,76	2,45	3,70	NO	NO
	10 m.	21,99	3,18	5,84	SI	SI
	30 m.	7,89	2,45	3,70	SI	SI
	60 m.	6,49	2,45	3,70	SI	SI
Corazón	120 m.	0,26	2,45	3,70	NO	NO

Resultados de la comparación de medias entre los individuos controles,
 en los tejidos y tiempos abajo reseñados para la fracción FOSFOLIPIDOS.

TEJIDOS	TIEMPO	$t_{exp.}$	$t_{teórica}$		SIGNIFICACION	
			5 %	1 %	5 %	1 %
Musculo e Higado	10 m.	24,67	2,45	3,70	SI	SI
	30 m.	36,20	3,18	5,84	SI	SI
	60 m.	20,24	3,18	5,84	SI	SI
	120 m.	8,55	2,45	3,70	SI	SI
Musculo y Corazón	10 m.	9,11	2,45	3,70	SI	SI
	30 m.	14,18	2,45	3,70	SI	SI
	60 m.	4,54	2,45	3,70	SI	SI
	120 m.	1,38	2,45	3,70	NO	NO
Higado y Corazón	10 m.	7,24	2,45	3,70	SI	SI
	30 m.	29,46	2,45	3,70	SI	SI
	60 m.	12,95	2,45	3,70	SI	SI
	120 m.	7,55	2,45	3,70	SI	SI

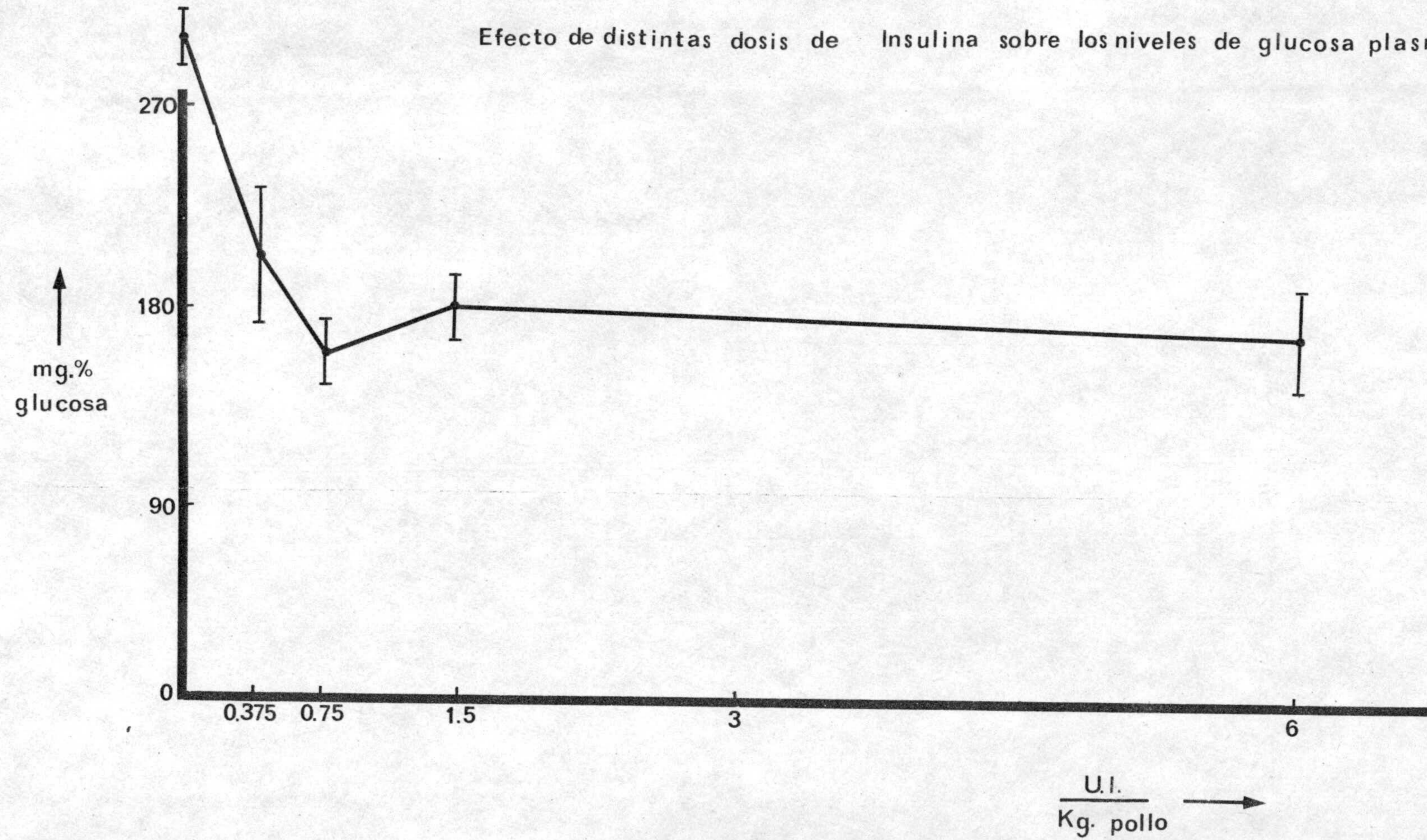
GRÁFICAS

Nota.- Los niveles de significación en las siguientes gráficas, vienen expresados del siguiente modo:

* $P < 0.05$
** $P < 0.01$

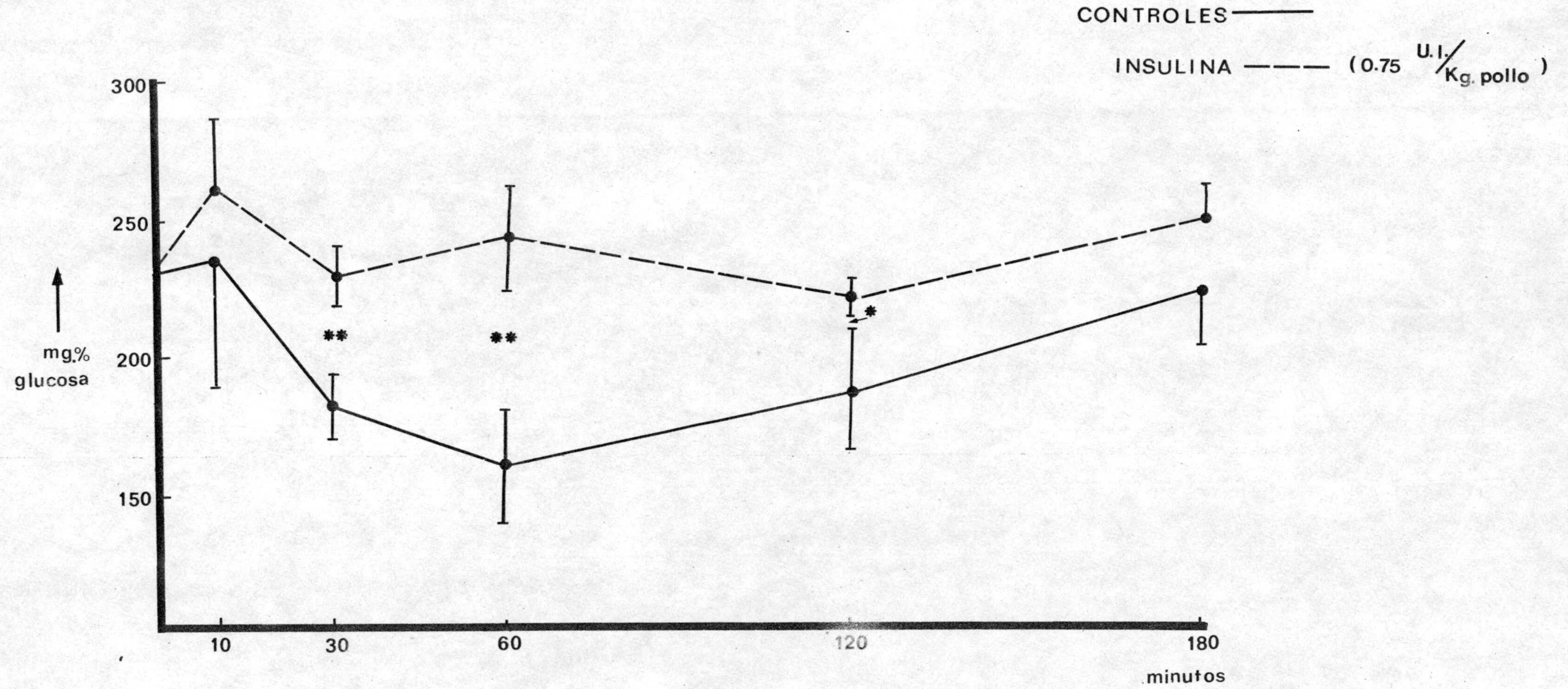
GRAFICA 1

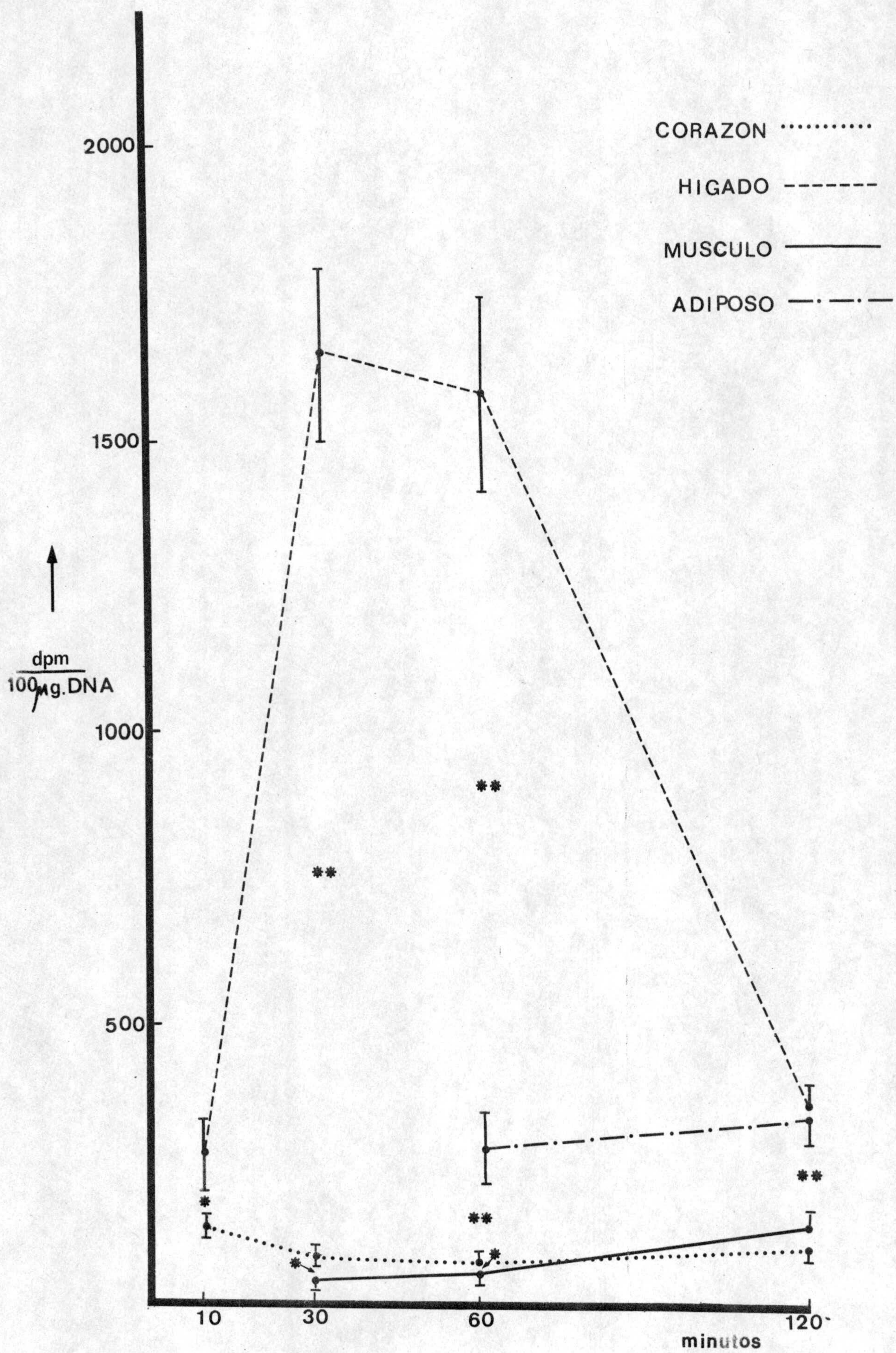
Efecto de distintas dosis de Insulina sobre los niveles de glucosa plasmática



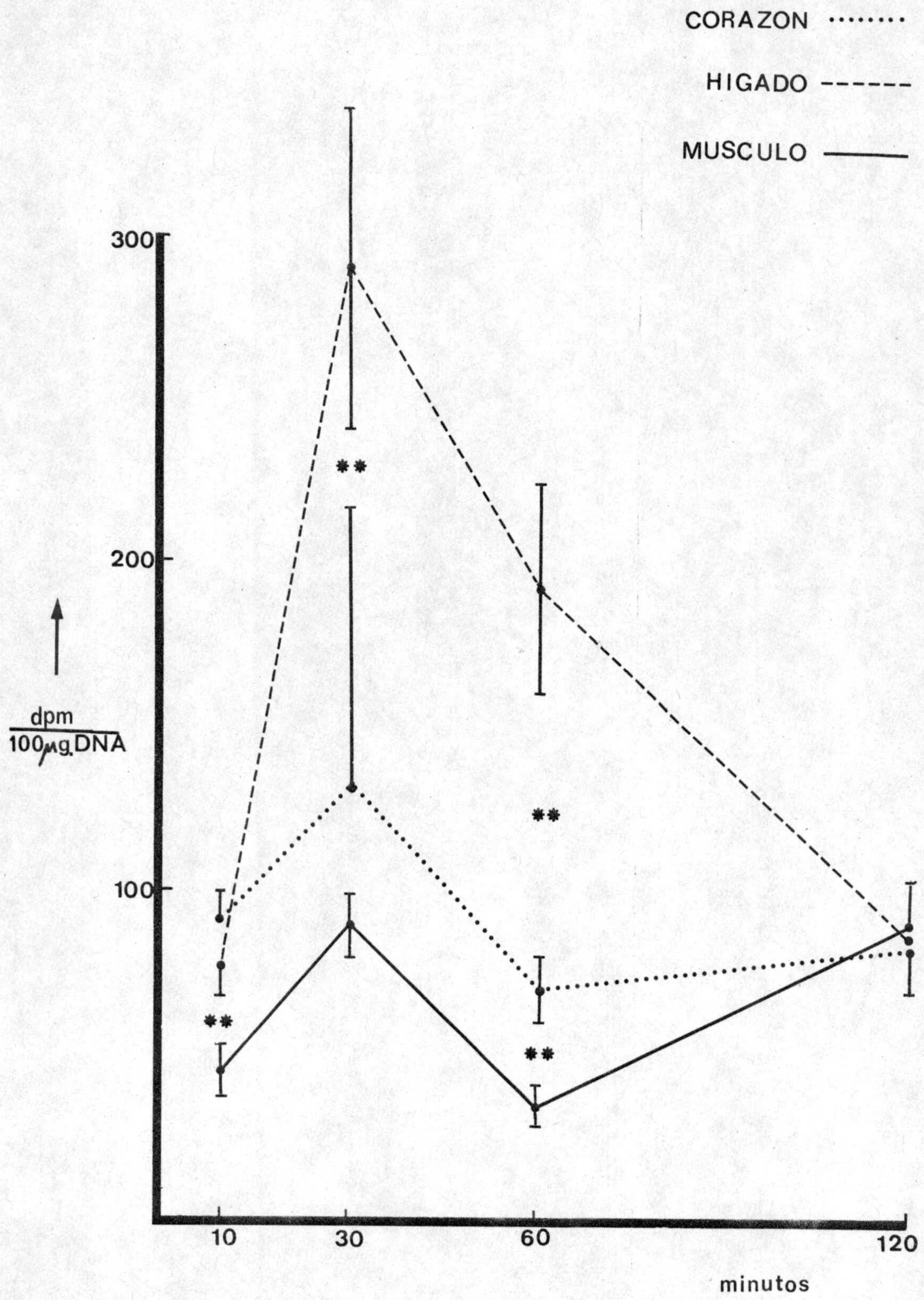
GRAFICA 2

Efecto de la Insulina sobre la glucosa plasmática a diversos tiempos desde su administración

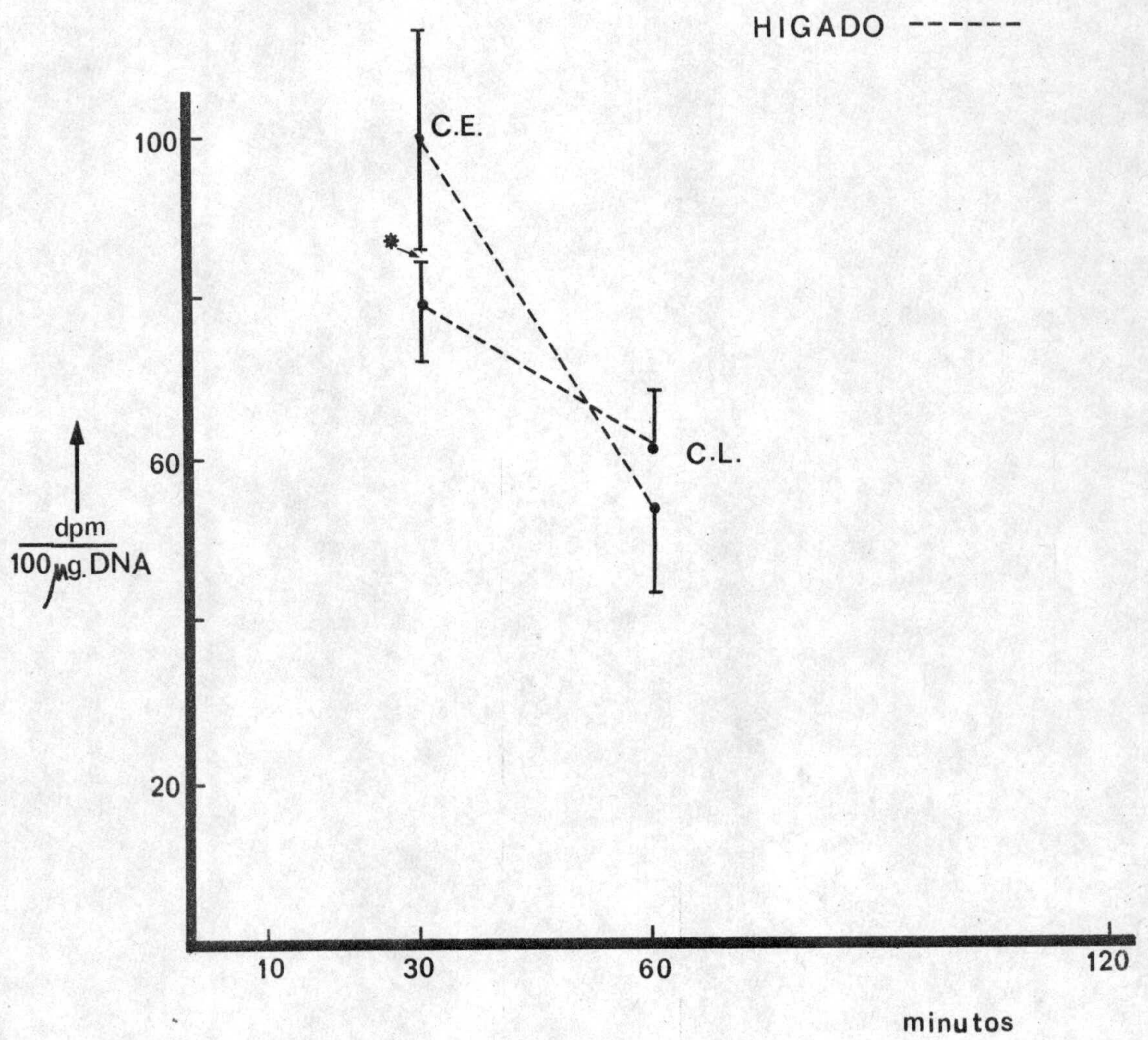




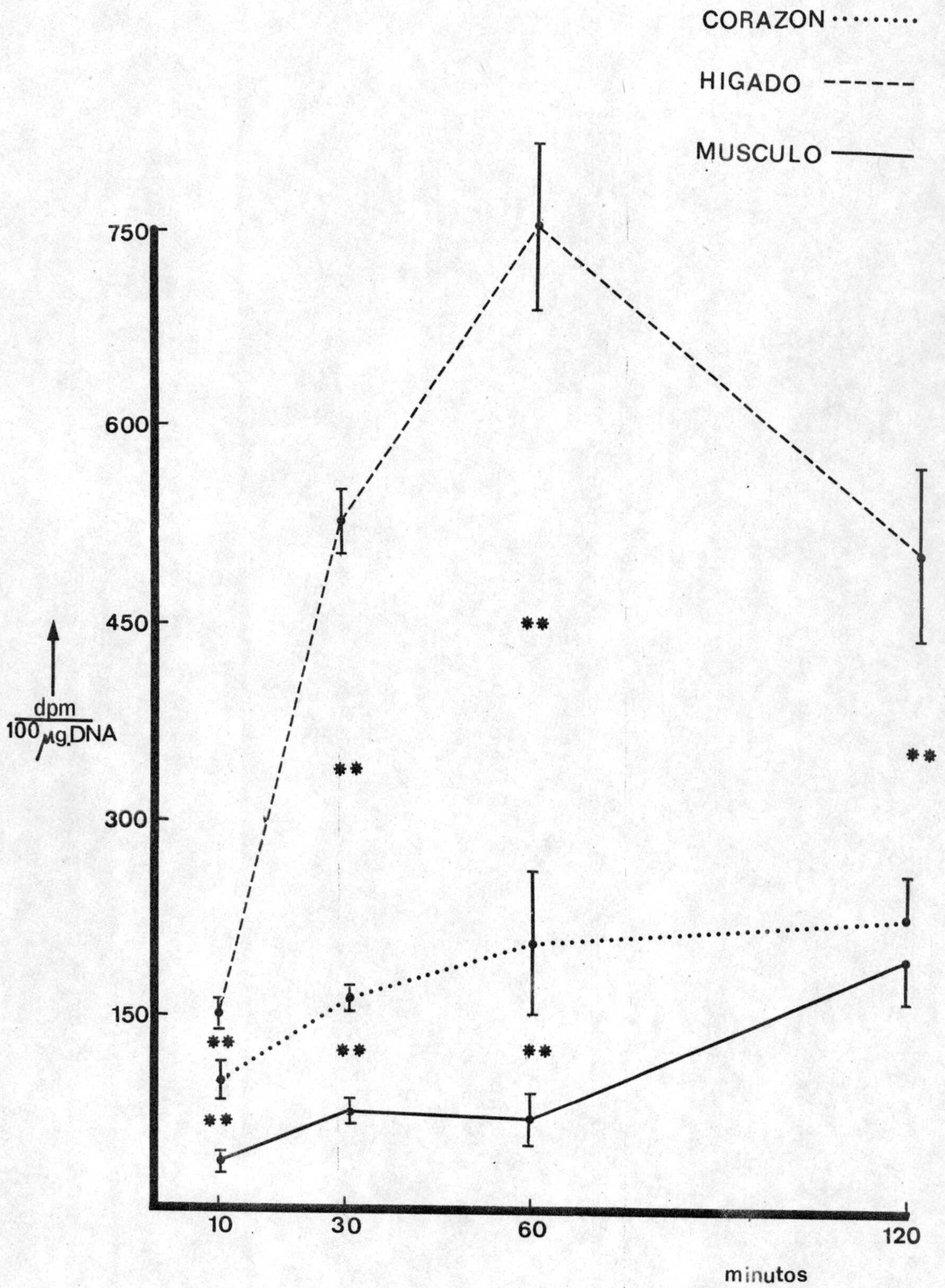
GRAFICA 3.- Incorporación de Glucosa U-¹⁴C a TRIGLICERIDOS



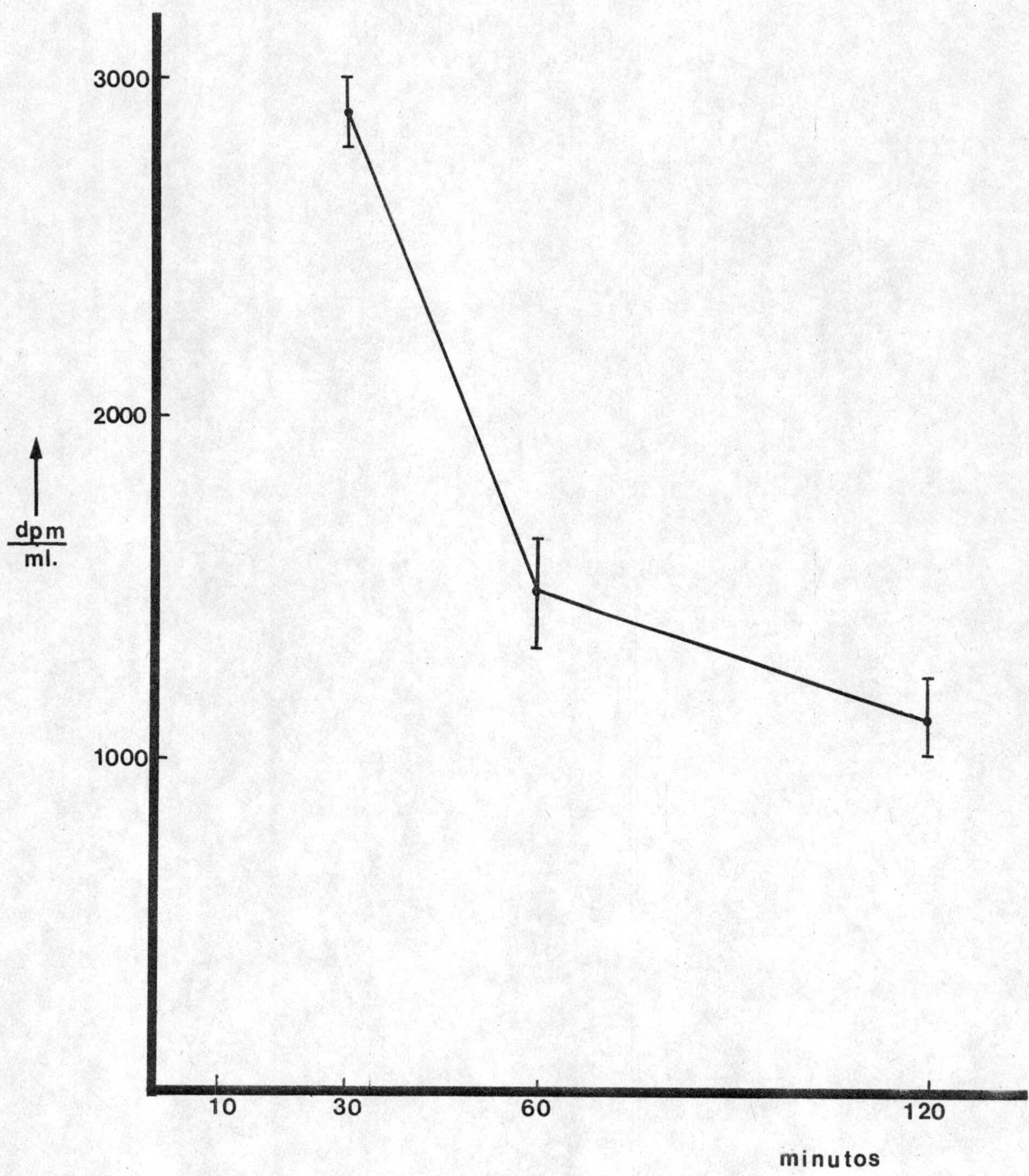
GRAFICA 4.-Incorporación de Glucosa U-¹⁴C a ACIDOS GRASOS LIBRES



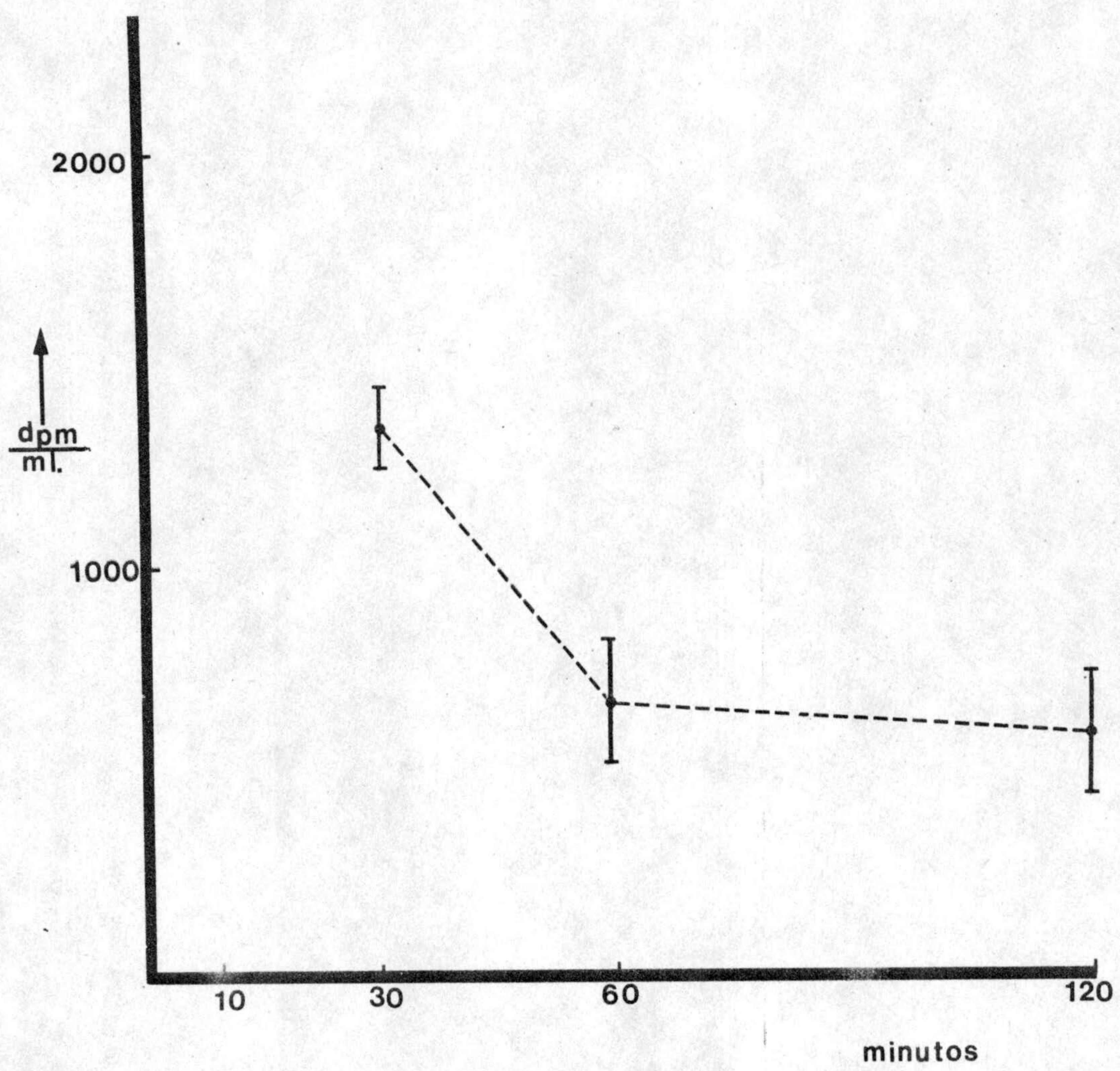
GRAFICA 5.- Incorporación de Glucosa $U-^{14}C$ a COLESTEROL LIBRE Y COLESTEROL ESTERIFICADO



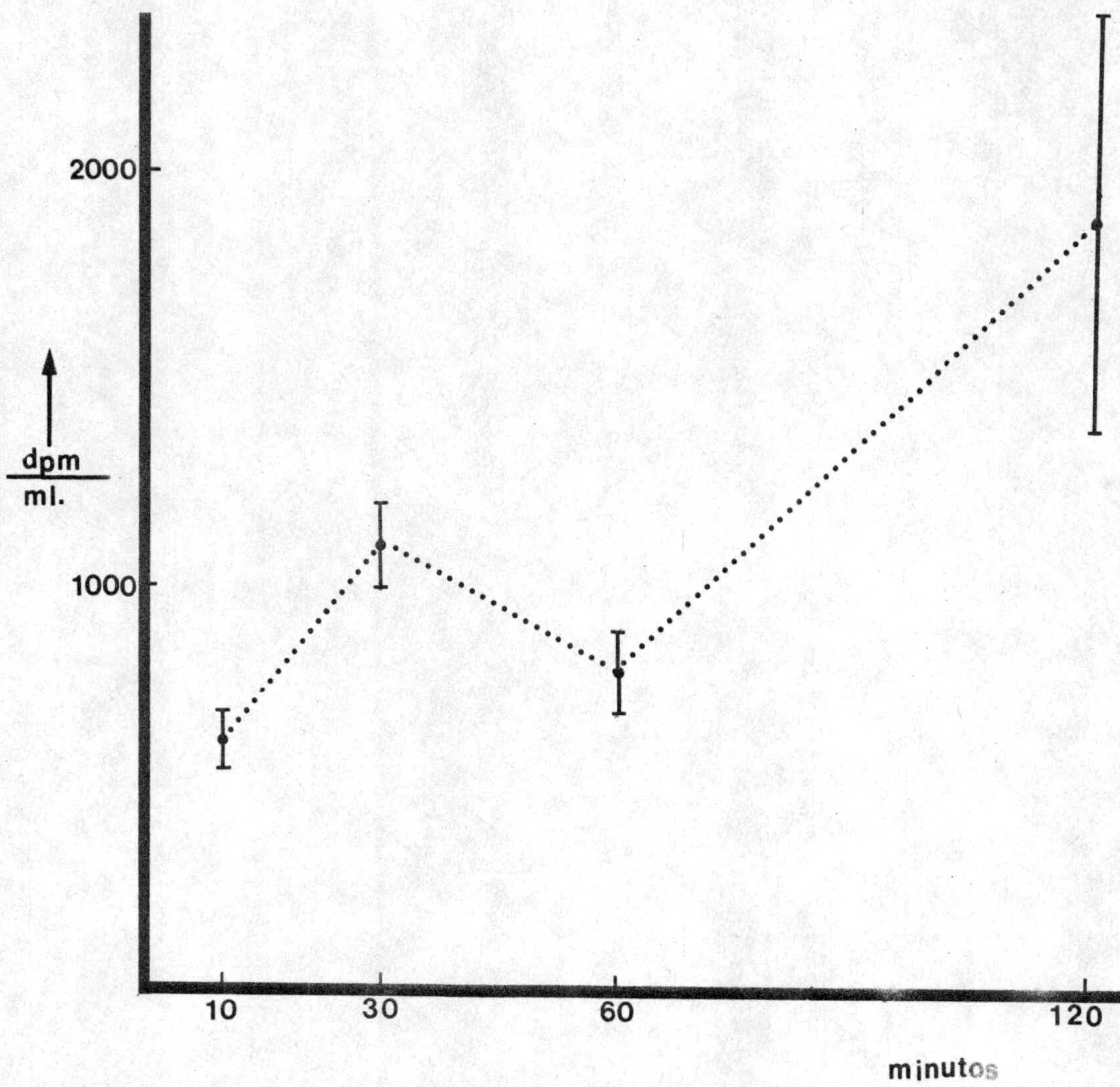
GRAFICA 6— Incorporación de Glucosa U-¹⁴C a FOSFOLIPIDOS



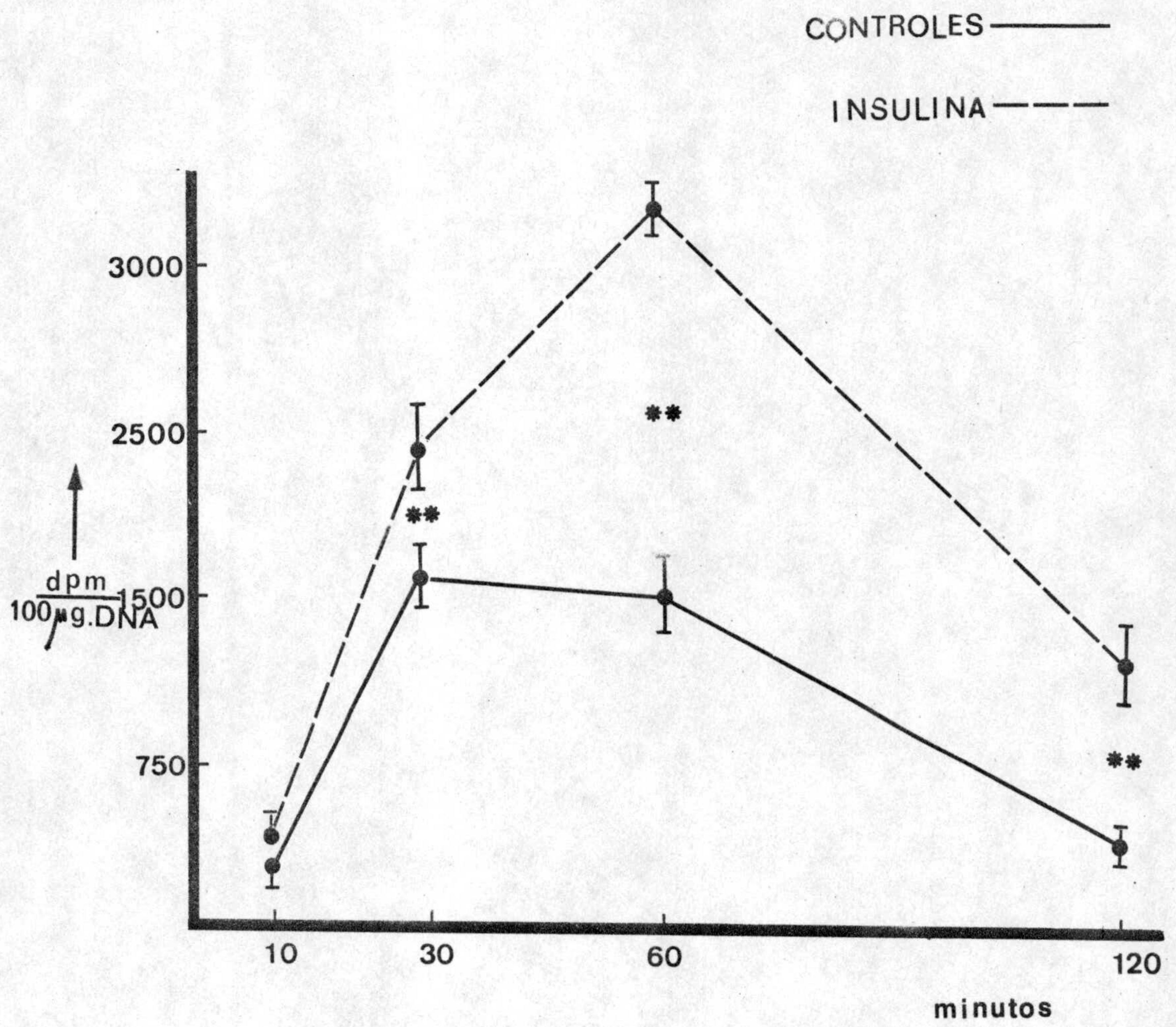
GRAFICA 7 .- Incorporación de Glucosa $\text{U-}^{14}\text{C}$ a Triglicéridos en PLASMA



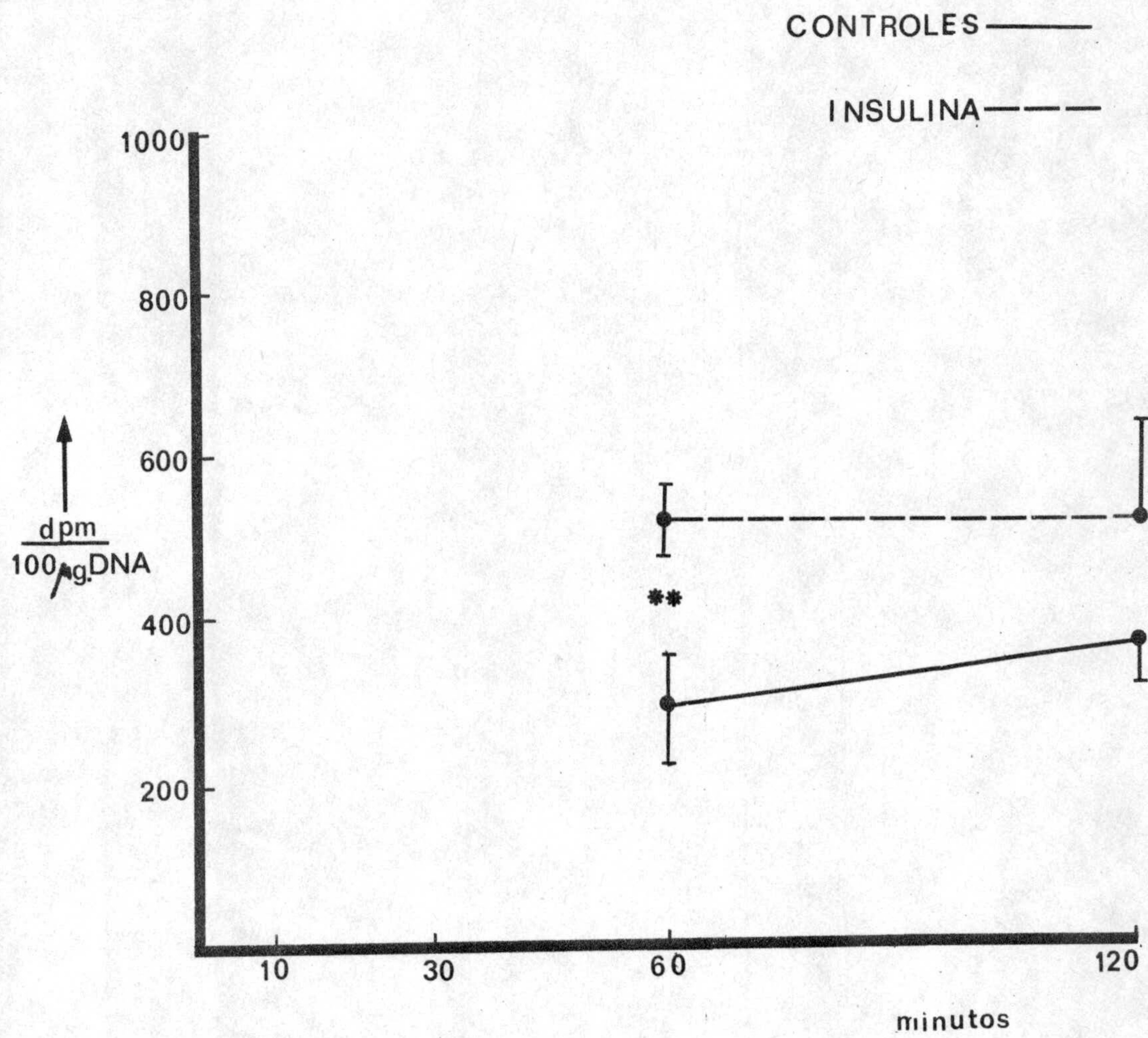
GRAFICA 8.- Incorporación de Glucosa $U-^{14}C$ a
Acidos Grasos Libres en PLASMA



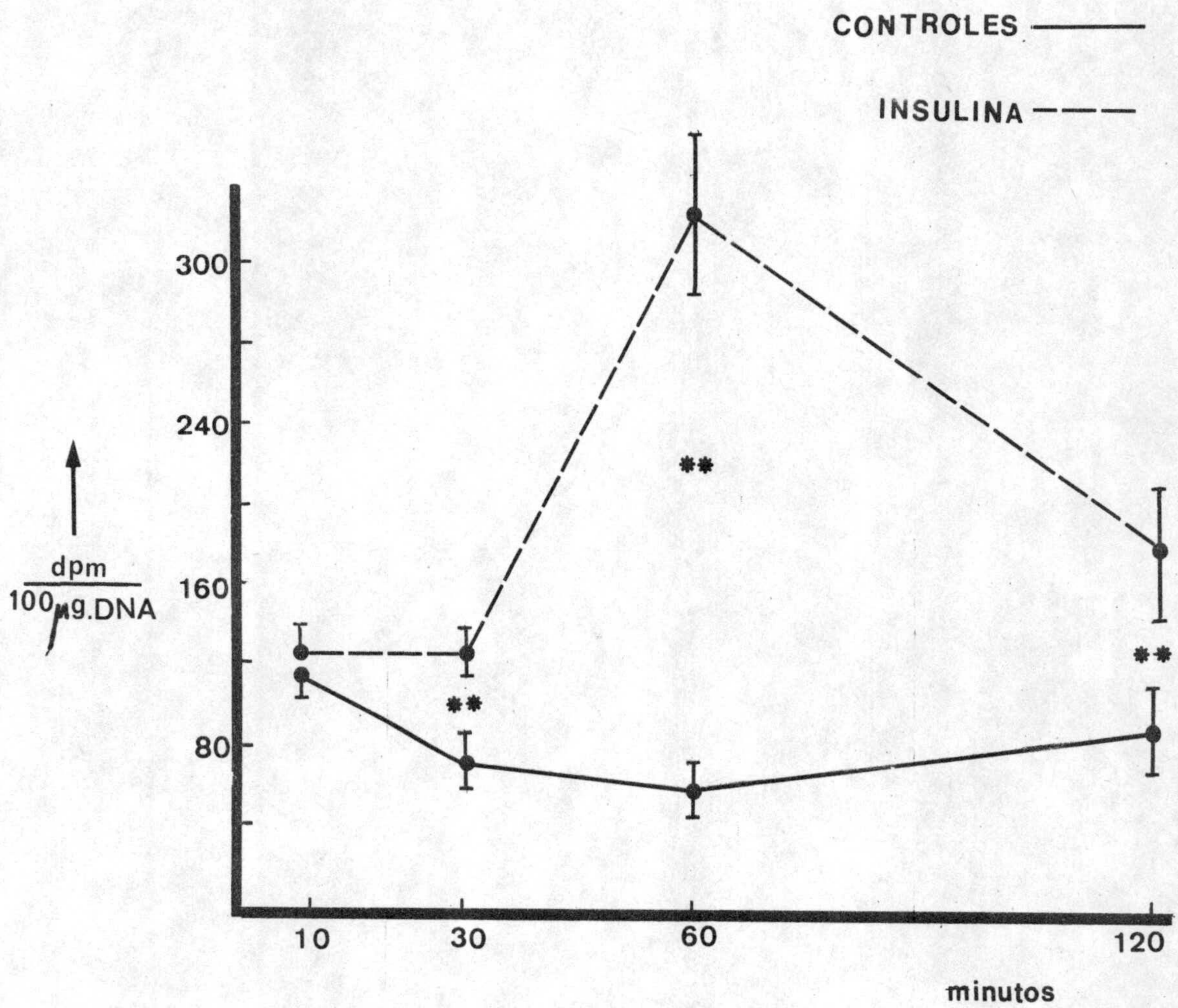
GRAFICA 9 - Incorporación de Glucosa $U-^{14}C$ a Fosfolipidos en PLASMA



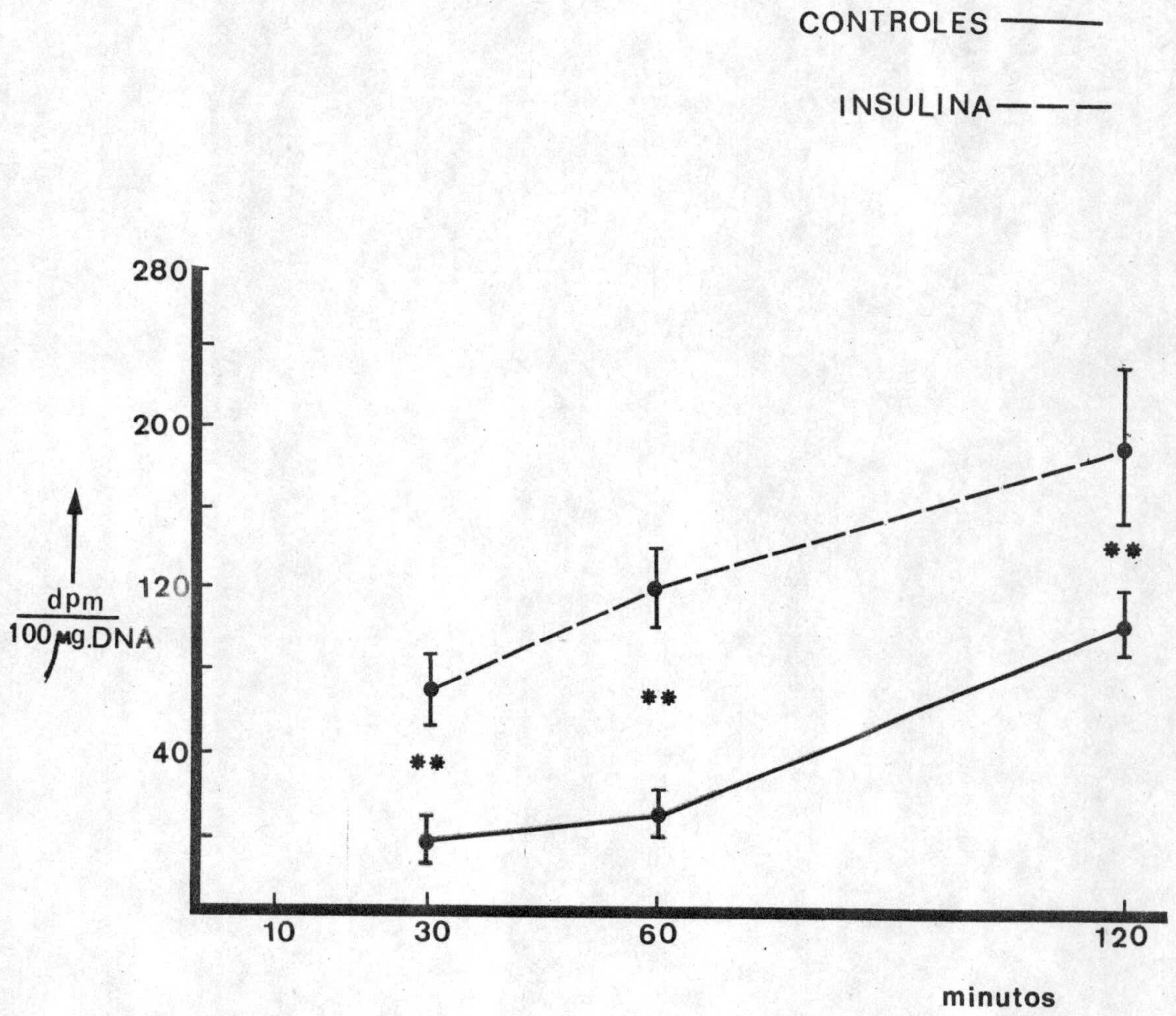
GRAFICA 10.- Efecto de la Insulina sobre la incorporación de Glucosa U-¹⁴C a Triglicéridos en HIGADO



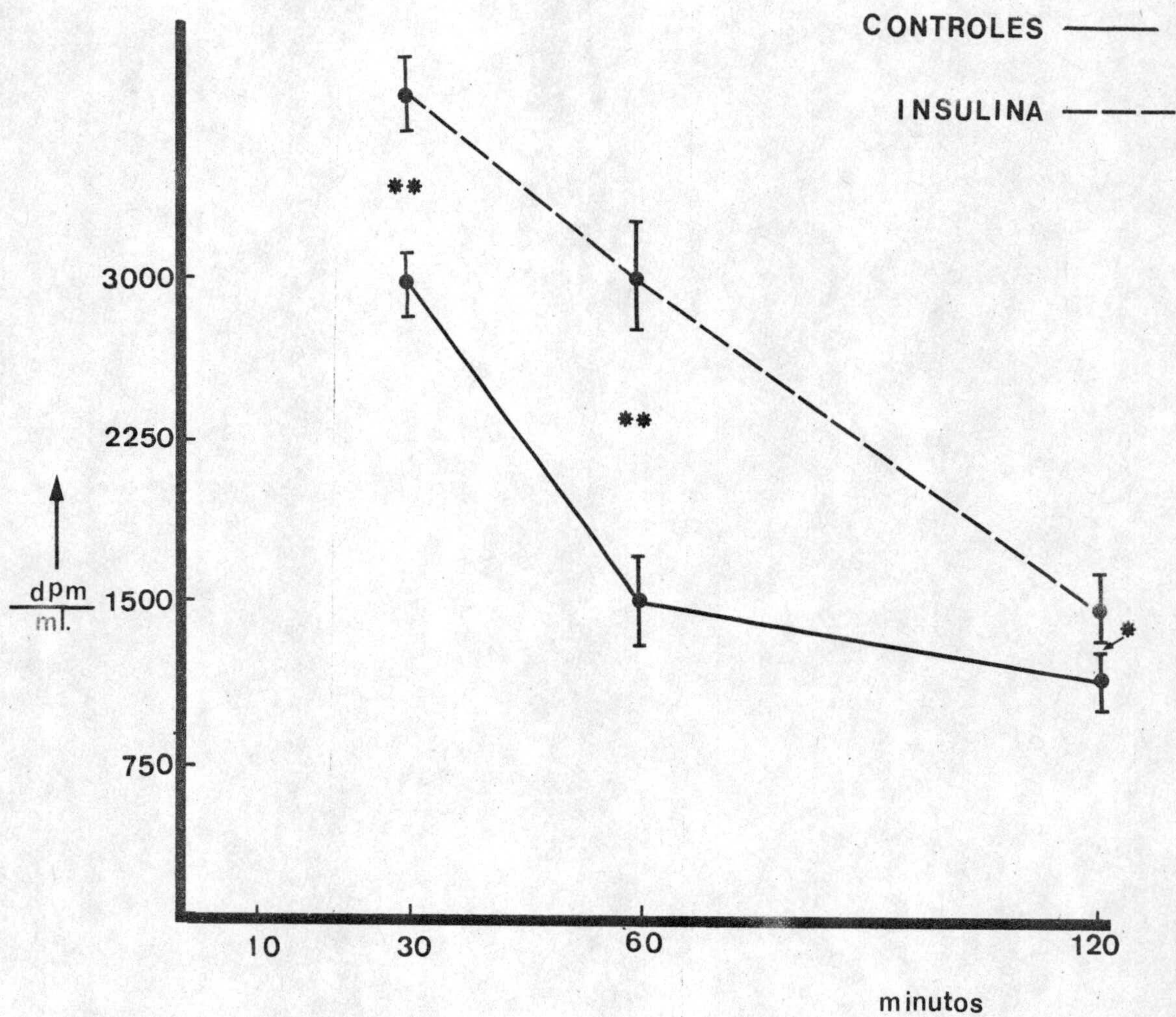
GRAFICA 11.- Efecto de la Insulina sobre la incorporación de Glucosa U-¹⁴C a Triglicéridos en ADIPOSO



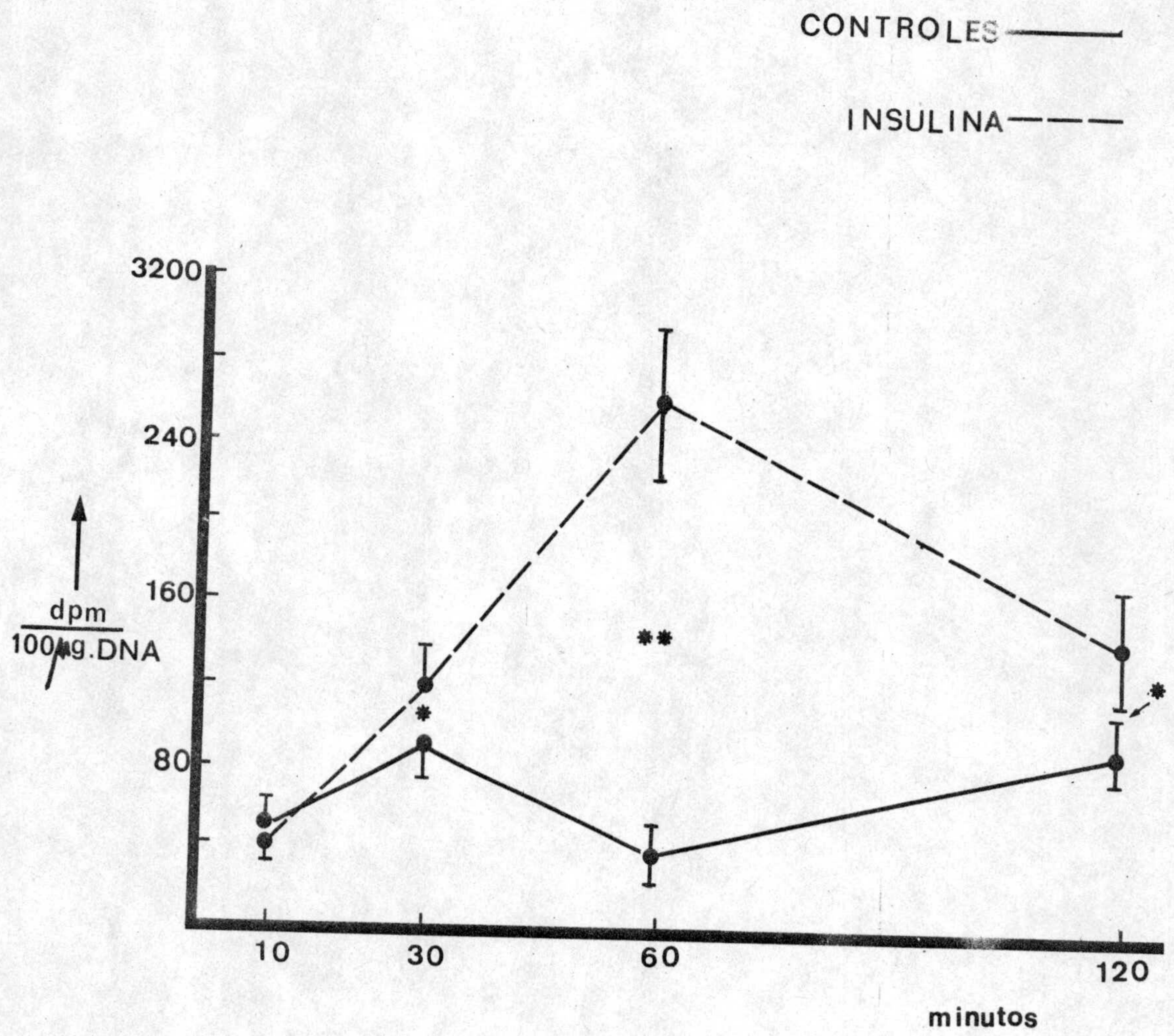
GRAFICA12- Efecto de la Insulina sobre la incorporación de Glucosa $U-^{14}C$ a Triglicéridos en CORAZON



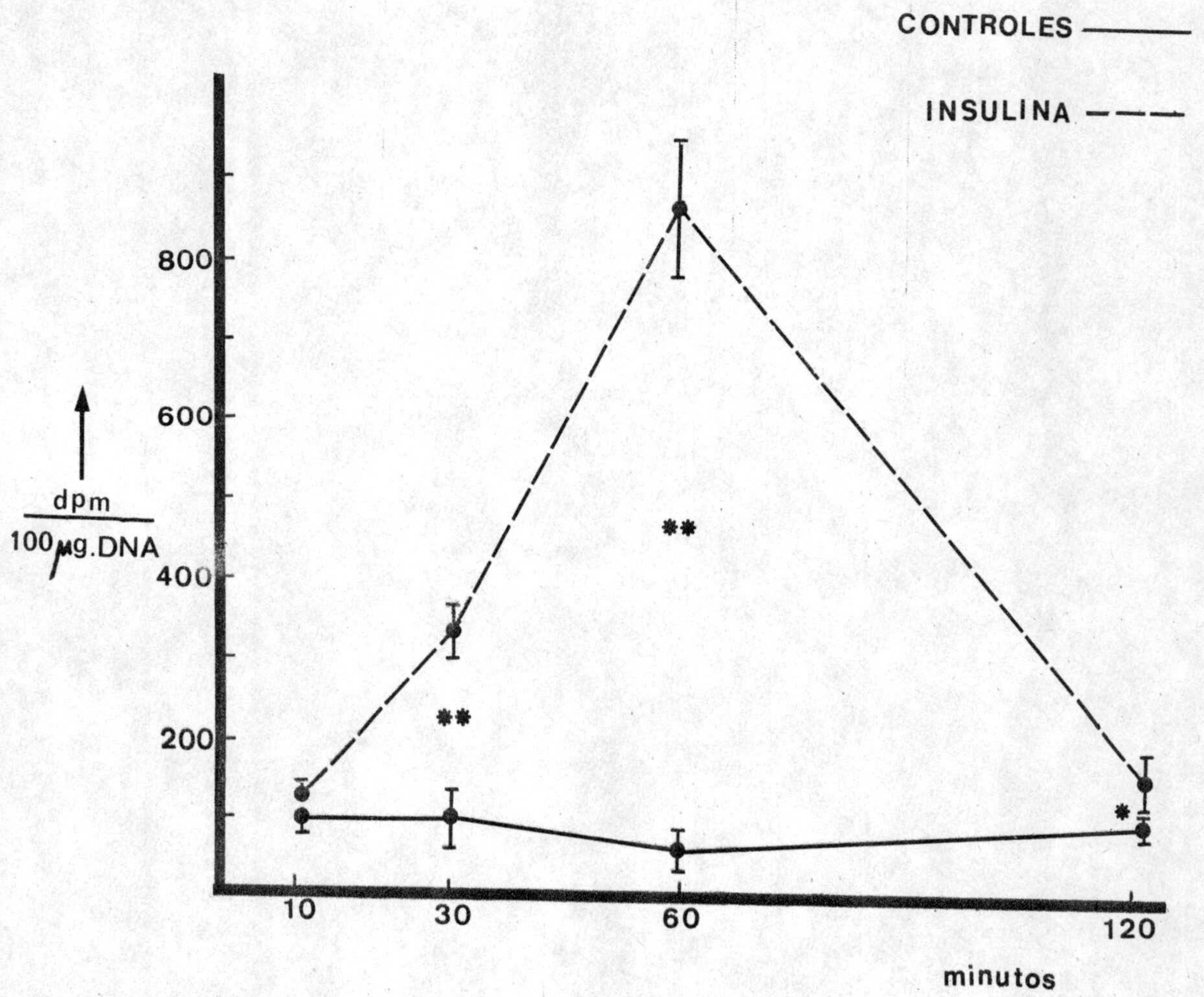
GRAFICA 13.- Efecto de la Insulina sobre la incorporación de Glucosa U-¹⁴C a Triglicéridos en MUSCULO



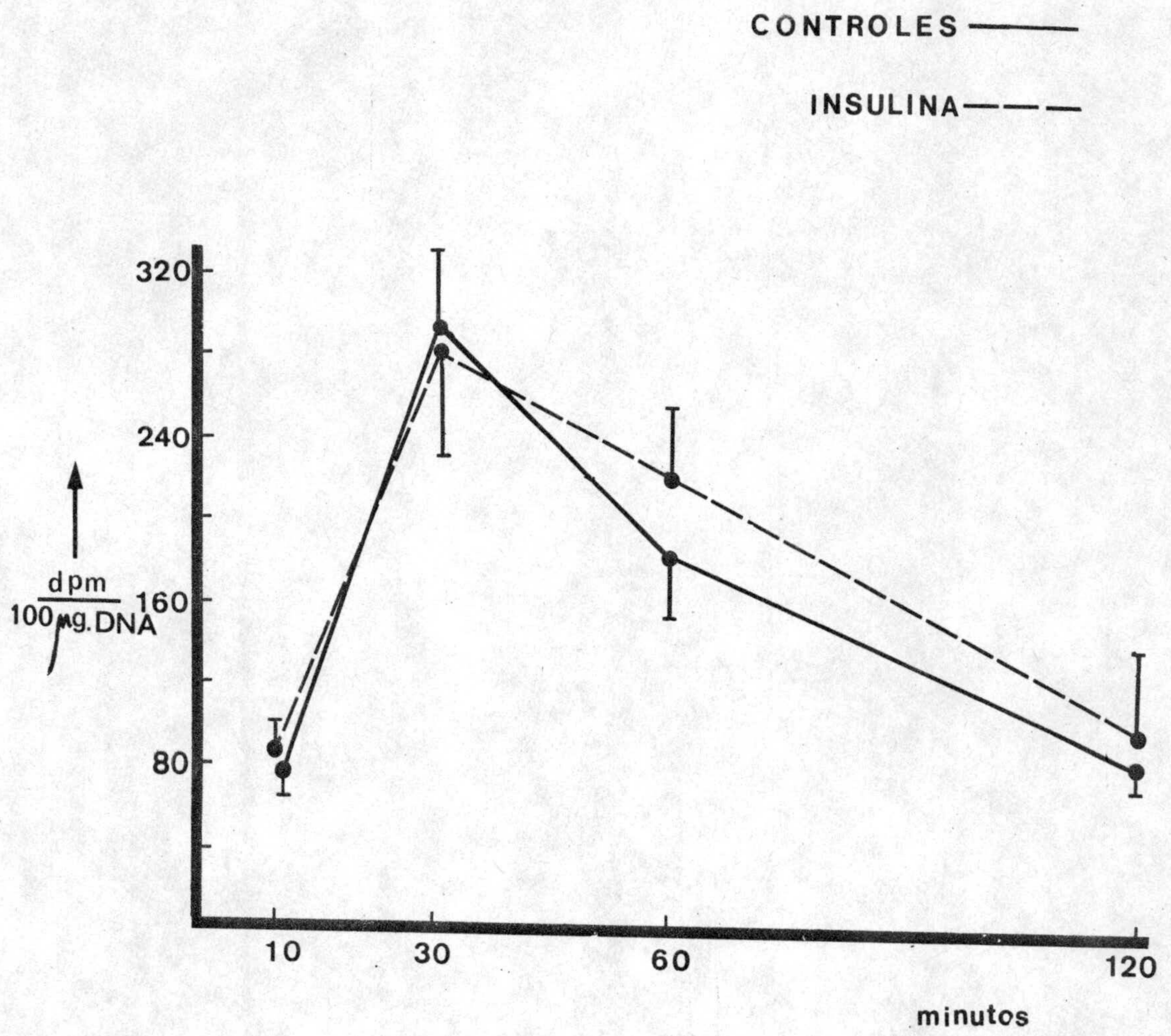
GRAFICA 14.-Efecto de la Insulina sobre la incorporación de Glucosa $U-^{14}C$ a Triglicéridos en PLASMA



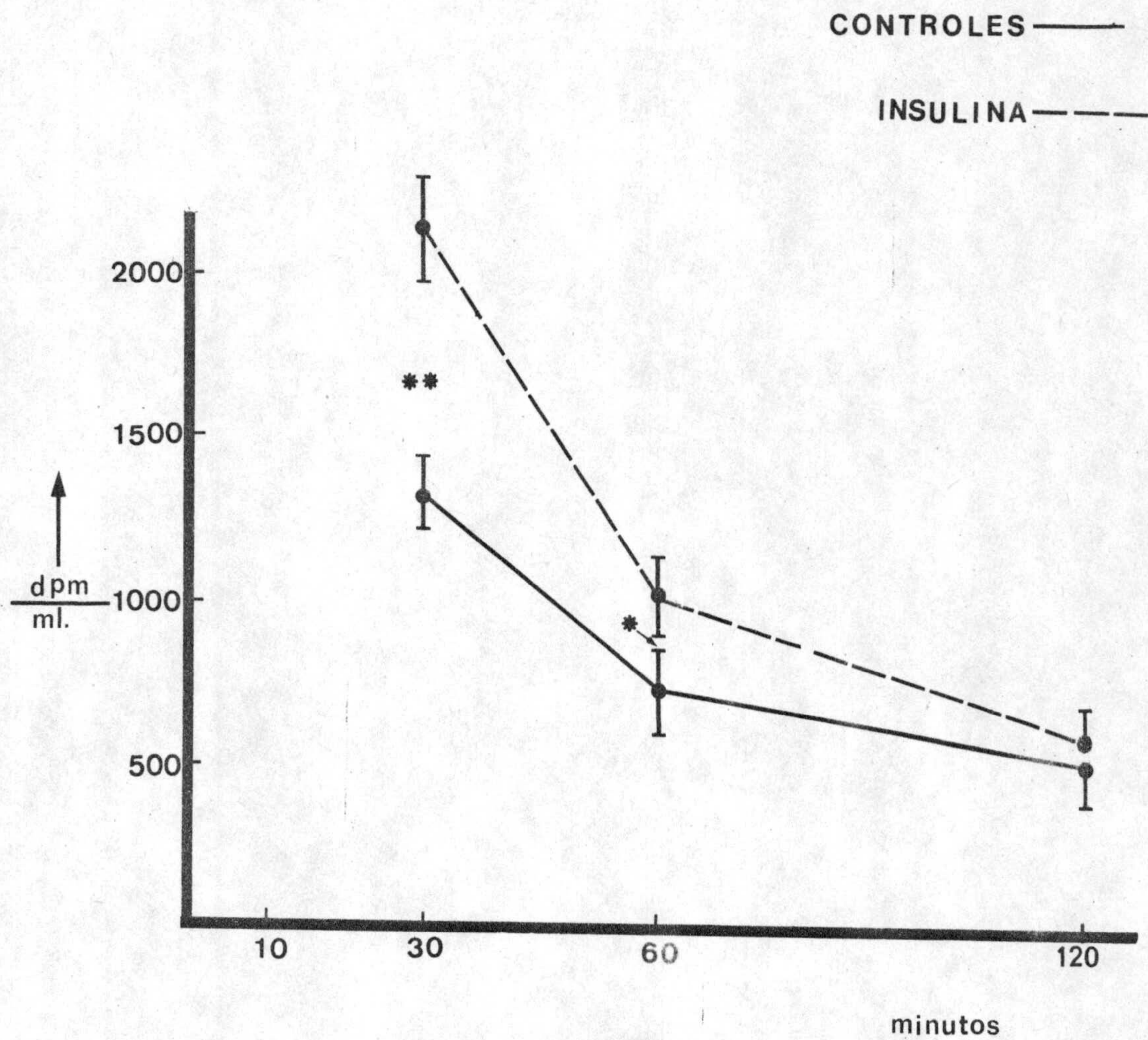
GRAFICA 15.- Efecto de la Insulina sobre la incorporación de Glucosa U-¹⁴C a Acidos Grasos Libres en MUSCULO



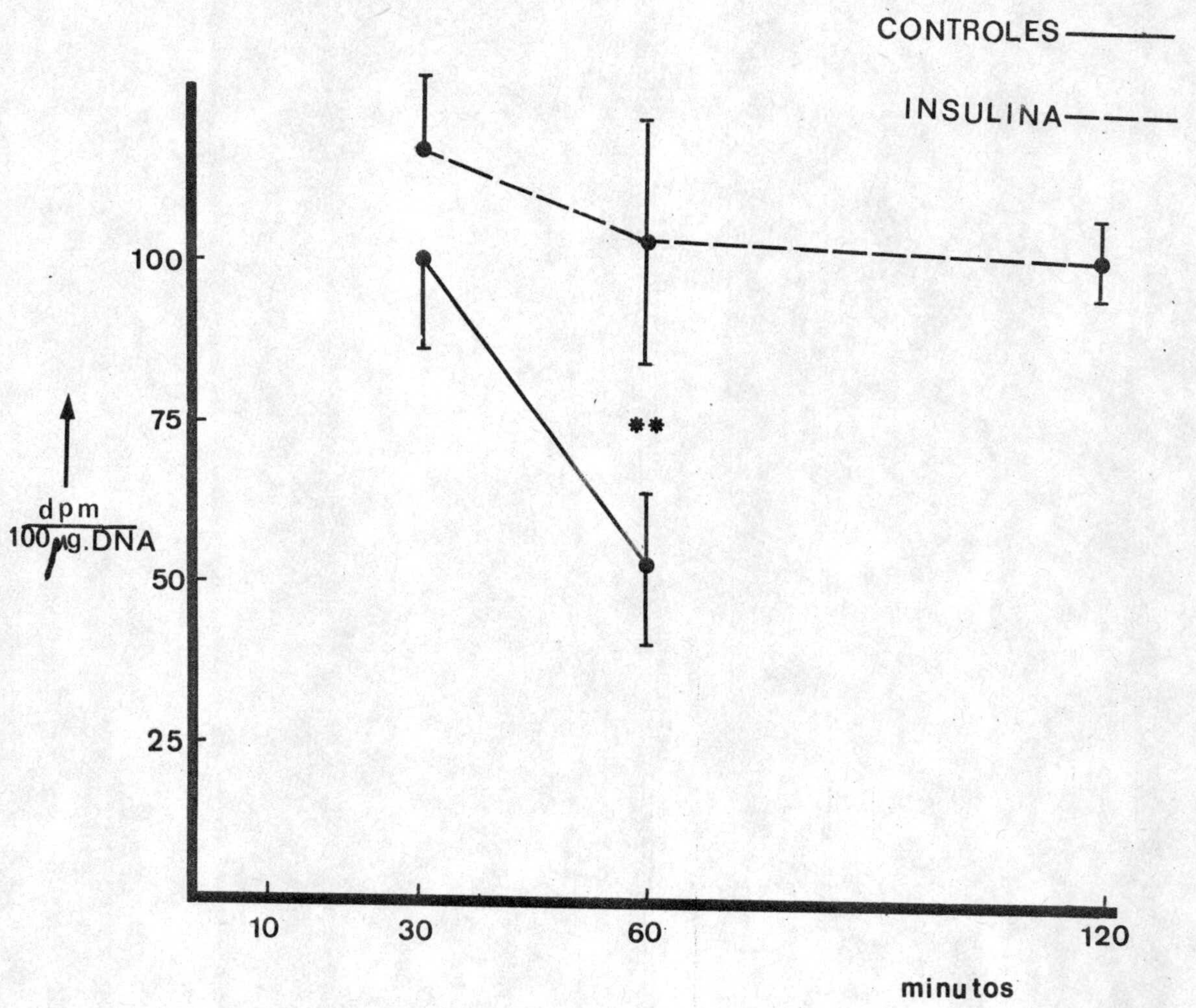
GRAFICA 16.- Efecto de la Insulina sobre la incorporación de Glucosa $U-^{14}C$ a Acidos Grasos Libres en CORAZON



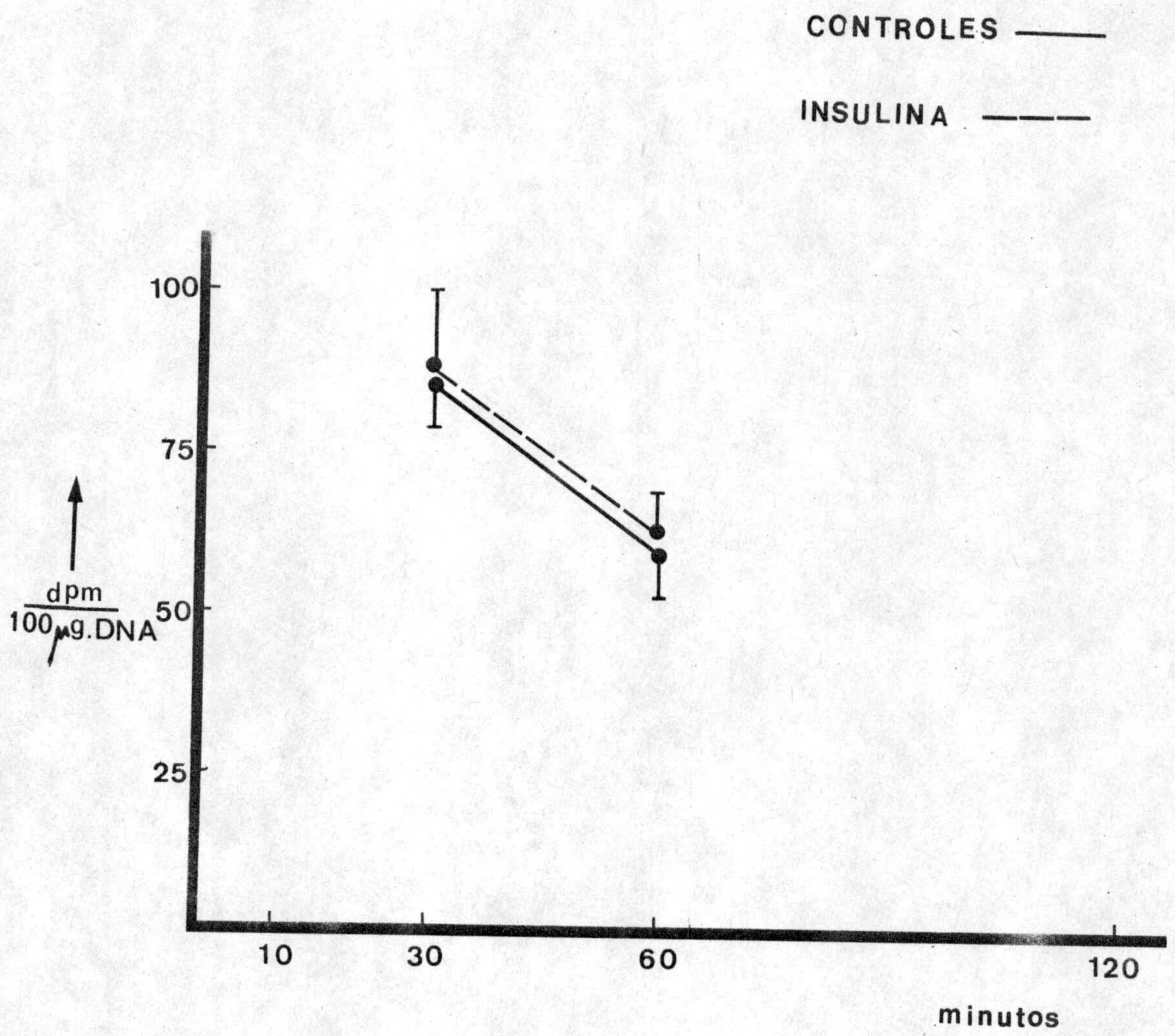
GRAFICA 17.- Efecto de la Insulina sobre la incorporación de Glucosa $U-^{14}C$ a Acidos Grasos Libres en HIGADO



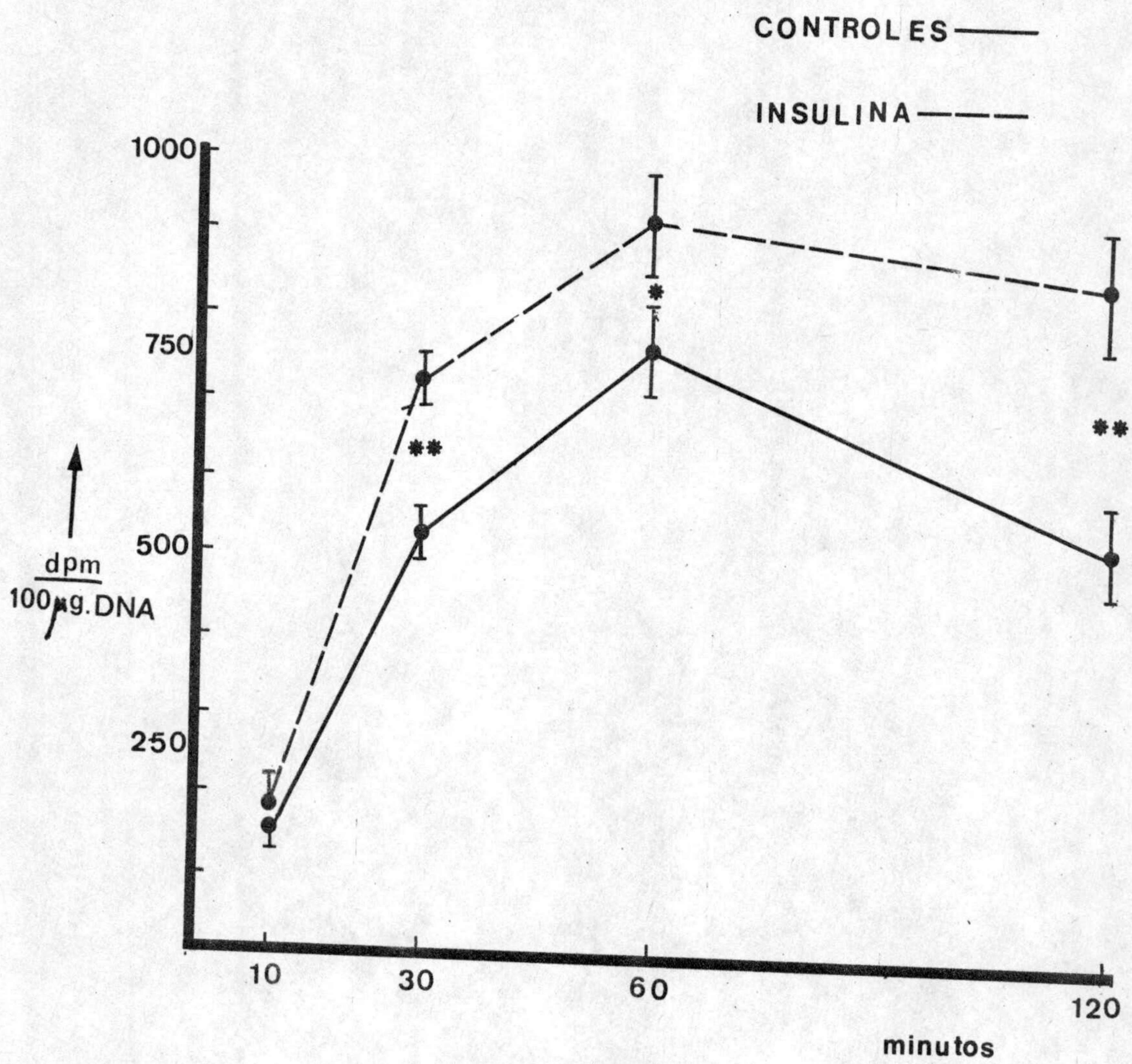
GRAFICA 18.- Efecto de la Insulina sobre la incorporación de Glucosa U-¹⁴C a Acidos Grasos Libres en PLASMA



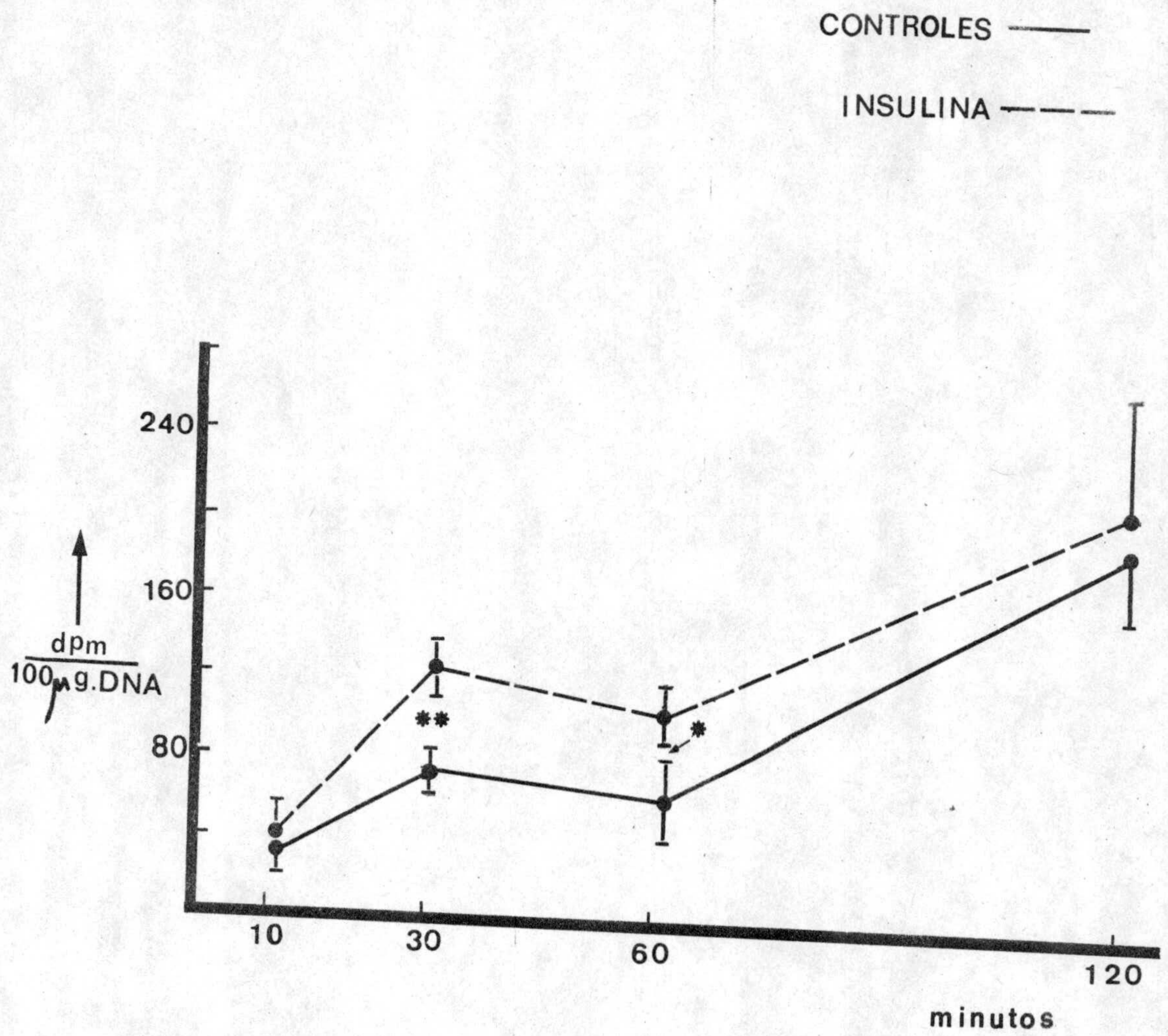
GRAFICA 19.- Efecto de la Insulina sobre la incorporación de Glucosa $U-^{14}C$ a Colesterol Esterificado en HIGADO



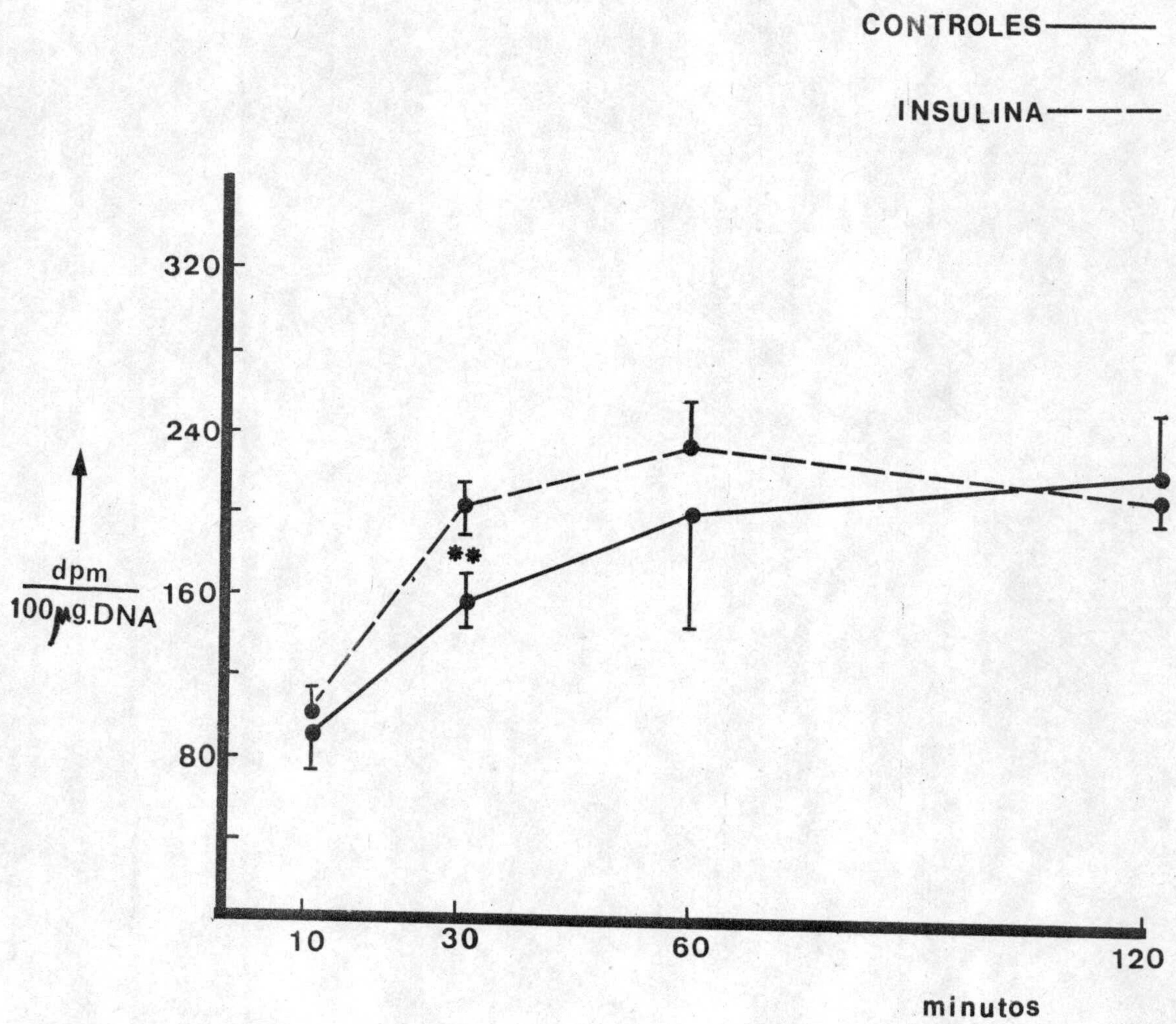
GRAFICA 20.- Efecto de la Insulina sobre la incorporación de Glucosa U-¹⁴C a Colesterol Libre en HIGADO



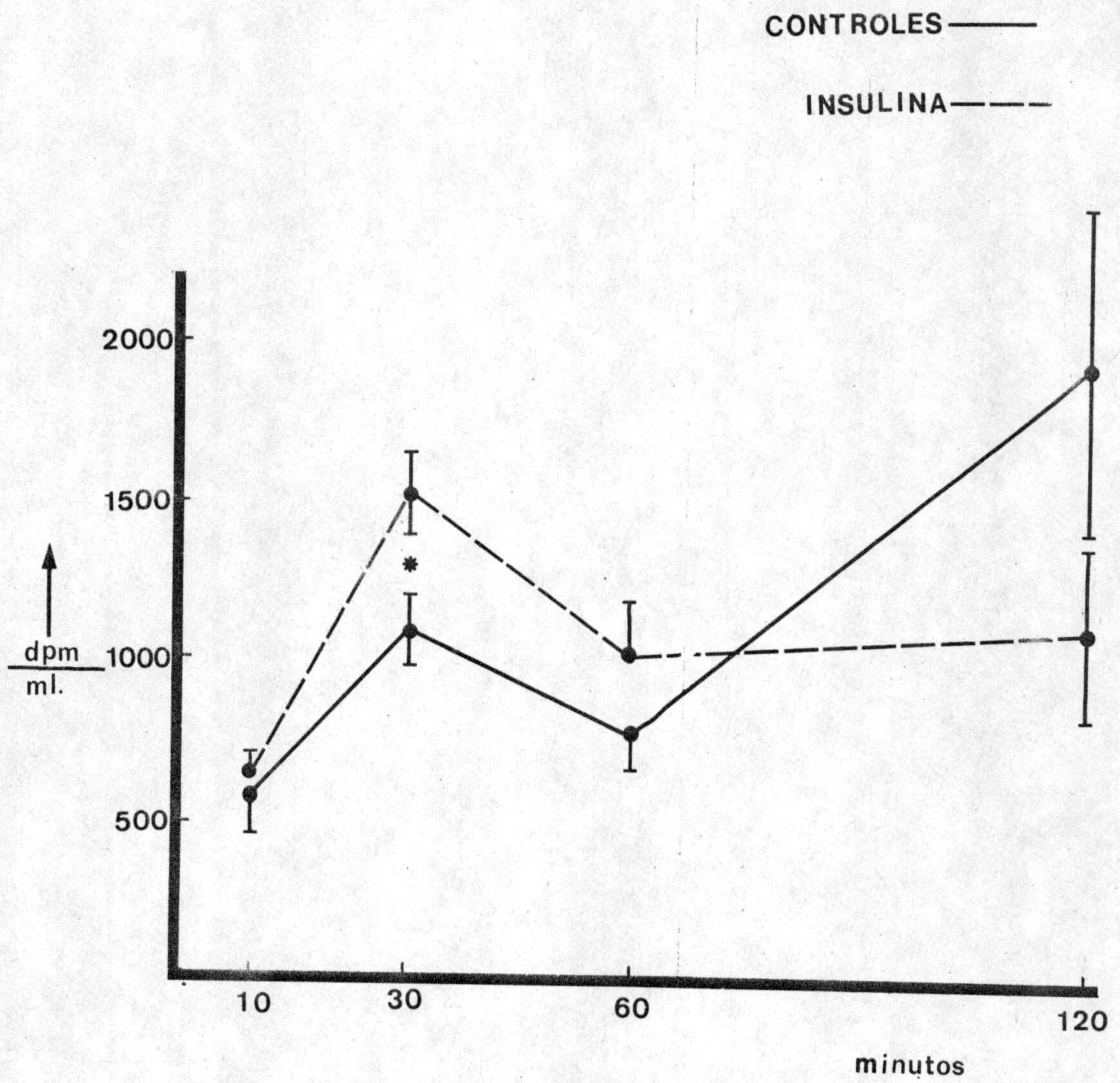
GRAFIÇA 21.- Efecto de la Insulina sobre la incorporación de Glucosa U-¹⁴C a Fosfolipidos en HIGADO



GRAFICA 22.- Efecto de la Insulina sobre la incorporación de Glucosa U-¹⁴C a Fosfolipidos en MUSCULO



GRAFICA 23.- Efecto de la Insulina sobre la incorporación de Glucosa U-¹⁴C a Fosfolípidos en CORAZON



GRAFICA 24.— Efecto de la Insulina sobre la incorporación de Glucosa U-¹⁴C a Fosfolipidos en PLASMA

DISCUSSION

EFECTO HIPOGLUCEMIANTE DE LA INSULINA

En primer lugar estudiamos el efecto hipoglucemiante de la insulina, para lo cual se inyectaron cinco pollos de un día de edad con 25 μ l. de una solución de cloruro sódico al 0,9 % que contenía diferentes cantidades de insulina equivalentes a 6, 3, 1'5, 0'75, y 0'375 UI/Kg. de pollo.

Los resultados de este experimento se recogen en la gráfica 1 donde se observa que la dosis más pequeña de insulina (0'375 UI/Kg. de pollo) causó una disminución en la glucosa plasmática de un 26 % , mientras que el mayor descenso de la glucosa plasmática se produjo a dosis de 0'75 UI/Kg. de pollo siendo este descenso de un valor del 44 % aproximadamente respecto de los controles para todas las dosis de insulina ensayadas, el descenso de la glucosa plasmática fué estadísticamente significativo para una $P < 0'01$ respecto de los controles.

Ya que la dosis de insulina de 0'75 UI/Kg. pollo fué la dosis mínima que produjo la máxima hipoglucemia se eligió esta dosis para estudiar la hipoglucemia producida a distintos tiempos desde la administración de la insulina (Gráfica 2).

Con la dosis de insulina de 0'75 UI/Kg. pollo se produce un descenso en la concentración de glucosa plasmática, que fué estadísticamente significativo a los 30 ($P < 0'01$), 60 ($P < 0'01$)

y 120 ($P < 0.05$) minutos, despues de la inyección de la hormona.

Estos resultados estan plenamente de acuerdo con lo establecido por otros autores : Langslow (1.970) ; Hazelwood (1.959) ; Kimmel (1.968) , aunque en nuestros experimentos se han usado para estudiar el efecto hipoglucemiante de la insulina, dosis de esta hormona menores que las usadas por dichos autores.

Aunque nuestros resultados claramente demuestran que la insulina produce hipoglucemia, sin embargo esta es menos severa que la que ocurre en mamiferos.

La resistencia de las aves a la insulina ha sido explicada en parte hasta ahora por un aumento en la secreción de catecolaminas, factores plasmáticos e insensibilidad tisular: Chen y colaboradores (1.945) ; Hazelwood y colaboradores (1.971) ; Langslow y Hales (1.971) , Pittman y Hazelwood (1.973) .

De la observación de estos resultados y conociendo que hasta ahora no se ha podido encontrar un efecto de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa en los tejidos de las aves la pregunta que hay que hacerse es donde va la glucosa desaparecida del plasma por acción de la insulina y que tejidos son los que contribuyen en este proceso.

Para tratar de dar una respuesta a esta pregunta, se estudió el efecto que dosis de insulina de 0'75 UI/Kg. pollo producían sobre la incorporación de Glucosa U ¹⁴C a triglicéridos, ácidos grasos libres, colesterol libre, colesterol esterificado y fosfolípidos en hígado, tejido adiposo, músculo esquelético, músculo cardíaco y plasma.

INCORPORACION DE GLUCOSA U ^{14}C A TRIGLICERIDOS

La gráfica 3, muestra la incorporación de radioactividad en los triglicéridos de hígado, tejido adiposo, músculo y corazón.

A los 10 minutos después de la administración de la glucosa U ^{14}C , la mayor radioactividad incorporada se presenta en el hígado siendo prácticamente despreciable en el resto de los tejidos a excepción del corazón, aunque en este último la glucosa incorporada a triglicéridos es inferior a la hallada en el hígado.

A los 30 minutos, la diferencia de incorporación entre el hígado y el resto de los tejidos crece drásticamente, siendo la incorporación en el hígado para este tiempo aproximadamente de un 2.000 % mayor que en el corazón, mientras que en tejido adiposo no aparecen todavía triglicéridos radioactivos a este tiempo.

A partir de los 30 minutos, aparecen triglicéridos marcados en tejido adiposo, aumentando la proporción de incorporación de glucosa U ^{14}C en músculo esquelético y tejido adiposo, con comitante con un descenso de la incorporación de glucosa marcada a triglicéridos en el hígado.

Después de 60 minutos de la administración del isótopo, en el hígado se acumulan aproximadamente 480 % más cuentas que en el tejido adiposo y ya a los 120 minutos la cantidad de glucosa

acumulada en triglicéridos del tejido adiposo es un 1'2 % superior a la acumulada en el hígado.

El cese de la acumulación de triglicéridos marcados en hígado, paralelamente a un incremento en la incorporación en tejido adiposo y músculo, probablemente represente un balance entre la proporción de los triglicéridos sintetizados de nuevo en el hígado y su liberación hacia la sangre, así como su posterior distribución y almacenamiento en el resto de los tejidos. Esta posibilidad viene apoyada fuertemente por los resultados obtenidos en plasma (Grafica 7).

A los 10 minutos de la administración de glucosa U ^{14}C no aparecen triglicéridos marcados en el plasma apareciendo a los 30 minutos probablemente como consecuencia de la liberación de estos por el hígado, los cuales serían transportados hasta el resto de los tejidos estudiados.

A los 60 minutos después de la administración del isótopo, los triglicéridos marcados en plasma son menores que los existentes a los 30 minutos, como consecuencia de la captación de los triglicéridos del plasma por parte de los tejidos.

Todos estos resultados claramente demuestran, que es el hígado el lugar de la síntesis de triglicéridos, siendo el tejido adiposo un lugar de almacenamiento.

La lipogénesis en las aves ha sido ampliamente estudiada: Goodridge (1.967) ; O'Hea y Leveille (1.969) y Leveille (1.969a). En tejido adiposo, el enzima acetil-coenzima A - carboxilasa, el enzima de escisión del citrato y el enzima málico estan presentes, pero sus actividades son considerablemente menores que las encontradas en hígado : O'Hea y Leveille (1.968). El hígado es el principal lugar donde se localiza la síntesis de ácidos grasos : O'Hea (1.968), en contraste con el ratón y la rata en los cuales es el tejido adiposo el primer responsable de la síntesis de ácidos grasos : Favarger (1.965).

Estudios " in vivo " demuestran que el hígado del pollo proporciona el 70 % de la síntesis de " novo " de ácidos grasos : Leveille (1.968) , lo que sugiere que la función del tejido adiposo es principalmente de almacenamiento y eliminación de líquidos mas que una función de síntesis como es el caso del tejido adiposo de la rata . En 1.969 O'Hea y Leveille demuestran que la síntesis de " novo " de lípidos tiene lugar en el hígado en una proporción del 90 al 95 % .

Weiss en un trabajo aparecido en 1.967, observa que la capacidad del hígado de gallina para convertir acetato $1-^{14}C$ en ácidos grasos es más baja que en pollo. Leveille (1.966), sin embargo observó que cortes de hígado de polluelos convertían aproximadamente

1.200 m μ moles de acetato $1-^{14}\text{C}$ en ácidos grasos por 100 mg. de tejido después de 3 horas, contrastando grandemente con los 25 m μ moles por 100 mg. encontrados por Weiss.

Estas diferencias hizo a Leveille (1.969a) estudiar detenidamente el problema y propuso como consecuencia de sus investigaciones que la facilidad de los cortes de hígado de pollo y gallina para usar acetato $1-^{14}\text{C}$, para la síntesis de lípidos y oxidación a CO_2 era la misma o similar.

Existen otros datos que corroboran el escaso valor del tejido adiposo en la síntesis de ácidos grasos, así por ejemplo los bien conocidos efectos del ayuno y realimentación sobre la actividad enzimática que se han observado en los mamíferos, no se ha podido comprobar en las aves : Goodridge y Ball (1.966). Aunque la síntesis de ácidos grasos en el tejido adiposo durante los primeros días del nacimiento del pollo, es alta comparada con la de los pollos jóvenes y adultos, sin embargo esta no alcanza ni el 5 % de la observada en el tejido adiposo de las ratas jóvenes : Goodridge (1.968) .

Por esto y otros estudios parece claro que menos del 4 % de la lipogénesis total corporal a partir de glucosa puede ser atribuida al tejido adiposo aviar, ya que la mayoría ocurre

en el hígado : Goodridge (1.967) ; O'Hea (1.968) y Leveille (1.969b) .

Nuestros resultados grafica 3 , son consistentes con todas las observaciones anteriormente expuestas resaltando la importancia del hígado como lugar de lipogénesis, aportando además y por primera vez claras evidencias de que tanto en el músculo esquelético como cardíaco (grafica 3), poseen capacidad de síntesis de triglicéridos aunque en muy escasa proporción sobre todo comparandola con la del hígado.

A los 10 minutos de la administración glucosa U ^{14}C aparecen triglicéridos marcados en músculo cardíaco, justo en un tiempo en el que la lipogénesis hepática es muy baja (sólo es aproximadamente 104 % de la del corazón , mientras que a los 30 minutos es aproximadamente un 2.000 % mayor) y en plasma aún no se detectan triglicéridos radioactivos, lo cual hace pensar que los triglicéridos en el corazón son sintetizados de " novo " a partir de glucosa U ^{14}C y no aparecen como consecuencia de una captación de triglicéridos previamente sintetizados en el hígado.

INCORPORACION DE GLUCOSA U ¹⁴C A ACIDOS GRASOS LIBRES

Ya hemos indicado que en las aves, el hígado es el lugar principal en la síntesis de triglicéridos los cuales se almacenan en el tejido adiposo en forma de gotas de grasa.

Estos triglicéridos se hidrolizan dando ácidos grasos, antes de que puedan ser transportados desde el tejido adiposo a otros tejidos. El mecanismo por el cual se hidrolizan los triglicéridos almacenados ha sido ampliamente estudiado y viene catalizado por una lipasa, siendo esta triglicérido-lipasa distinta del sistema de la lipoprotein-lipasa que ocurre fuera de la célula del tejido adiposo.

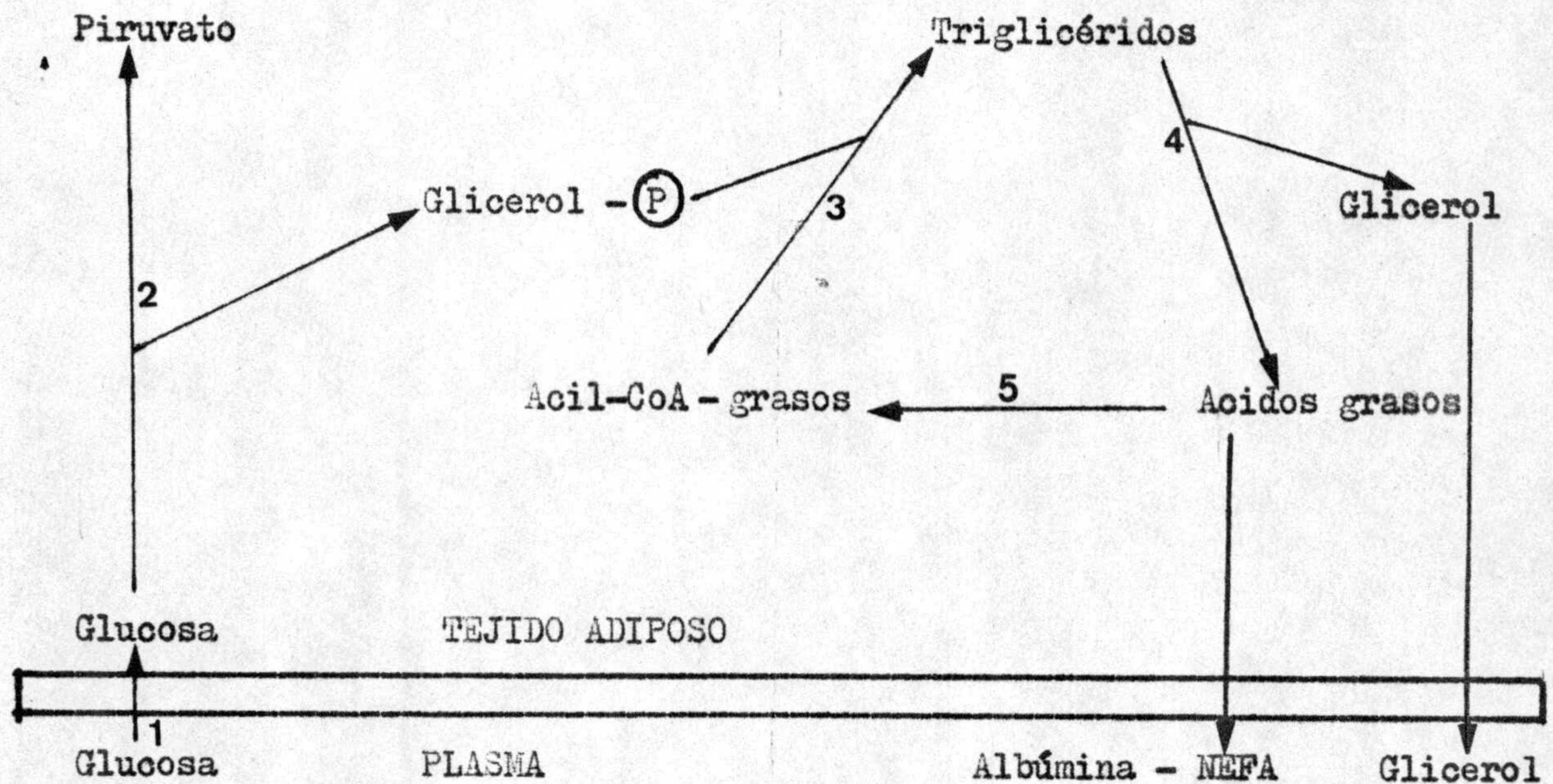
La hidrólisis de los triglicéridos para dar ácidos grasos y glicerol, tiene lugar en distintos pasos dando como productos intermedios diglicéridos y monoglicéridos.

La liberación de ácidos grasos por el tejido adiposo dependen obviamente de la proporción de la lipólisis, sin embargo este no es el único proceso que debe ser considerado. En particular, la reesterificación de ácidos grasos para formar de nuevo triglicéridos, puede jugar un importante papel en la regulación de la movilización de los ácidos grasos.

Si la lipólisis ocurriera en ausencia de esterificación, cada mol de glicerol liberado del tejido adiposo estaría acompañada por tres

moléculas de ácidos grasos.

Sin embargo se ha demostrado que en general se libera mucho más glicerol que ácidos grasos, llegándose a la conclusión hoy totalmente aceptada, de que la lipólisis y esterificación ocurren simultáneamente en los tejidos, existiendo un ciclo triglicéridos/ácidos grasos :



Ciclo Triglicéridos/ácidos grasos en tejido adiposo :

- 1) Transporte de Glucosa a través de la membrana celular
- 2) Glicolisis
- 3) Esterificación
- 4) Lipólisis
- 5) Activación de ácidos grasos (Ácido graso - CoA sintetasa).

De acuerdo con las técnicas experimentales seguidas en este trabajo, se determinó la incorporación de glucosa U ^{14}C a ácidos grasos libres, que de acuerdo con las consideraciones anteriores representarían el resultado del balance existente entre la lipólisis y la esterificación. Los resultados se recogen en la gráfica 4.

A los 30 minutos después de la administración del isótopo, la radioactividad incorporada al hígado crece significativamente respecto a la que existía a los 10 minutos, siendo este el valor máximo alcanzado en el hígado, ya que a los 60 y 120 minutos los valores hallados son significativamente menores. Este hecho sólo ocurre en el hígado y probablemente represente, del mismo modo que en el caso de los triglicéridos, un balance entre los ácidos grasos libres presentes en el hígado y los liberados hacia la sangre, ya que los resultados obtenidos en plasma son consecuentes con esta afirmación (gráfica 8).

En plasma sólo se detectan ac.gr. libres radioactivos a los 30 minutos de la administración de glucosa U ^{14}C y que coincide con la máxima incorporación en el hígado.

Transcurridos 60 minutos después de la administración de la glucosa U ^{14}C los ácidos grasos libres marcados en el plasma

son menores que los que existen a los 30 minutos, como consecuencia de la captación de los mismos del plasma por parte del resto de los tejidos.

Todos estos resultados vuelven a resaltar la importancia del hígado como lugar de la síntesis de los ácidos grasos.

INCORPORACION DE GLUCOSA U ¹⁴C A COLESTEROL

En la síntesis de colesterol hay que distinguir tres pasos fundamentales :

- 1º) El que conduce desde acetil-coenzima A hasta ácido mevalónico.
- 2º) Desde ácido mevalónico hasta escualeno.
- 3º) Desde escualeno hasta colesterol.

Por lo tanto después de la administración glucosa U ¹⁴C a los pollos se produciría a partir de esta a acetil-CoA radioactivo (precursor de la síntesis de colesterol) por lo que cabría esperar la formación de colesterol radioactivo en los tejidos de los pollos que recibieron la glucosa U ¹⁴C.

En nuestras experiencias, tras la administración de Glucosa U ¹⁴C a pollos de un día de edad, no se pudo detectar radioactividad alguna en la fracción de colesterol libre ni en la de colesterol esterificado para ninguno de los tiempos estudiados en tejido adiposo, músculo, corazón y plasma.

En el hígado (gráfica 5), transcurridos 10 minutos desde la administración de glucosa U ¹⁴C, la incorporación de radioactividad a colesterol libre y esterificado, sigue siendo nula; necesitándose 30 minutos desde la administración de glucosa U ¹⁴C para que pueda detectarse una incorporación tanto a colesterol libre

como a colesterol esterificado. A partir de este tiempo la radioactividad incorporada decrece siendo ya a los 60 minutos netamente inferior y a los 120 minutos la radioactividad incorporada vuelve a ser nula. Todos estos resultados sugieren que existe una incapacidad por parte de los tejidos aviares para sintetizar colesterol.

Administrando colesterol $4\text{-}^{14}\text{C}$ a gallinas ponedoras, Connor, Osborne y Marion (1.965), concluyen que la mayoría si no todo el colesterol de la yema del huevo se formaba de la sangre de la gallina ponedora. No obstante se desconoce aún con seguridad si el colesterol de los tejidos del pollo recién nacido se transfiere desde la yema del huevo o se sintetizan en tejidos propios del polluelo o en las membranas embrionarias.

Ellis y Gardner (1.909), encuentran que huevos y pollos recién nacidos contienen una cantidad similar de colesterol, sugiriendo que el embrión no formaba colesterol. Veinte años después, Dam (1.929), determinó el colesterol tanto en los huevos como en pollos recién nacidos por precipitación con digitonina y llegó a la misma conclusión .

Rittenberg y Shonheimer (1.937) no pudieron encontrar incorporación de deuterio al colesterol en huevos incubados, deduciéndose que el colesterol no se sintetiza en el huevo. En estudios

sobre los niveles de colesterol libre y esterificado en el huevo completo, yema más embrión : Tsují, Brin y Willians (1.955) concluyeron que no existía síntesis de colesterol en el embrión, pero que el colesterol de la yema se esterificaba y era transportado al embrión.

Goodridge (1.968b), encontró en hígado de embrión de pollo una baja velocidad de síntesis de colesterol a partir de acetato.

Otros investigadores sostienen sin embargo que en el embrión de pollo debe ocurrir síntesis de colesterol. Needman (1.931), concluyó del balance obtenido en experimentos realizados por otros que una síntesis neta del colesterol puede ser demonstrada en el embrión del pollo en desarrollo.

Bernhard (1.941), encontró un significativo contenido de deuterio en moléculas de colesterol en embriones completos después de haber inyectado óxido de deuterio al huevo incubado. Otros investigadores inyectando acetato $1-^{14}\text{C}$ al huevo incubado, encontraron colesterol radioactivo en el embrión completo: Stokes (1.953), (1.956), Halevy (1.961), Fish (1.962).

Camerino y Wright (1.962), inyectando ácido mevaló-

nico $1\text{-}^{14}\text{C}$ a huevos en el sexto día de incubación encontraron que la radioactividad se incorporaba al embrión en la fracción que no se saponificaba. En vista de estos resultados contradictorios, se diseñaron nuevas experiencias que proporcionaron información cuantitativa acerca del origen del colesterol en el pollo durante todo el periodo de incubación para el embrión completo, plasma y tejidos individuales.

Primero se marcó el colesterol de la yema mediante inyecciones intravenosas de colesterol $4\text{-}^{14}\text{C}$ administradas a gallinas ponedoras que habían sido inseminadas artificialmente en vez de inyectar el compuesto radioactivo directamente al huevo incubado como se había dicho antes. Se estableció el origen del colesterol en los recién nacidos comparando su radioactividad específica de sangre y otros tejidos con la del saco vitelino.

Connor (1.969), cree que la porción de colesterol no utilizada del saco vitelino, es representativa del colesterol de la yema antes de su transferencia metabólica al polluelo. Este investigador trabajando con gallinas inseminadas artificialmente inyectadas con colesterol $4\text{-}^{14}\text{C}$, determinó el colesterol radioactivo en huevos y en suero así como en tejidos del pollo recién nacido, concluyendo que la

radioactividad específica del colesterol en intestino, hígado, suero, corazón y músculo esquelético fué del 95 al 98 % del de la yema, siendo la del cerebro sólo del 11 % .

Lo anteriormente expuesto justifica y está de acuerdo con nuestros resultados, respecto a la incorporación de glucosa U-¹⁴C a colesterol en tejidos de pollos de un día y para los cuales todavía está presente el saco vitelino : Karg (1.966). Todo esto indica claramente que la mayor parte del colesterol del pollo, se origina a partir del saco vitelino, mientras que la biosíntesis del colesterol sólo es activa en el cerebro y proporciona alrededor del 90 % de su propio colesterol.

Más recientemente se han publicado nuevas evidencias respecto a la incapacidad de los tejidos del pollo de corta edad para sintetizarlo, habiéndose encontrado además una baja proporción en la fosforilación de ácido mevalónico en extractos de hígado de pollo, durante los primeros días después de la eclosión : Garcia Martinez y Garcia Peregrin (1.976).

INCORPORACION DE GLUCOSA U ^{14}C A FOSFOLIPIDOS

Respecto a los fosfolípidos, han sido varios los trabajos encaminados a estudiar el destino de los lípidos de la yema durante el desarrollo del embrión de pollo : Hevesy (1.938); Branson (1.950) ; Stokes (1.953) ; Davison (1.958) ; Budowski (1.961) y Camerino (1.962).

El resultado de las investigaciones de todos estos autores podemos resumirlo en los siguientes hallazgos :

1ª) La yema contiene una rica proporción de fosfolípidos, que disminuyen durante el desarrollo embrionario mientras que aumentan los fosfolípidos en el embrión.

2ª) La hidrólisis de los lípidos fosforados para formar fosforo inorgánico ocurre en la yema.

3ª) Sustancias marcadas con ^{32}P y ^{14}C se incorporan a los fosfolípidos del embrión , no incorporándose el ^{32}P a los fosfolípidos de la yema.

Con excepción de ciertos trabajos de Budowski y colaboradores (1.961), poco se conoce respecto a las variaciones que puedan ocurrir en la síntesis de fosfolípidos en diferentes órganos.

Respuesta a preguntas tales como ¿ Qué cantidad de fosfolípidos pueden ser sintetizados de " novo " en el embrión ?, no

las tenemos todavía.

En nuestros experimentos, grafica 6, la incorporación de glucosa U ^{14}C a fosfolípidos en diferentes tejidos revelan que 10 minutos después de la administración del isotopo la mayor radioactividad incorporada se encuentra en el hígado y 60 minutos después de la administración de la glucosa U ^{14}C la radioactividad incorporada en el hígado es de un 275 % mayor que la del corazón y de un 900 % mayor que la del músculo.

A los 120 minutos desde la administración del isotopo, la radioactividad acumulada en el hígado disminuye respecto de la encontrada a los 60 minutos mientras que en el corazón y en el músculo ocurre la situación contraria, es decir existe una mayor incorporación a los 120 minutos comparada con la que existía a los 60 minutos.

Respecto al tejido adiposo no se pudo encontrar para ninguno de los tiempos estudiados una incorporación neta de la glucosa U ^{14}C a fosfolípidos.

Debido a que en nuestras experiencias se usaron pollos de un día de edad en los cuales aún permanece el saco vitelino, la situación en estos animales es muy parecida a la que ocurre en los embriones de los últimos días del estadio del desarrollo:

Gómez Capilla (1.975a) y Gómez Capilla (1.975 b)

Noble y Moore (1.967), encuentran que en la yema el 80 % de los fosfolípidos son lecitinas , sin embargo en el hígado la proporción de cefalina aumenta respecto de la yema, siendo este hecho de importancia ya que como demuestran Noble y Moore (1.965), la fosfatidil-etanolamina se absorbe por el embrión en desarrollo más fácilmente que otros fosfolípidos de la yema. La mayoría de los fosfolípidos experimentan ruptura, sintetizando el hígado del embrión de pollo fosfolípidos de " novo " , aunque la semejanza en la composición de ácidos grasos de la esfingomielina en la yema y en el embrión, hacen deducir a Noble y Moore (1.967), que la esfingomielina puede pasar al embrión sin ruptura de fosfolípidos en el hígado.

Por otra parte Davison (1.958) al observar que el recambio de fosfolípidos en hígado es muy rápido comparado con el cerebro, sugiere que los fosfolípidos se sintetizan en el hígado y se trasladan a través de la sangre a otros órganos.

Todos estos hechos son consecuentes con nuestros resultados, los cuales vienen a demostrar que en el hígado se sintetizan fosfolípidos a partir de glucosa U ^{14}C ; el descenso de la radioactividad encontrada en el hígado a los 120 minutos en el presente

trabajo, se correlaciona con el incremento de la radioactividad para este mismo tiempo en músculo y corazón (grafica 6), sugiriendo que una vez sintetizados en el hígado los fosfolípidos se trasladan a través de la sangre al músculo y al corazón, viniendo este hecho reforzado por un aumento de los fosfolípidos radioactivos en plasma desde los 60 hasta los 120 minutos, desde la administración de la glucosa U - ¹⁴C (grafica 9).

EFECTO DE LA INSULINA SOBRE EL METABOLISMO DE GLUCOSA U ¹⁴C
=====

Hasta ahora hemos visto como, contrariamente a lo que sucede en el mamífero, el hígado del pollo es el mayor lugar de síntesis de triglicéridos, mientras que en el tejido adiposo la misión más importante parece ser la de almacenamiento de lípidos.

Igualmente nuestros resultados demuestran que la mayor incorporación de la glucosa radioactiva ocurre en triglicéridos, siendo de menor identidad la incorporación de ésta al resto de los lípidos estudiados, con excepción de los fosfolípidos del hígado.

La primera indicación de un modelo de metabolismo glucí dico distinto de aquellos modelos aceptados para los mamíferos , proviene del siglo XIX, a partir de las observaciones de Minkowski en especies aviares pancreatetectomizadas .

Estudios posteriores han demostrado que tanto en el pollo como en las aves en general, el metabolismo de los hidratos de carbono y de los lípidos, así como su control hormonal difieren en cierto modo de aquellos que operan en los mamíferos : Hazelwood (1.965) y Hazelwood (1.973) .

El papel de la insulina en el metabolismo de los lípidos y de los hidratos de carbono en las aves es incierto y se cuestiona si es esencial o no : Langslow y Freemann (1.972) y Hazelwood (1.971) , ya que el ave es resistente a las técnicas diabetogéni-

cas y a la administración de grandes dosis de insulina. Hasta ahora el papel que juega la insulina en los tejidos de las aves queda sin aclarar.

La producción de glucosa por los hepatocitos de pollo tanto en condiciones basales como estimuladas por hormonas, no se afecta para dosis de insulina por encima de 175 nM : Anderson (1.975).

La utilización de glucosa, la lipólisis basal y la proporción de lipólisis estimulada por glucagón en adipocitos de pollo, no se altera en respuesta a la insulina : Langslow (1.971).

Sin embargo los resultados de este trabajo claramente demuestran por primera vez, que existe una acción de la insulina " in vivo " en los tejidos aviares.

Efecto de la insulina sobre la incorporación de glucosa U-¹⁴C a Triglicéridos.-

Tras la administración de 0'75 UI/Kg. de pollo, se produce un incremento significativo de la síntesis de triglicéridos, que alcanza su mayor valor 60 minutos después de la administración de la hormona, siendo este incremento de un 107 % para el hígado (grafica 10), un 80 % para el tejido adiposo (grafica 11) , un 350 % para el corazón (grafica 12) y en músculo un 220 % (grafica 13),

existiendo igualmente un aumento significativo de los triglicéridos radioactivos plasmáticos (gráfica 14).

Así pues, los resultados de este trabajo demuestran que la insulina estimula " in vivo " la síntesis de triglicéridos en los tejidos adiposo y hepático del pollo, lo cual ocurre a un tiempo (60 minutos), en el que se produce un descenso máximo de la glucosa en plasma por efecto de la insulina (gráfica 2).

Efecto de la insulina sobre la incorporación de glucosa U ^{14}C a
Acidos Grasos Libres.

Respecto a los ácidos grasos libres, la insulina produce un aumento de la incorporación de glucosa U ^{14}C a los mismos, adquiriendo un valor máximo a los 60 minutos después de la administración de la hormona, tanto en tejido muscular (gráfica 15) como en tejido cardíaco (gráfica 16). No advirtiéndose tal efecto en el tejido hepático (gráfica 17), siendo en plasma significativo el incremento de los ácidos grasos libres radioactivos a los 30 y 60 minutos (gráfica 18).

El músculo cardíaco de las aves no ha sido tan extensamente estudiado como el músculo esquelético, a pesar de que el corazón del ave late de tres a siete veces más rápido y que su tamaño es siete veces mayor que el humano, en proporción al peso corporal.

En general, es conocido que las proteínas contribuyen muy poco o nada al metabolismo cardiaco en mamíferos y aves, que los glúcidos contribuyen en una cantidad definida pero relativamente pequeña al aporte energético y que la degradación de ácidos grasos, piruvato y lactato, dominan la energética cardiaca.

Debido a la bioenergética de los músculos del vuelo y las demandas agudas del ciclo ponedor, el metabolismo cardiaco depende en gran medida de la capacidad de este tejido para extraer ácidos grasos libres, triglicéridos, cuerpos cetónicos, piruvato y lactato de la circulación para la utilización celular subsecuente.

Los triglicéridos de la dieta son utilizables como combustible cardiaco, así como para la síntesis de glicéridos. El uso de los lípidos como combustible metabólico requiere, la presencia de enzimas específicos (lipasas), en las cuales es rico el miocardio, que liberan los ácidos grasos para las subsecuentes reacciones de beta-oxidación en el corazón .

En estudios con corazones perfundidos o con músculo cardiaco " in vitro " de mamíferos, se ha demostrado que al menos el 85 % de la energía requerida por el tejido cardiaco es originada por el metabolismo de los ácidos grasos y de la cantidad total extraída de

los líquidos perfundientes, sólo una pequeña proporción (menos de un 15 %) se almacena en el tejido para su posterior utilización, no habiéndose comunicado aún estudios similares en las aves.

La captación y utilización de sustratos no glucídicos parece estar directamente relacionada con la cantidad ofrecida al miocardio por unidad de tiempo, y esta reduce simultaneamente la utilización de hidratos de carbono. Esta interrelación entre la utilización de hidratos de carbono y grasas por el músculo cardíaco responde rapidamente a influencias nutricionales, hormonales y humorales.

La mayoría de estas influencias, actúan aumentando la actividad de la lipasa cardíaca, en las ocasiones que es necesario un incremento del metabolismo cardíaco. De este modo, el ejercicio, el ayuno, la liberación de catecolaminas y la deficiencia insulínica, aumentan grandemente la utilización de los ácidos grasos.

Se puede asegurar que el metabolismo de los ácidos grasos es el preferido por el músculo cardíaco de los animales de sangre caliente, punto este confirmado por el aumento de las reservas del glucógeno cardíaco en pollos después de cuarenta y ocho horas de ayuno . Así pues en las aves al igual que en el mamífero, los lípidos pueden servir como una fuente importante de energía en las

células del músculo.

En el diafragma aislado de rata el metabolismo de los lípidos parece ser responsable del consumo de oxígeno : Gemmill (1.941) ; Neptune y colaboradores (1.959) y en el antebrazo humano la cantidad de ácidos grasos libres captados, sería responsable de un 50 % del consumo de oxígeno : Rabinowitz y Zeerler (1.962). En el corazón aislado de rata, la oxidación de ácido palmítico es responsable del 60 % del CO_2 : Opie (1.963).

El mayor efecto de la insulina en músculo parece ser la conversión de este modelo, en uno en el cual domine el metabolismo de la glucosa . Todo esto hace pensar que el incremento debido a la insulina, de la radioactividad incorporada a ácidos grasos libres en músculo esquelético y corazón en nuestros experimentos, sea debido precisamente a que la insulina estimula preferentemente la oxidación de la glucosa y por lo tanto disminuye la oxidación de los ácidos grasos libres. Así, se ha encontrado que la insulina tiene una acción sobre la oxidación de ácido palmítico en el diafragma de rata, pero solamente en presencia de glucosa : Fritz y Kaplan (1.960) ; Bodell y colaboradores (1.962).

Efecto de la insulina sobre la incorporación de glucosa U ^{14}C a Colesterol.-

Los resultados obtenidos de la influencia de la insulina sobre la incorporación de glucosa U ^{14}C a colesterol libre y esterificado, revelan que sólo hubo un incremento debido a la acción de la hormona en el colesterol esterificado de hígado (gráfica 19); mientras que el colesterol libre en este mismo tejido (gráfica 20), no se modifica por la administración de insulina, lo que hace suponer que el incremento producido en el colesterol esterificado hepático, sea debido a la mayor incorporación del isotopo radioactivo a los aci dos grasos que esterifican la molécula del colesterol.

Efecto de la insulina sobre la incorporación de glucosa U ^{14}C a Fosfolípidos.-

Los resultados obtenidos de la influencia de la insulina sobre la incorporación de glucosa U ^{14}C a fosfolípidos, demuestran que se produce un aumento significativo de la incorporación del isó topo radioactivo a los fosfolípidos hepáticos (gráfica 21), ya desde los 30 minutos después de la administración de la hormona. En tejido adiposo siguen sin detectarse fosfolípidos radioactivos, aún después de la administración de la insulina; mientras que en músculo y corazón (graficas 22 y 23), sólo se produce un ligero

aumento que es estadísticamente significativo a los 30 minutos después de la administración de insulina para el músculo cardíaco, mientras que en músculo esquelético el aumento es estadísticamente significativo a los 30 y 60 minutos después de la administración de la hormona.

En plasma los fosfolípidos radioactivos aumentan por acción de la insulina, sólo a los 30 minutos desde la administración de la hormona (gráfica 24).

CONSIDERACIONES FINALES

Todos los resultados obtenidos " in vivo " en este trabajo, confirman y completan los resultados obtenidos por otros investigadores : Gomez Capilla - Langslow (1.977), los cuales demostraron por primera vez, que en adipocitos aislados de pollo responden a la insulina a dosis fisiológicas aumentando la síntesis de triglicéridos, captación de glucosa y producción de CO_2 .

La insensibilidad de los tejidos del pollo a la insulina, se habrá justificado hasta ahora por el hecho de usar insulinas no homólogas en especies aviares : Smith (1.966) y Hazelwood (1.973). Sin embargo tanto la insulina bovina como la de pollo tienen idénticas acciones y potencias similares en tejidos de pollo " in vitro " : Goodridge (1.968 a) ; Langslow y Hales (1.969) y Langslow (1.970).

Se han encontrado pequeñas diferencias " in vivo " : Hazelwood y colaboradores (1.968), pero que son insuficientes para hacerla responsable de la falta de respuesta hormonal " in vitro " de insulinas no homólogas a concentraciones fisiológicas.

Hasta ahora sólo ha habido un trabajo en el cual se describe la existencia de un tejido aviar respondiendo a la insulina a concentraciones fisiológicas. En células de corazón aisladas de embrión de pollo, concentraciones de insulina del orden

0,7 nM. estimulan el transporte de aminoácidos y glucosa :
Guidotti y colaboradores (1.968) .

La insulina a dosis de 870 nM. estimula la captación de glucosa en el músculo " oblicuus abdominis externus " y en el " rectus abdominis " de pollo en experimentos realizados " in vitro " , aunque esta estimulación es pequeña : Langslow (1.970); mientras que nuestros resultados muestran como la insulina estimula " in vivo " , algunos procesos del metabolismo de la glucosa.

Igualmente nuestros resultados son consistentes, con el reciente hallazgo de uniones específicas de la insulina bovina y aviar a hepatocitos y eritrocitos aislados de pollo.

Aunque en el hígado la reacción de unión de la insulina, se caracteriza por una sensibilidad y afinidad aparente similar a la que se observa en hígado de rata, sin embargo en el hígado de pollo se encontró que existía unas cinco veces menos sitios de unión por mg. de proteína de membrana o por unidad de superficie celular, que la que existe en el hígado de rata : Simon y colaboradores (1.977).

Este hecho puede explicar, porqué el mayor incremento en la síntesis de triglicéridos producido por la insulina en

nuestros experimentos (aproximadamente 110 %) , es más pequeño que el producido en la rata : Goodridge (1.968) ; Rodbell (1.964) y en parte puede explicar la resistencia a la insulina observada en el pollo.

En conclusión nuestros resultados sugieren fuertemente que en el pollo, tanto el tejido adiposo como el muscular y hepático son sensibles a la acción de la insulina , pudiendo ser los responsables del descenso de la glucosa plasmática que se produce, cuando se administra la hormona.

CONCLUSIONES

- 1ª).- La Insulina produce hipoglucemia significativa en pollos de un día de edad, para dosis comprendidas entre (0'375- 6) U.I./Kg. de pollo, siendo la dosis de 0'75 U.I./Kg. de pollo la que produce el mayor descenso plasmático de glucosa.
- 2ª).- La síntesis " in vivo " de Triglicéridos y Acidos Grasos Libres a partir de glucosa, ocurre preferentemente en el hígado del pollo de un día de edad.
- 3ª).- El tejido adiposo del pollo de un día de edad, posee escasa capacidad de síntesis " in vivo " de Acidos Grasos Libres y Triglicéridos.
- 4ª).- El músculo esquelético y cardíaco del pollo de un día de edad, posee capacidad de síntesis " in vivo " de Triglicéridos, aunque muy inferior a la del tejido hepático.
- 5ª).- Solamente el tejido hepático del pollo de un día de edad, posee capacidad de síntesis " in vivo " de Colesterol Libre y Esterificado.
- 6ª).- La incorporación " in vivo " de glucosa a Fosfolípidos, en pollos de un día de edad, es mayor en el tejido hepático comparandola con el resto de los tejidos estudiados, siendo nula esta incorporación en tejido adiposo.

7ª).- Dosis de Insulina de 0'75 U.I./Kg. de pollo, estimulan " in vivo " la síntesis de Triglicéridos tanto en tejido adiposo como hepático.

8ª).- Dosis de Insulina de 0'75 U.I./Kg. de pollo, estimulan " in vivo " la incorporación de glucosa a Acidos Grasos Libres, tanto en músculo esquelético como cardíaco.

9ª).- Dosis de Insulina de 0'75 U.I./Kg. de pollo, estimulan " in vivo " la incorporación de glucosa a Colesterol Esterificado hepático.

10ª).- Dosis de Insulina de 0'75 U.I./Kg. de pollo, estimulan " in vivo " la incorporación de glucosa a Fosfolípidos hepáticos, así como en un menor rango de incorporación a Fosfolípidos del músculo esquelético y cardíaco.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON C.E. and LANGSLOW D.R.: Biochem. Soc. Trans. 3 : 1.037,
(1.975).
- BALL E.G. and MERRILL M.A.: Endocrinology. 69 : 596, (1.961).
- BALLARD F.J. and OLIVER I.T.: Biochim. Biophys. Acta 71 : 578,
(1.963).
- BECKMAN B.E.: Endocrinology. 59 : 708, (1.956).
- BELL D.J.: Quart. J. Exp. Physiol. 42 : 410, (1.957).
- BELL D.J. and STURKIE P.D.: Avian Physiology. Comstock. Ithaca,
New York (1.965).
- BERNHARD K.: Helv. Chim. Acta 24 : 1.094, (1.941).
- BIERMAN E.L.; SCHWARTZ I.L. and DOLE V.P.: Amer. J. Physiol. 191 :
395, (1.957).
- BODEL P.T.; RUBINSTEIN D.; MC GARRY E.E.; BECK J.C.: Amer. J.
Physiol. 203 : 311, (1.962).
- BOGNER A.P.H. : Dissert Abst. 17 : 2.654, (1.957).
- BOGNER A.P.H. and HAINES I.A. : Anat. Rec. 137 : 342, (1.960)
- BOGNER A.P.H. and HAINES I.A. : Proc. Soc. Exp. Biol. and Medic.
107 : 265, (1.961).
- BONDAREVA V.M. : Dokl. Akad. Nauk SSSR, Otd. Biokh. 19 : 247,
(1.970).
- BORNSTEIN J. : J. Biol. Chem. 205 : 513, (1.953).
- BRANSON H.; BROOKS M. and PIPER P.F. : Science. 112 : 357, (1.950).

- BUDOWSKI P.; BOTTINO N.R. and REISER R. : Arch. Biochem. Biophys.
93 : 483, (1.961).
- BURTON K.: Biochem. J. 62 : 315 , (1.956).
- CAMERINO P.W. and WRIGHT C.D.: J. Lipid. Res. 3 : 416, (1.962).
- CARLSON L.A.; LILJEDAHL S.; VERDY M. and WIRSEN C. : Metabolism.
13 : 227, (1.964).
- CASSIDY C.J.; DWORKIN S. and FINNEY W.H.: Am. J. Physiol. 75 : 609,
(1.925).
- CHEN K.K.; ANDERSON R.C., and MAZEN N.: J. Pharm. and Exp. Therap.
84 : 74, (1.945).
- COLCA J.R.; and HAZELWOOD R.L.: General and Comparative Endocrinology
28 : 151, (1.976).
- CONNOR W.E.; OSBORNE J.W.; and MARION W.L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med.
118 : 710, (1.965).
- CONNOR W.E.; JOHNSTON R. and LIN D.S. : J. Lipid Res. 10 : 338, (1.969).
- COROMINAS A. and PERMANYER J.J.: Vol 1 Lípidos y lipoproteinas. Edito-
rial Científico Médica, Barcelona (1.972).
- CZYZYK A.; TAMECKI J.; SADOWSKI J.; PONIKWOSKA I. and SZEZEPANIK Z.:
Diabetes 17 : 492, (1.968).
- DAM H.: Biochem. Z. 215 : 468, (1.929).
- DALTON A.J.: Anat. Rec. 68 : 393, (1.937).
- DAVISON A.N.; DOBBING J.; MORGAN R.S. and WRIGHT G.: J. Neurochem
3 : 89, (1.958).

- DOLE V.P.: J. Clin. Invest. 35 : 150, (1.956).
- ELLIS G.W. and GARDNER J.A.: Proc.Roy. Soc. Ser. B. Biol. Sci.
81 : 129, (1.909).
- ENGELS F.L.; KINSELL In, L.W. (ed.): Adipose Tissue as an organ,
Charles C. Thomas, Spring Field, Ill.pp 126-172, (1.962).
- FAVARGER.: Handbok of Physiology. Section 5 : Adipose Tissue Chap 4,
(1.965).
- FELICOLI R.A.; GABRIELLI F. and ROSSI C.A. : Eur. J. Biochem 3 : 19,
(1.967).
- FISH W.A.; BOYD J.E. and STOKES W.M.: J. Biol. Chem 237 : 334,(1.962)
- FREEMAN B.M.: Comp. Bioch. Physiol. 28 : 1.169, (1.969).
- FRITZ I.B. and KAPLAN E. : Amer. J. Physiol 198 : 39, (1.960).
- GARCIA MARTINEZ J.; SEGOVIA J.L.; SUAREZ M.D. and GARCIA PEREGRIN E.:
Biochemical and Biophysical Research Communications Vol 72, nº 1(1.976).
- GEORGE J.C. and IYPE P.T.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109: 826, (1.962).
- GEMMILL C.L.: Bull. Jonhs. Hopk. Hosp. 68 : 329, (1.941).
- GILL P.M.: Biochem. J. 32 : 1.792, (1.938).
- GOLDEN W.R.C. and LONG C.N.H.: Endocrinol 30 : 675, (1.942).
- GOMEZ - CAPILLA J.A. and LANGSLOW D.R.: Int. J. Biochem. 8 : 417, (1.977).
- GOMEZ - CAPILLA J.A.;MACARULLA J.M.; MARTIN ANDRES Y OSORIO C.: Revista
Española de Fisiología 31 : 173, (1.975 a).

- GOMEZ - CAPILLA J.A.; MACARULLA J.M.; MARTIN ANDRES Y OSORIO C. :
 Revista Española de Fisiología. 31 : 177, (1.975 b).
- GOODRIDGE A.G.: Comp. Biochem. Physiol. 13 : 1, (1.964).
- GOODRIDGE A.G.: American Journal of Physiology. Vol 214, nº 4 ,
 (1.968 a).
- GOODRIDGE A.G.: Biochem J. 108 : 655, (1.968 b).
- GOODRIDGE A.G. and BALL E.G.: Am. J. Physiol. 211 : 803, (1.966).
- GOODRIDGE A.G. and BALL E.G.: Am. J. Physiol. 213 : 245, (1.967).
- GORDON R.S. Jr. and CHERKES A.: J. Clin. Invest. 35 : 206, (1.956).
- GREENMAN D.L. and ZARROW M.X.: Proc. Soc. Exp. Biol and Med. 106 :
 459, (1.961).
- GROEN J.; KAMMINGA D.; WILLEBRANDS A. and BLICKMAN J.: J. Clin. Invest.
 31 : 97, (1.952).
- GRILLO T.A.I.: J. Endocrinol. 22 : 285, (1.961).
- GUIDOTTI G.G.; BORGUETTI A.F.; GAJA G.; LORETI L.; RAGNOTTI G. and
 FOA P.P.: Biochem. J. 107: 565, (1.968).
- GUIDOTTI G. and FOA P.P.: Am.J. Physiol. 201 : 869, (1.961).
- HALEVY S. and GEYER R.P.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 108 : 6, (1.961).
- HAZELWOOD R.L.: Endocrinol. 63 : 611, (1.958).
- HAZELWOOD R.L.: Int: Avian Physiology (P.D. Sturkie, ed.) 2 nd. edition
 pp 313. Ithaca. New York. Cornell University Press. (1.965).

- HAZELWOOD R.L.: Carbohydrate metabolism. In avian Physiology .
 (Edited by Sturkie P.D.) Chap 12, pp 350 - 351. Comstock Press,
 New York (1.967).
- HAZELWOOD R.L.: Am. Zool. 13 : 699, (1.973).
- HAZELWOOD R.L.; HAZELWOOD B.S. and MCNARY W.F.: Endocrinol 71: 334,
 (1.962).
- HAZELWOOD R.L.; KIMMEL J.R. and POLLOCK H.G.: Endocrinology 83: 1.331,
 (1.968).
- HAZELWOOD R.L.; KIMMEL J.R. and POLLOCK H.G.: Comp. Biochem.Physiol.
 398 : 267, (1.971).
- HAZELWOOD R.L. and LORENZ F.W.: Endocrinol. 61 : 520,(1.957).
- HAZELWOOD R.L. and LORENZ F.W. Am. J. Physiol. 197 : 47, (1.959).
- HEALD P.J.; MCLAUCHLAN P.M. and ROODLEDGE K.A.: Endocrinology.
 83 : 1.331, (1.965).
- HECKERMAN R.O.: Dissert. Abst. 15 : 667, (1.955).
- HELLERSTRÖM C.: Z.F. Zellforschung. 60 : 688, (1.963).
- HELLMAN. Bo.: Acta Endocrinol. 36 : 603, (1.961).
- HEVESY G.C.; LEVY H.B. and REBBE D.H.: Biochem J. 35 : 2.147, (1.938).
- HIMMELMANN B. and KERN H.F.: Z.Mikro- Anat. Forschung. 83 : 369,(1.971).
- HONEYWELL H.E. and RIDDLE O.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 20 : 248,
 (1.923).
- HOUP T.R. : Poultry Sci. 37 : 1.452, (1.958).

- HSIEH K.; WANG T. and BLUMENTHAL H.T.: *Endocrinol.* 51 : 298, (1.952).
- HUBER A.M. and GERSHOFF S.N.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 121 : 227,
(1.966).
- KARG H. and SHAMS D.: *Berl. Münch Tierärztl. Wchsech.* 79 : 434,(1.966).
- KILSHEIMER G.S.; WEBER D.R. and ASHMORE J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and
Med.* 104 : 515, (1.960).
- KIMMEL J.R.; POLLOCK G.H. and HAZELWOOD R.L.: *Endocrinology.* 83 : 1.323,
(1.968).
- KOIKE T.I.; NALBANDOV A.V.; DIMICK M.K.; MATSUMURA Y. and LEPKOVSKY S.:
Endocrinology 74 : 944, (1.964).
- KONIGSBERG I.R.: *J. Exp. Zool.* 125: 151, (1.954).
- KUN E.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 83 : 532, (1.953).
- LANGSLOW D.R. and HALES C.N.: *J. Endocrinol.* 43 : 285, (1.969).
- LANGSLOW D.R.: *Studies on the regulation of carbohydrate and lipid
metabolism in the domestic fowl Ph.D. Thesis. University of Cambridge,*
(1.970).
- LANGSLOW D.R.: *Biochim. Biophys. Acta (Amst.).* 239 : 33, (1.971).
- LANGSLOW D.R.: *Br. Poult. Sci.* 16 : 329, (1.975).
- LANGSLOW D.R. and FREEMANN B.M.: *Diabetologia.* 8 : 206, (1.972).
- LANGSLOW D.R. and HALES C.N.: *In the Physiology and Biochemistry of
the Domestic Fowl (Edited by BELL D.J. and FREEMAN B.M.) pp 521-547,*
Academic Press. London. (1.971).

- LANGSLOW D.R. and LEWIS R.J.: *Comp. Biochem. Physiol.* 43 B : 681, (1.972).
- LANGSLOW D.R.; BUTTLER E.J.; HALES C.N. and PEARSON A.W.: *J. Endocrinol.* 46 : 243, (1.970).
- LANGSLOW D.R.; FREEMAN B.M. and BUCHANAN K.D.: *Comp. Biochem. Physiol.* 46 A : 473, (1.973).
- LEIBSON L.G.: *Biol. Neonate.* 9 : 249, (1.965).
- LEIBSON L.G.; ZHELUDKOVA Z.P. and CHILINGARYAN L.I.: *Biull. Ekspt. Biol. i Med.* 52 : 768, (1.961).
- LEPKOVSKY S.; DIMICK M.K.; FURUTA F.; SNAPIR N.; PARK R.; NARITA N. and KOMATSU K.: *Endocrinology* 81 : 1.001, (1.967).
- LEVEILLE G.A.: *J. Nutr.* 90 : 449, (1.966).
- LEVEILLE G.A.: *Comp. Biochem. Physiol.* 28 : 431, (1.969 a).
- LEVEILLE G.A.: *Comp. Biochem. Physiol.* 28 : 733, (1.969 b).
- LEVEILLE G.A.; O'HEA E.K. and CHAKRABARTY K.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 128 : 398, (1.968).
- LIEVRE F.: *Arch. Anat. Microscop. et Morph. Exp.* 46 : 61, (1.957).
- LUKENS F.D.W.: *Physiol. Rev.* 28 : 304, (1.948).
- MCCALLION D.J. and WONG W.T.: *Canad. J. Zool.* 34 : 63, (1.956).
- MIAHLE P.: *Acad. Sci. (Paris)*. 241 : 1.851, (1.955 a).
- MIAHLE P.: *Acad. Sci. (Paris)*. 241 : 1.500, (1.955 b).
- MIAHLE P.: *Acta Endocrinol.* 36, suppl. 9 : 134, (1.958).

- MIAHLE P.: Proc. 3 rd. Int. Conf. Endocr. México. 158 : 163, (1.969).
- MILLER R.A. and RIDDLE O.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 47 : 449,
(1.941).
- MIRSKY I.A. and GITELSON S.: Endocrinol. 61 : 148, (1.957).
- MIRSKY I.A. and GITELSON S.: Endocrinology. 63 : 345, (1.958).
- MIRSKY I.A. and GITELSON S.: Endocrinology. 71 : 464, (1.962).
- MIKAMI S.I. and ONO K.: Endocrinology. 71 : 464, (1.962).
- MINKOWSKI O.: Arch. Pharmak. 31 : 85, (1.957).
- NEEDMAN J.: Chemical Embriology. 2 : 1.218, (1.931).
- NELSON P.; YARNELL G. and WAGLE S.R.: Archs. Biochem. Biophys.
114 : 543, (1.966).
- NEPTUNE E.M.; SUDDUTH H.C.; FASH F.J. and FOREMAN D.R.: Amer. J.
Physiol. 196 : 269, (1.959).
- NOBLE R.C. and MOORE J.H.: Can. J. Biochem. 43 : 1.677, (1.965).
- NOBLE R.C. and MOORE J.H.: Can. J. Biochem. 45 : 949, (1.967).
- NOVIKOFF A.B.; POTTER VAN R. and LE PAGE.: J. Biol. Chem. 173 : 239,
(1.948).
- OAKBERG E.F.: Am. J. Anat. 84 : 279, (1.949).
- O'HEA E.K. and LEVEILLE G.A.: Comp. Biochem. Physiol. 26 : 111, (1.968).
- O'HEA E.K. and LEVEILLE G.A.: Comp. Biochem. Physiol. 30 : 149, (1.969).
- OPDYKE D.F.: Endocrinology 31 : 363, (1.942).
- OPIE L.H.; EVANS J.R.; SHIPP J.: Amer. J. Physiol. 205 : 1.203, (1.963).

- PITTMAN R.P. and HAZELWOOD R.L.: *Comp. Biochem. Physiol.* 45 A : 141, (1.973).
- PRZYBYLSKI R.J.: *Gen. Comp. Endocr.* 8 : 115, (1.967).
- RABEN M.S.; In RENOLD A.E. and CAHILL G.F.; Jr. (eds.): *Handbook of Physiology*, Waverly Press, Baltimore, pp 331-334, (1.965).
- RABINOWITZ D. and ZIERLER K.L.: *J. Clin. Invest.* 41 : 2.191, (1.962)
- RAHEJA K.L.; TEPPERMAN H.M. and TEPPERMAN J.: *Horm. Metab. Res.* 4 : 69, (1.972).
- RANDLE P.J.: *Fdn. Colloq. Endocr.* 11 : 115, (1.957).
- RIDDLE O. and OPDYKE D.F.: *Carnegie. Institute Publ.* 569 : 49, (1.947).
- RINAUDO M.T.: *Experientia* 17 : 30, (1.961).
- RITTENBERG D. and SHOENHEIMER R.: *J. Biol. Chem.* 121: 235, (1.937).
- RODBARD S. and GOLDSTEIN M.S.: *Am. J. Physiol.* 162 : 175, (1.950).
- RODBELL M.: *J. Biol. Chem.* 239 : 375, (1.964).
- ROMANOFF A.L. and A.J. ROMANOFF.: *The avian Egg.* John Wiley and Sons, New York. (1.949).
- ROMIJN C. and LOKHORST B.A.: *J. Physiol. Lond.* 150 : 239, (1.960).
- SANTIAGO E.; GANSER A.; MACARULLA J.M. and GUERRA F.: *Rev. Esp. Fisiol.* 24 : 37, (1.968).
- SARCIONE E.J.; BACK N.; SOKAL. J.; BEHLMAN B. and KNOBLOCK E.: *Endocrinol.* 72 : 523, (1.963).
- SATO K.K.; HOMMA K. and GOTOH J.: *Jap. J. Vet. Sci.* 22 : 155, (1.960).

- SCOTT C.C.; HARRIS P.N. and CHEN K.K.: *Endocrinology* 37 : 201, (1.945).
- SHOEMAKER W.C.; CARRUTHERS D.J.; ELWYN D.H. and ASHMORE J.: *Amer. J. Physiol.* 203 : 919, (1.962).
- SIEGEL H.S.: *Poultry Sci.* 41 : 321, (1.962).
- SIMON J.; FREYCHET and ROSSELIN G.: *Diabetologia* 13 : 219, (1.977).
- SITBON G.: *Diabetologie* 3 : 427, (1.967).
- SMITH L.F.: *Am. J. Med.* 40 : 662, (1.966).
- SNEDECOR J.G. and KING D.B.: *Anat. Rec.* 137 : 393, (1.960).
- SNEDECOR J.G.; MATHEW and MACGRATH W.B.: *Poultry Sci.* 35 : 355, (1.956).
- SPRATT N.T., Jr.: *J. Exp. Zool.* 110 : 273, (1.949).
- SPRATT N.T., Jr.: *J. Exp. Zool.* 114 : 375, (1.950).
- STEINBERG D. and VAUGHAN M.; In RENOLD A.E. and CAHILL G.F., Jr (eds.):: *Handbook of Physiology*, Waverly Press, Baltimore, pp 335-347, (1.965).
- STOKES W.M.; FISH W.A. and HICKEY F.C.: *J. Biol. Chem.* 200 : 683, (1.953).
- STOKES W.M.; FISH W.A. and HICKEY F.C.: *J. Biol. Chem.* 220 : 415, (1.956).
- STOWERS J.M. and BEWISHER P.D.: *Excerpta Médica*, Sweden (1.967).
- STUMPF P.K.: *Fed. Proc.* 6 : 296, (1.947).
- STURKIE PAUL D.: *Avian Physiology* 2ª Edición pp 259 Editorial: Comstock. Publ. Ass. A. división of Cornell University Press. (1.967).
- STURKIE PAUL D.: *Avian Physiology* 2ª Edición pp 270 Editorial: Comstock. Publ. Ass. A. división of Cornell University Press. (1.967).

- STURKIE PAUL D.: Avian Physiology 2ª Edición pp 271 Editorial : Comstock.
Publ. Ass. A. división of Cornell University Press. (1.967).
- STURKIE PAUL D.: Avian Physiology 2ª Edición pp 285 Editorial : Comstock.
Publ. Ass. A. división of Cornell University Press. (1.967).
- TAPPER D.N. and KARE M.R.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 92 : 120 (1.956).
- TSUJI F.I.; BRIN M. and WILLIAMS H.H.: Arch. Biochem. Biophys. 56 : 290,
(1.955).
- VAUGHAN M.; In RODAHL K. and ISSEKUTZ B.: Jr (eds), Fat as a Tissue,
Mc Graw - Hill Book Co., New York, pp 203-214, (1.962).
- VUYLSTEKE C.A. and DUVE C.: Arch. Internat. Physiol. 61 : 273, (1.953).
- WALLACE J.C. and NEWSHOLME E.A.: Bioch. J. 104 : 378, (1.967).
- WANG. T.Y.; WANG K.M. and BLUMENTHAL.: Fed. Proc. 11 : 433,(1.952).
- WILLEBRANDS A.; GELD H. and GROEN J.: Diabetes 7 : 119, (1.958).
- WEISS J.S.; NABER E.C. and JOHNSON R.M.: J. Nutr. 93 : 142, (1.967).
- YARNELL G.R.; NELSON P.A. and WAGLE S.R.: Archs. Biochem. Biophys. 114 :
539, (1.966).

DILIGENCIA

Reunido el Tribunal examinador en el día de
la fecha, constituido por:

- D. Fernán Espitia García
- D. Carlos Osorio Pérez
- D. Fernán Suárez de Medina
- D. Edoardo Germán Bergin
- D. José Antonio Gómez Espillo

para juzgar la Tesis Doctoral del Licenciado D.

José María Suárez Martínez
se acordó por unanimidad otorgar la calificación
de Sobresaliente con Lode

y para que conste, se extiende firmada por los
componentes del Tribunal, la presente diligencia.
cia.

Granada, a 22 de Abril de 1979

El Secretario,

El Presidente,

[Signature]
El Vocal,

[Signature]
El Vocal,

[Signature]
El Vocal,

[Signature]

[Signature]

[Signature]