

REGULACION HORMONAL DEL METABOLISMO DE GLUCOSA EN ISLOTES DE LANGERHANS

María Inés Borelli\*, Ana María Cortizo\*\*, Elma Edith P. de Gagliardino\*\*\*, María Elisa García\*\*\*\* y Juan José Gagliardino\*

CENEXA-Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (UNLP-CONICET), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, 60 y 120, 1900 La Plata, Argentina

(Recibido en su forma final Junio 19, 1985)

SUMMARY

BORELLI, M. I., CORTIZO, A. M., GAGLIARDINO, E. E. P. de, GARCIA, M. E., GAGLIARDINO, J. J. Hormonal regulation of glucose metabolism in isolated islets of Langerhans. Insulin secretion and glucose metabolism were simultaneously studied in isolated islets obtained from normal, endocrine-deficient (adrenalectomized, ovariectomized and radiothyroidectomized) rats as well as from this latter group of rats previously submitted to specific substitutive therapy. The islets from all the endocrine-deficient rats showed clear and similar changes in both the insulin secretion and the metabolism of glucose, being the correlation between the degree of these two alterations highly significant. All the above mentioned abnormalities were corrected by the administration of the corresponding substitutive therapy. These results suggest that the hormones involved in this study could modify the B cell insulin secretion by changing their capacity to metabolize glucose. Key words: insulin secretion, glucose metabolism, islets of Langerhans, hormone deficiency, adrenal glands, thyroid, ovaries.

INTRODUCCION

La secreción de insulina en respuesta a la glucosa depende de la metabolización de la hexosa a nivel insular, la que a su vez está en relación con su concentración extracelular (1,2,3). Si bien los mecanismos moleculares que explican el efecto de la glucosa sobre la célula B no se conocen completamente, se han postulado varias hipótesis: acciones directas como interacciones a nivel de las membranas, cambios en la concentración de cofactores o intermediarios glucolíticos, o acciones indirectas de diversos factores extracelulares sobre la oxidación de glucosa.

Por otra parte, numerosos autores han descripto los cambios en la respuesta secretora de insulina relacionada con los niveles circulantes de distintas hormonas (4-12), desconociéndose los cambios que inducen a nivel insular para provocar estas alteraciones.

Con el objeto de obtener respuesta para algunos de estos interrogantes, hemos estudiado simultáneamente la secreción de insulina y la oxidación de glucosa en islotes aislados de ratas normales, adrenalectomizadas, ovariectomizadas e hipotiroideas. Posteriormente, se realizaron los mismos estudios en estos animales sometidos a terapia sustitutiva específica.

\*Miembros de la Carrera del Investigador, CONICET.

\*\*Miembro de la Carrera del Investigador, CICPBA.

\*\*\*Miembro de Carrera del Personal de Apoyo, CONICET.

\*\*\*\*Miembro de Carrera del Personal de Apoyo Profesional, CICPBA.

### MÉTODOS

Animales y preparación de islotes: Se emplearon ratas Wistar de ambos sexos para la obtención de islotes aislados por digestión con colagenasa (Serva Feinbiochemica, Heidelberg) (13). Los animales fueron apareados por edad y peso en el momento de las ectomías, dejando en cada grupo experimental animales de la misma edad que se utilizaron como controles normales (N) para cada experimento.

Se usaron varios grupos experimentales. Ratas hembra (150-200 gm de peso): adrenalectomizadas (A); adrenalectomizadas tratadas con dexametasona (300 µg/rata/día) (AD); ovariectomizadas (O); ovariectomizadas con tratamiento combinado de estrógeno-progesterona (0.01 mg-5 mg/rata/día) (OEP). Ratas macho (100 gm de peso), se radiocoyndotiroidectomizaron mediante una inyección intraperitoneal de <sup>131</sup>I (700 µCi/rata) (H); 30 días después parte de estos animales fueron sometidos a tratamiento con T<sub>4</sub> (1.75 µgm T<sub>4</sub>/100 gm/día) (HT).

Los animales del grupo A fueron utilizados siete días después de la operación.

En el grupo AD, el tratamiento sustitutivo comenzó inmediatamente después de la adrenalectomía y continuó durante cuatro días, administrándoles durante ese lapso una solución de ClNa al 0.9% en el agua de bebida.

Los animales del grupo O fueron utilizados catorce días después de la operación.

En el grupo OEP, el tratamiento esteroideo empezó después de este período y se efectuó durante tres días.

Las ratas H fueron utilizadas cinco semanas después de la inyección de <sup>131</sup>I. El grado de disfunción tiroidea alcanzado por los animales H y HT se evaluó mediante el control del crecimiento corporal individual (H=190 gm vs. N=290 gm) y los niveles circulantes de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> por radioinmunoensayo (Kit de Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, Ca.). En los animales H los niveles circulantes de hormonas tiroideas alcanzaron valores similares a los de los animales N, diez días después de comenzada la administración de T<sub>4</sub>.

Secreción de insulina: Grupos de 10 islotes fueron incubados durante 60 minutos a 37°C en 1 ml de "buffer" Krebs Ringer bicarbonato (KRB), pH 7.4, con 1% de albúmina sérica bovina (BSA) (fracción V, Sigma Chemical Co., Saint Louis, Mo.), un inhibidor de proteasas (400 IU/ml) (Trasylo1®) (B), 100 000 KIU, Bayer Argentina) y glucosa 3.3 ó 16.6 mmol/l. La preparación fue previamente gaseada con una mezcla de 95% O<sub>2</sub>:5% CO<sub>2</sub> (14). Al final de la incubación, se tomaron alícuotas del medio para el dosaje de insulina por radioinmunoanálisis (15).

Las determinaciones de insulina en los grupos A, AD, O y OEP se realizaron empleando un suero antiinsulina con el cual se obtuvieron valores más bajos que en la serie H y HT en la cual se empleó otro antisuero. Además, en los primeros se utilizó como estándar insulina porcina, mientras que en los últimos se empleó insulina de rata.

Oxidación de glucosa: Grupos de 20 islotes se incubaron durante 2 horas a 37°C en "buffer" KRB con (U-<sup>14</sup>C) glucosa (345 mCi/mmol, New England Nuclear, Boston, Mass.) en presencia de glucosa 3.3 ó 16.6 mmol/l. La producción de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> fue medida como ya fuera descrito previamente (1).

Análisis estadístico: Los resultados fueron analizados por la prueba de "t"

de Student (16).

RESULTADOS

En la Fig. 1 se observan los resultados correspondientes a secreción de insulina y oxidación de glucosa obtenidos en islotes aislados provenientes de distintos grupos experimentales. Se puede ver que la liberación de insulina de los islotes de animales con deficiencia hormonal en presencia de glucosa 3.3 mmol/l, no mostró diferencias significativas con respecto a sus respectivos controles. La liberación de insulina fue en cambio significativamente distinta cuando los islotes fueron estimulados con altas concentraciones de glucosa. En estas condiciones, la secreción de insulina fue menor en los islotes de ratas A y B ( $P < 0.001$ ) y mayor en los de ratas O ( $P < 0.001$ ) respecto a sus correspon-

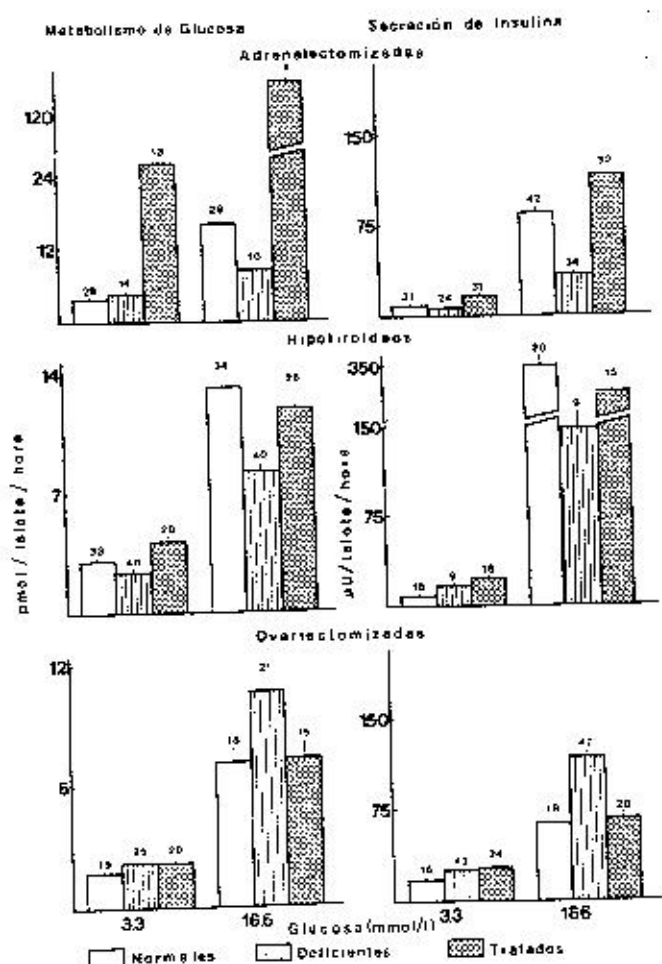


FIG. 1

Metabolismo de glucosa (izquierda) y secreción de insulina (derecha) de islotes aislados incubados en presencia de glucosa 3.3 y 16.6 mmol/l. Las barras representan  $\bar{X} \pm 1$  EEM; los números sobre cada barra indican número de casos.

dientes controles. Esta respuesta alterada de los islotes aislados fue corregida mediante la administración de terapia sustitutiva específica a los animales con déficit endocrino. Cabe destacar que las ratas HT en presencia de glucosa 3.3 mmol/l y las ratas AD en presencia de glucosa 3.3 y 16.6 mmol/l, liberaron más insulina que sus respectivos controles.

La producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $^{14}\text{C}$ -glucosa en condiciones basales (3.3 mmol/l) de los islotes de animales A y O, fue similar a la de sus controles, observándose, en cambio, diferencia significativa ( $P < 0.02$ ) en los del grupo H.

En presencia de 16.6 mmol/l, la oxidación de glucosa disminuyó significativamente en islotes de ratas A y H y aumentó en aquellos obtenidos de ratas O.

Al igual que en el caso de la secreción de insulina, en todas las condiciones experimentales probadas la terapia sustitutiva específica llevó los valores de oxidación de glucosa al rango normal o aún superior.

Con el objeto de determinar el grado de correlación entre los cambios obtenidos en el metabolismo de la glucosa y la respuesta secretoria de insulina en las distintas condiciones experimentales, se llevó a cabo un análisis de varianza y covarianza. Este estudio demostró la existencia de una correlación positiva altamente significativa entre la oxidación de glucosa y la secreción de insulina en todas las condiciones y grupos experimentales estudiados ( $P < 0.01$ ).

#### DISCUSION

La disminución de los niveles circulantes de esteroides adrenales, hormonas tiroideas, como así también de estrógenos y progesterona, consecutivos a la remoción de la glándula secretora correspondiente, provocaron una alteración en la secreción de insulina, confirmando lo anteriormente descrito por otros autores (4-12). En todos los casos se observó la aparición de una modificación similar en la oxidación de glucosa por parte de los islotes.

En condiciones de estímulo, la capacidad de respuesta secretoria, como así también la oxidación de glucosa por la célula B, se encontraron disminuidas en los animales A y H, mientras que en el grupo O estuvieron significativamente aumentadas con respecto al grupo N. Los resultados obtenidos de ambos parámetros estudiados alcanzaron o superaron los valores normales después de recibir la terapia sustitutiva específica.

Ya ha sido mencionada la estrecha relación entre secreción y metabolismo de glucosa en los islotes de Langerhans (25). Esa información y la correlación altamente significativa encontrada en nuestros experimentos entre las alteraciones ocurridas en ambos procesos, sugerirían que quizás el metabolismo de la glucosa podría ser la etapa común sobre la cual actúan las diferentes hormonas para regular la secreción de insulina.

Nuestros resultados experimentales no permiten asegurar si estos efectos son la consecuencia de una acción directa o indirecta de las hormonas sobre la función de la célula B. Sin embargo, en estas células se ha demostrado la existencia de receptores específicos para estrógenos (18), progesterona (19) y hormonas tiroideas (manuscrito en preparación), como así también el efecto de esteroides sexuales, adrenales y hormonas tiroideas en cultivo de islotes (6, manuscrito en preparación, 20, 21), todo lo cual sugiere un efecto directo de dichas hormonas sobre los islotes de Langerhans.

Se ha postulado que el paso limitante de la utilización de la glucosa en los islotes de Langerhans es el de la fosforilación a glucosa-6-P. Esta reacción es catalizada por dos enzimas, hexoquinasa y glucoquinasa, cuya presencia se ha demostrado a nivel del islote (22).

Se ha descrito que la actividad de la glucoquinasa hepática es modulada por diversos factores como el ayuno y la remoción de las adrenales y la tiroidea (23). Por consiguiente, la actividad de esta enzima insular podría también ser hormono-dependiente, siendo así el punto de partida de las alteraciones en la oxidación de glucosa y la secreción de insulina, descritos en las diferentes endocrinopatías estudiadas. Esta alteración, sumada al efecto de las hormonas sobre la captación neta de calcio por los islotes y su ultraestructura, que demostráramos recientemente (24, 25), explicarían el profundo efecto que ellas ejercen sobre la secreción de insulina.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente subsidiado con fondos del CONICET, CIC, Pcia. de Bs. As. y SUBCYT de Argentina. Los autores agradecen a las Sras. Ana María Galeano y Silvia Lunati por su colaboración técnica y dactilográfica respectivamente.

#### REFERENCIAS

- (1) ASHCROFT, S. J. H., HEDESKOV, C. J., RANDLE, P. J.: Glucose metabolism in mouse pancreatic islets. *Biochem. J.*, **118**: 143-154, 1970.
- (2) MATSCHINSKY, F. M., ELLERMAN, J. P.: Metabolism of glucose in the islets of Langerhans. *J. Biol. Chem.*, **243**: 2730-2736, 1969.
- (3) MATSCHINSKY, F. M., ELLERMAN, J. P., KRZANOWSKI, J., OTLER-BRAJTBURG, J. K., LANDGRAF, R., FERTEL, R.: The dual function of glucose in islets of Langerhans. *J. Biol. Chem.*, **246**: 1007-1011, 1971.
- (4) BATLEY, C. J., AHMED-SOROUR, H.: Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis. Effects on insulin secretion. *Diabetologia*, **19**: 475-481, 1980.
- (5) BORELLI, M. I., GARCIA, M. E., GOMEZ DUMM, C. L., GAGLIARDINO, J. J.: Glucocorticoids-induced changes in insulin secretion related to the metabolism and ultrastructure of pancreatic islets. *Horm. Metab. Res.*, **14**: 287-292, 1982.
- (6) BRUNSTEDT, J., HØIIRIS-NIELSEN, J.: Direct long-term effect of hydrocortisone on insulin and glucagon release from mouse pancreatic islets in tissue culture. *Acta endocr.*, (Copenh.), **96**: 498-504, 1981.
- (7) GAGLIARDINO, J. J., CORTIZO, A. M., PISAREV, M. A., CHAZENBALK, G. D., GOMEZ DUMM, C. L., GAGLIARDINO, E. P. de: Metabolic and ultrastructural effects of hypothyroidism upon endocrine pancreas. En: *Niepomiszcz, Pisarev, Proc. 1st Lat. Am. Thyroid. Congr. Mar del Plata 1982* (Panamericana, Mexico City, 1982), pp. 139-152.
- (8) GARCIA, M. E., BORELLI, M. I., GOMEZ DUMM, C. L., GAGLIARDINO, J. J., GAGLIARDINO, E. P. de: Functional and ultrastructural changes induced by short-term ovariectomy on pancreatic islets. *Horm. Metab. Res.*, **15**: 76-81, 1983.
- (9) LENZEN, S., JOST, H. G., HASSELBLATT, A.: Thyroid function and insulin secretion from the perfused pancreas in the rat. *Endocrinology*, **99**: 125-129, 1976.
- (10) MALAISSE, W. J., MALAISSE-LAGAE, F., MC CRAW, E. F.: Effects of thyroid function upon insulin secretion. *Diabetes*, **16**: 643-646, 1967.
- (11) MALAISSE, W. J., MALAISSE-LAGAE, F., MC CRAW, E. F., WRIGHT, P. H.: Insulin secretion "in vitro" by pancreatic tissue from normal, adrenalectomized, and cortisol-treated rats. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **124**: 924-928, 1967.
- (12) RODRIGUEZ, R. R.: The effects of sexual glands and steroids on diabetes in partially pancreatectomized rats. *Acta physiol. scand.*, **4**: 226-251, 1951.

- (13) LACY, P., KOSTIANOVSKY, M.: Method for the isolation of intact islets of Langerhans of the rat pancreas. *Diabetes*, 16:35-39, 1967.
- (14) GAGLIARDINO, J. J., NYERLE, C., PFEIFFER, E. F.: The effect of serotonin on "in vitro" insulin secretion and biosynthesis in mice. *Diabetologia*, 10:411-414, 1974.
- (15) HERBERT, V., LAU, K. S., COTTLIEB, CH. W., BLEICHER, S. J.: Coated-charcoal immunoassay of insulin. *J. clin. Endocr. Metab.*, 25:1375-1384, 1965.
- (16) BANCROFT, H.: *Introducción a la bioestadística*. (3a Ed.) (Eudeba, Buenos Aires, 1965) p. 141.
- (17) DAVIES, O.: *Statistical methods in research and production*. (Imperial, London, 1957) p. 182.
- (18) TRSONE, M., CHAZENBALK, C. D., BALLEJOS, B., CHARREAU, E. H.: Estrogen receptor in rat pancreatic islets. *J. Steroid Biochem.*, 11:1309-1314, 1979.
- (19) GREEN, J. C., HOWELL, S. L., EL-SEIFI, S., PERRIN, D.: Binding of <sup>3</sup>H-Progesterone by isolated rat islets of Langerhans. *Diabetologia*, 15:349-355, 1978.
- (20) HØJRIIS-NIELSEN, J., JØRGENSEN, R., JENSEN, D., BRUNSTEDT, K.: Direct long-term effects of natural and synthetic sexual steroids on pancreatic islets in tissue culture. *Acta endocr.*, (Copenh.), 94 (Suppl. 237):63A, 1980.
- (21) HOWELL, S. L., TYHRST, M., GREEN, J. C.: Direct effects of Progesterone on rat islets of Langerhans "in vivo" and in tissue culture. *Diabetologia*, 13:579-583, 1977.
- (22) TRUS, M. D., ZAWALICH, W. S., BURCH, P. J., BERNER, D. K., WEILL, V. A., MATSCHINSKY, P. M.: Regulation of glucose metabolism in pancreatic islets. *Diabetes*, 30:911-922, 1981.
- (23) SHARMA, CH., MANJESHWAR, R., WEINHOUSE, S.: Hormonal and dietary regulation of hepatic glucokinase. *Adv. Enzymic Reg.*, 2:189-200, 1963.
- (24) GOMEZ DUMM, C. I. A., GARCIA, M. E., BORELLI, M. I., CORTIZO, A. M., GAGLIARDINO, E. P. de, GAGLIARDINO, J. J.: Effect of the removal of different endocrine glands upon insulin secretion and B-cell ultrastructure. *Acta anat.*, 119:241-247, 1984.
- (25) BORELLI, M. I., CORTIZO, A. M., GAGLIARDINO, E. P. de, GARCIA, M. E., GAGLIARDINO, J. J.: Multiple modulators of the glucose-induced net calcium uptake by isolated islets. *Acta physiol. pharmacol. latinoam.*, 34:1-8, 1984.

#### RESUMEN

Se ha estudiado simultáneamente la secreción de insulina y el metabolismo de glucosa en islotes aislados, obtenidos de ratas normales, ratas con diversas insuficiencias endocrinas (adrenalectomizadas, ovariectomizadas y radioyodotiroidectomizadas), como así también grupos de animales con privación hormonal seguida de hormonoterapia sustitutiva. Los islotes provenientes de todos los grupos de animales con déficit endocrino mostraron alteraciones concordantes en ambos parámetros y la correlación entre los cambios en la secreción de insulina y el metabolismo de glucosa fue altamente significativa. Todos los cambios observados en estos animales hormono-deficientes fueron corregidos mediante la terapia sustitutiva específica. Estos resultados sugieren que probablemente las diversas hormonas estudiadas podrían alterar la secreción de insulina a través de una modificación en la capacidad de los islotes para metabolizar la glucosa.