

Mecanismo de acción de hormonas tiroideas sobre el páncreas endocrino*

ANA MARÍA CORTIZO¹

* Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), República Argentina.

¹ Doctora en Ciencias Bioquímicas (orientación Bioquímica clínica). Investigador Asistente de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), República Argentina.

Introducción

El rol de las hormonas tiroideas en la Diabetes Mellitus y la función endocrina del páncreas fue estudiado por primera vez en 1944 por B. A. Houssay (1). Trabajando con perros parcialmente pancreatectomizados, sometidos a tratamiento con hormonas tiroideas, observó que adquirirían una forma de diabetes irreversible, que persistía aún después de interrumpir el tratamiento tiroideo. Llamó a ésta "Diabetes Metatiroidea"; su mecanismo parecía ser un agotamiento pancreático consecutivo a una sobreestimulación (2). Sus estudios se extendieron en animales sometidos a tiroidectomía y pancreatectomía subtotal simultánea, observando que no se reducía la severidad de la diabetes, sino que la operación exacerbaba los síntomas, la enfermedad progresaba más rápidamente y finalmente morían en hiperglucemia.

A partir de estos experimentos, las hormonas tiroideas han sido consideradas como hormonas diabetogénicas. Numerosos investigadores han observado la intolerancia a la glucosa asociada con una disfunción tiroidea, tanto a nivel clínico como experimental (3-11). Pero el mecanismo por el cual las hormonas tiroideas llevan a cabo estos cambios es hasta hoy desconocido.

En la literatura existe gran número de trabajos del efecto de las hormonas tiroideas sobre la secreción de insulina. Sin embargo, los resultados publicados respecto al efecto de la hiperfunción tiroidea son contradictorios (4) (10) (13) (14). Por el contrario, la mayoría de los autores están de acuerdo con que en el hipotiroidismo existe una capacidad reducida de la célula B para secretar insulina (3) (5) (6) (9) (13) (14).

Por consiguiente, tomando como modelo el hipotiroidismo, esta revisión intenta evaluar los mecanismos a través de los cuales las hormonas tiroideas regulan la secreción de insulina.

Estudios *in vivo*

CONCEPTOS GENERALES SOBRE LA ACCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

Las hormonas tiroideas (T_3 y T_4) son aminoácidos iodados sintetizados en la glándula tiroides, por iodinación de restos tirosilos de la tiroglobulina (15). En el proceso de síntesis y secreción, la tiroglobulina es tomada por las células tiroideas y acumulada a nivel de la luz del folículo. Desde allí es luego captada por esas mismas células mediante un mecanismo de endocitosis, donde el ataque de las enzimas lisosómicas separan los compuestos iodados de la tiroglobulina. Las hormonas tiroideas son así liberadas a la circulación, aunque la mayor parte de la T_3 plasmática (80-90 %) deriva de la conversión periférica de T_4 y no de la secreción tiroidea (16).

Las hormonas tiroideas son transportadas a los diferentes tejidos unidas a proteínas plasmáticas: TBG (*tiroxine binding globuline*), la prealbúmina o TBPA (*tiroxine binding prealbumine*) y la albúmina. Una pequeña cantidad (2 ng % de T_4 y 0,4 ng % de T_3) se encuentra en forma libre (17). Esta fracción es la que desarrolla actividad biológica, ya que es tomada y reconocida por los tejidos "blanco". En circulación se encuentra también la rT_3 o T_3 reversa, también derivada del metabolismo periférico de T_4 , aunque ésta no tiene prácticamente actividad biológica. En la figura 1, se observan las estructuras de la tironina y sus iododerivados.

La T_3 es 5 a 10 veces más activa que la T_4 , según sus actividades tiro-miméticas y afinidades de unión al receptor específico nuclear (18). Si bien las hormonas tiroideas libres, pueden entrar a las células por procesos de difusión pasiva, el principal mecanismo es el proceso facilitado, dependiente de un *carrier* (19).

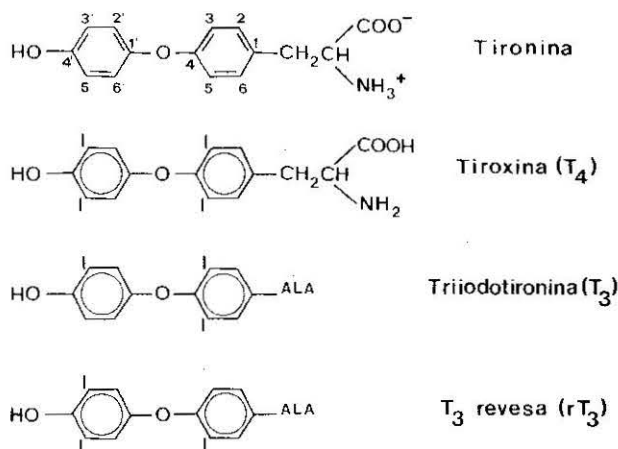


FIG. 1. Estructura de la tironina y sus iododerivados. Estructura e identificación de los carbonos en la tironina y sus derivados naturales.

Dentro de las células, las hormonas pueden sufrir varios procesos (20): conjugación, deiodinación, desaminación oxidativa, formación de iodoproteínas. La deiodinación es la ruta secuencial predominante en el metabolismo de las hormonas tiroideas (20). Este mecanismo se produce por acción de enzimas que específicamente deiodinan T_4 y T_3 para dar tironina libre e I^- . Su actividad es regulada por cofactores como los grupos -SH, algunas

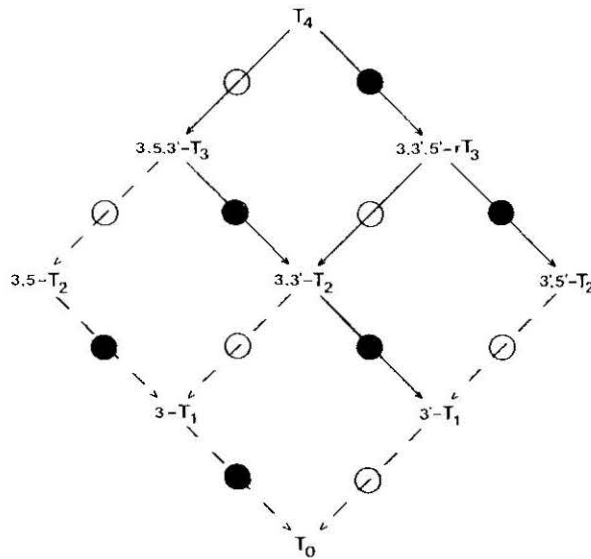


FIG. 2. Vías de deiodinación para las hormonas tiroideas. Esquema de la posible cascada del metabolismo de T₄ (20).

- Monodeiodinasa del anillo externo.
- Monodeiodinasa del anillo interno.

hormonas y diversas situaciones de alteración metabólica, tales como el ayuno, el hipotiroidismo y la Diabetes Mellitus (16) (21) (fig. 2).

Las hormonas tiroideas modifican casi todos los metabolismos en las células efectoras (17), lo que se manifiesta a través de profundos efectos sobre el crecimiento y la diferenciación (22) (23). Estos efectos pueden relacionarse con su acción a nivel nuclear, ya que se han detectado receptores nucleares de alta afinidad para T₃. De esta manera, las hormonas tiroideas son capaces de regular la síntesis de RNAm y proteínas. Estas evidencias señalan al núcleo celular como el principal sitio de acción de las hormonas tiroideas.

Otro sitio de acción de las hormonas tiroideas a nivel celular son las mitocondrias, donde se han descrito sitios de alta afinidad y baja capacidad para dichas hormonas. A este nivel producen simultáneamente un aumento en el consumo de oxígeno y un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y cambios en la actividad de la bomba de sodio o Na⁺-K⁺-ATPasa.

Por otro lado, ciertos efectos de las hormonas tiroideas descritos a nivel de la membrana celular, como flujos iónicos y transporte de azúcares, son sumamente rápidos y no pueden explicarse a través de sus acciones a nivel nuclear (25). Para ello se ha propuesto a la membrana plasmática como el sitio de acción primario de las hormonas tiroideas (26) (27).

Es razonable suponer, entonces, que las hormonas tiroideas pueden actuar en múltiples sitios de la célula, produciendo respuestas coordinadas que, finalmente, se expresan en diversas acciones biológicas.

EFEECTO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE OTRAS GLÁNDULAS ENDOCRINAS

Desde hace tiempo se conoce el profundo efecto que ejercen las hormonas tiroideas sobre el crecimiento y el desarrollo (28). Aunque su mecanismo

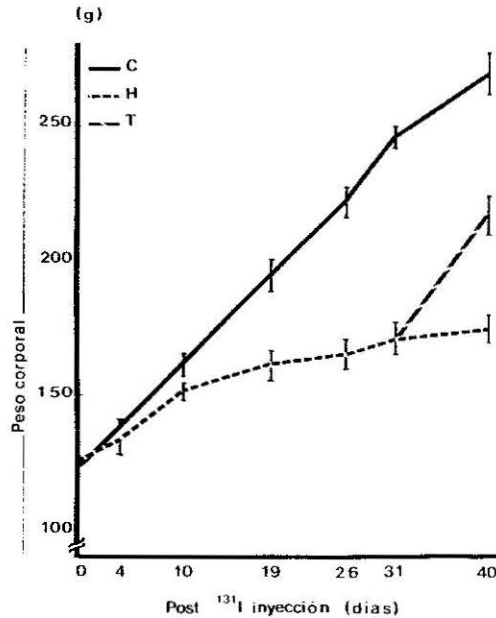


FIG. 3. Curva de crecimiento corporal.

Un lote de ratas de 100-120 g de peso corporal se inyectó con ¹³¹I- (700 μ Ci/rata). Al cabo de 30 días, algunos animales recibieron terapia sustitutiva con T₄ (1,75 μ g/100 g peso corporal/día). Un grupo de ratas del mismo sexo, apareadas por edad, se usó como control. Cada punto representa la media \pm ESM del peso corporal individual obtenido en el momento indicado en las abscisas. Número de casos para C = 11, H = 27, T = 14.

de acción es desconocido, éste parece ser un efecto sinérgico con la hormona de crecimiento hipofisario (29).

El hipotiroidismo experimental puede ser inducido en animales como la rata, a través de una inyección intraperitoneal de ¹³¹I en solución fisiológica (700 μ Ci/rata) (30). El retardo en el incremento de peso corporal en los animales así tratados, demuestra claramente el grado de insuficiencia tiroidea, consecutivo a la destrucción de la tiroides (fig. 3). Después de 30 días, estos animales (H) tienen un peso corporal significativamente más bajo que los animales controles (C) apareados por edad y sexo (170 \pm 5,4 vs. 245 \pm 4,3 g). Cuando los animales hipotiroideos son tratados con T₄ (1,75 μ g/100 g de peso corporal/día) (30) durante 10 días, incrementan significativamente su peso, pero sin alcanzar los valores obtenidos en la curva por los controles.

Por otro lado, los niveles circulantes de hormonas tiroideas y tirotrona (TSH) confirman el grado de disfunción tiroidea alcanzado por los animales radioiodotiroidectomizados y tratados con T₄ (fig. 4 y tabla I). Así, es característico del hipotiroidismo primario experimental, una disminución significativa en los niveles circulantes de T₃ y T₄ y, concomitantemente, un incremento en los niveles de TSH. Este perfil de niveles séricos hormonales, sirve, también, para evaluar la eficiencia de la hormono-terapia sustitutiva.

En el hipotiroidismo se ha descrito una disminución en la producción de T₃ a partir de T₄ en varios tejidos, que se recupera lentamente con la terapia sustitutiva específica (16). Esto explicaría la disociación observada en la figura 4, entre el tiempo que tardan los niveles de T₄ y T₃ en alcanzar los observados en animales controles. En estos experimentos, mientras los nive-

HORMONAS TIROIDEAS SOBRE EL PÁNCREAS ENDOCRINO

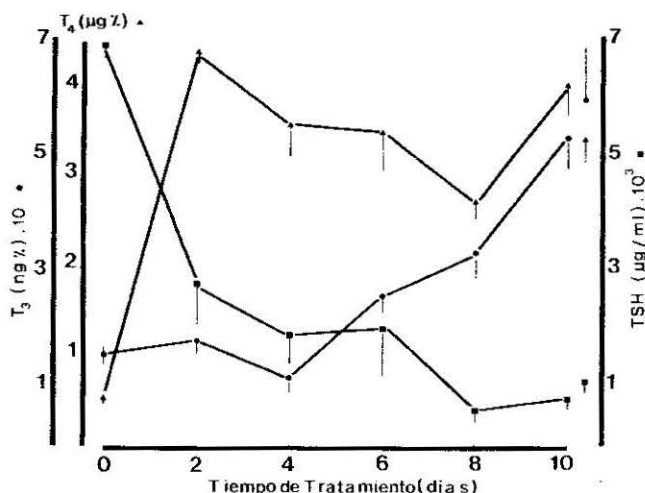


FIG. 4. Niveles séricos de T₃, T₄ y TSH.

Los niveles de T₃, T₄ y TSH se determinaron en el suero obtenido de los tres grupos experimentales de la figura 3. Los niveles correspondientes a las ratas H fueron graficados al comienzo de la curva (tiempo 0), mientras que los correspondientes a las ratas C están representados a la derecha de la figura, fuera de las curvas. Las curvas representan los niveles de las hormonas en las ratas T tratadas por diferentes períodos con T₄. Número de casos: H (n = 63), 2-10 T (n = 4), C (n = 59).

les circulantes de T₄ se normalizan a las 48 h de iniciado el tratamiento, los de T₃ recién comienzan a elevarse entre los 4 y 6 días, alcanzando niveles similares a los de los controles recién a los 10 días. La normalización de los niveles elevados de TSH, consecutivos a la falta de retroalimentación negativa por T₃ hipofisaria, sigue una evolución similar a los de esta última hor-

TABLA I. NIVELES DE HORMONAS CIRCULANTES EN RATAS CONTROLES (C), HIPOTIROIDEAS (H) Y TRATADAS CON T₄ DURANTE 10 DÍAS (T).

Hormonas	C	H	T
T ₃ , ng/dl	58,1 ± 2,80 (59)	20,4 ± 2,20 (63) *	55,6 ± 5,60 (16)
T ₄ , µg/dl	3,1 ± 0,16 (59)	0,6 ± 0,06 (63) *	3,8 ± 0,44 (16)
TSH, µg/ml	1.078,0 ± 117,00 (27)	7.171,0 ± 443,00 (34) *	790,0 ± 146,00 (16)
PRL, ng/ml	21,3 ± 3,50 (27)	6,3 ± 1,20 (34) *	—
Insulina, µU/ml	35,5 ± 4,40 (19)	24,7 ± 2,60 (19) #	—
Corticosterona, ng/ml	188,0 ± 35,00 (8)	80,7 ± 23,00 (3) #	167,2 ± 29,00 (4)
Testosterona, ng/ml	5,3 ± 0,78 (5)	3,9 ± 1,15 (4)	4,6 ± 1,06 (6)

Cada calor representa la media ± ESM (n = número de casos).

C vs. H: * P < 0,001, # P < 0,05.

Los niveles de las hormonas mencionadas fueron dosados por radioinmunoanálisis, o radiocompetición proteica, para el caso de corticosterona.

mona (31). Esto demuestra la importancia de la deiodinación de T_4 a T_3 a nivel hipofisario, en la regulación de la secreción de TSH.

Aun cuando la tiroidectomía es el modelo más comúnmente utilizado para el estudio del efecto del déficit de hormonas tiroideas sobre diversos tejidos periféricos, la insuficiencia secretoria secundaria a otras glándulas puede, sin lugar a duda, contribuir a la producción de los cambios metabólicos que caracterizan al cuadro general del hipotiroidismo. Este déficit multi-hormonal no es tenido en cuenta habitualmente en la interpretación de los resultados obtenidos en el hipotiroidismo experimental o clínico. Tales funciones pueden ser estudiadas a través de los niveles circulantes de varias hormonas y de las alteraciones morfológicas de algunas glándulas endocrinas (tabla I).

Encontramos, así, que en los animales hipotiroideos hay una franca disminución de los niveles de prolactina (PRL) y corticosterona. La extracción de sangre para la determinación de estas hormonas se hizo bajo anestesia, la que genera un estrés en el animal y que sirve de estímulo para la secreción de diversas hormonas (32); por lo tanto, los niveles circulantes detectados

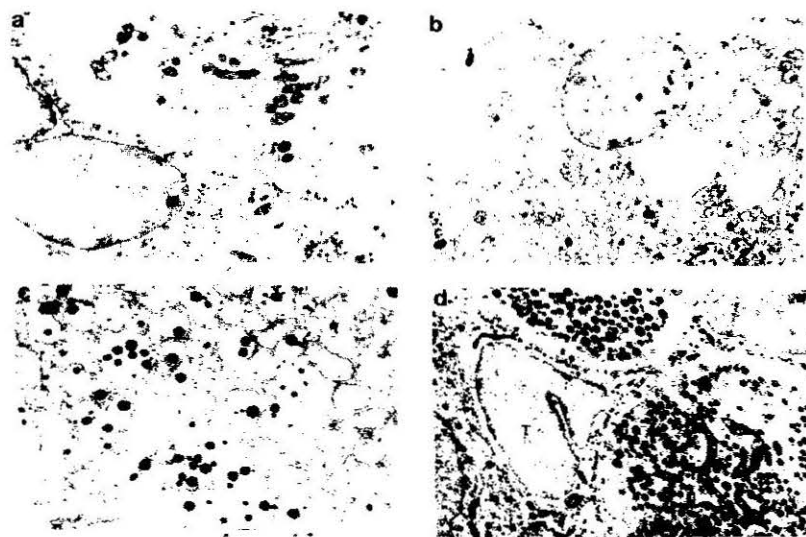


FIG. 5. Células tirotropas.

La pituitaria de 4 ratas de cada grupo, C, H y T, fueron seccionadas con el objeto de separar la *pars distalis*. Este material se fijó en Karnovsky y posteriormente en tetróxido de osmio. Luego el material fue deshidratado y embebido en araldita. Secciones ultrafinas se colorearon con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron con un microscopio electrónico Siemens Elmiskop I.

- Célula TSH de un animal control, con características normales. Se observan además, células somatotropas con numerosos gránulos de mayor tamaño ($\times 10.000$).
- Célula TSH de un animal H. Se observa la célula globosa, el retículo endoplásmico dilatado conteniendo material moderadamente denso. Los gránulos secretorios son escasos ($\times 10.000$).
- Detalle de parte de una célula TSH de un animal con hipotiroidismo prolongado. El producto de secreción suele acumularse en forma de gránulos densos, contenidos en el interior de vesículas dilatadas de retículo endoplásmico ($\times 30.000$).
- Pars distalis* de un animal T. En la parte inferior se observa una célula TSH con aspecto normal. Más arriba, otra con retículo endoplásmico vesiculoso que indica una hiperfunción aún no corregida ($\times 10.000$).

deben considerarse como de post-estímulo. La disminución en los niveles de las hormonas evaluadas en los animales hipotiroideos, concuerda con la menor respuesta de distintas glándulas al estrés, ya descrita en el hipotiroidismo (32).

Los estudios morfológicos han demostrado la presencia en el hipotiroidismo de importantes cambios ultraestructurales en algunas glándulas endocrinas (33). Así por ejemplo, las células secretoras de TSH aparecen hipertrofiadas, la mayoría degranuladas y con grandes zonas de vesiculización (fig. 5). Estas células se han denominado TE o de Tiroidectomía (34). Por otra parte, Gómez Dumm y col. (33) encontraron, además, grandes masas de gránulos secretorios densos rodeados por membrana de retículo endoplásmico, así como también una gran cantidad de lisosomas. De Fesi y col. (35) estudiaron la cinética de las células TSH y STH durante el desarrollo del hipotiroidismo y luego del tratamiento con T_3 de ratas hipotiroideas, mediante la determinación del DNA y recuento de células a nivel de microscopía electrónica. Estos estudios sugieren que el grado de función tiroidea es importante en la regulación de la síntesis de DNA y replicación celular en la pituitaria anterior, aunque el mecanismo de tales cambios es desconocido. A pesar del retorno de los niveles de TSH al rango normal en ratas H tratadas con T_4 , aún persiste en ellas algún grado de hiperfunción de las células TSH (tabla I y fig. 5). Estos resultados coinciden con los obtenidos en ratas tiroidectomizadas, tratadas con T_3 por otros autores (35).

A pesar de la marcada disminución en los niveles plasmáticos de PRL hallados en los animales hipotiroideos (tabla I), las células prolactotropas no presentan alteraciones morfológicas cuali o cuantitativas. En general, los cambios morfológicos detectados en una célula hipofuncionante nunca son tan marcados como los observados en una célula hiperfuncionante. Por otro lado, en la literatura no figuran estudios previos sobre la ultraestructura de las células PRL en el hipotiroidismo. Así, podríamos sugerir que la dismi-

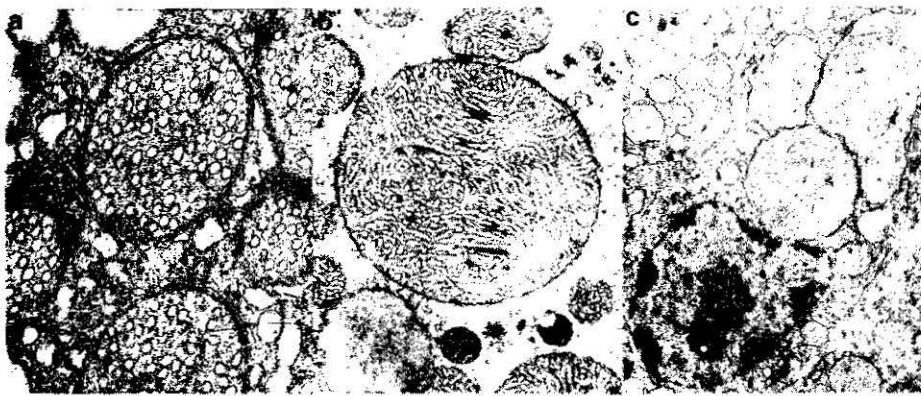


FIG. 6. Corteza adrenal.

Las muestras de corteza adrenal de los tres grupos experimentales fueron procesadas como se indicó en la leyenda de la figura 5.

- Corteza adrenal de un animal C. Mitocondrias de una célula de la zona fasciculata con crestas vesiculares normales ($\times 30.000$).
- Corteza adrenal de un animal H. Las crestas de las mitocondrias muestran una forma predominantemente tubular en una distribución irregular ($\times 18.000$).
- Megamitocondria en una célula de la zona fasciculata del grupo H ($\times 6.000$).

nución en la concentración de PRL plasmática hallada, podría deberse a una alteración en el mecanismo de estímulo: secreción de la hormona.

Las observaciones a nivel de microscopía de luz y electrónica de las células de Leydig, encargadas de la síntesis de testosterona, muestran un aspecto normal en los tres grupos estudiados en la tabla I (33). Estos resultados están de acuerdo con los niveles séricos de testosterona en las ratas H. Tampoco en este caso existen referencias previas que describan cambios morfológicos en el hipotirodismo.

La estructura de la corteza adrenal en las ratas H es normal a nivel de microscopía de luz. Sin embargo, cuando se examina al microscopio electrónico, en las ratas H, las células de la zona fasciculata muestran una disminución en la cantidad de gotas lipídicas, así como también importantes cambios en sus mitocondrias. El número de mitocondrias está aumentado, siendo de mayor tamaño y presentando formas irregulares. Es común encontrar también la presencia de megamitocondrias (fig. 6). Estos cambios pueden relacionarse con la disminución en los niveles séricos de corticosterona detectados por nosotros, así como también en la producción de cortisol descrita por otros autores (36).

EFECTO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE LOS NIVELES DE INSULINA CIRCULANTE Y LA MORFOLOGÍA DEL PÁNCREAS ENDOCRINO

Varios autores han descrito la disminución en la insulinemia que acompaña al hipotirodismo (3) (5) (6) (33) (37). Los resultados presentados en la tabla I confirman esos datos. Los animales hipotiroideos presentan una leve, pero significativa disminución en los niveles de insulina circulante, mientras que la glucemia no presenta cambios respecto a los controles normales (C: $126,2 \pm 6,9$ (24) vs. H: $119,5 \pm 6,0$ (24) mg %). En condiciones metabólicas como las de estos animales (ayuno), donde el aporte exógeno de glucosa no desempeña ningún papel importante, los niveles circulantes de la hexosa dependen del balance entre el consumo y la producción endógena. Estos dos procesos están bajo el control de las hormonas movilizadoras (glucagón, glucocorticoides, STH, catecolaminas, etc.) y de depósito (insulina) (38). Dado que los niveles de glucosa plasmáticos en animales controles e hipotiroideos son similares, aun cuando los de insulina son menores en estos últimos, es lógico pensar en el establecimiento de un nuevo estado de equilibrio hormonal con niveles más bajos de todas las hormonas. También podría aceptarse una mayor eficiencia de los tejidos periféricos para utilizar la glucosa.

Ambas circunstancias parecen estar presentes en estos animales. Por un lado, ya hemos descrito la disminución de PRL y corticosterona en las ratas hipotiroideas (33). Por otra parte, hemos demostrado previamente (39) que el adipocito del animal hipotiroideo oxida glucosa a mayor velocidad que los obtenidos de animales normales. Sin embargo, en estos animales H, no se observa respuesta a la insulina. Esta falta de respuesta ya ha sido descrita anteriormente y fue considerada como un defecto post-receptor de esas células (40). De hecho, estudiando la unión de ^{125}I -insulina a adipocitos aislados de ratas controles e hipotiroideas, encontramos un aumento en la unión máxima de los adipocitos H. El análisis de Scatchard, de estos datos, muestra que esto es debido a un aumento en la afinidad de los sitios receptores, sin cambios en la capacidad de los mismos (fig. 7). Estos resultados concuerdan y confirman los descriptos separadamente en la lite-

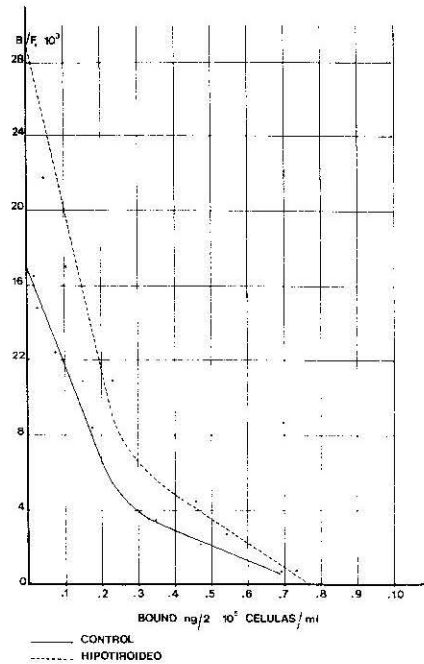


FIG. 7. Unión de ^{125}I -insulina a adipocitos aislados de ratas controles e hipotiroideas. Alrededor de $2 \cdot 10^5$ células/ml fueron incubadas en *buffer* Kreebs-Ringer-bicarbonato (KRB), 1 % BSA, glucosa 10 mM, pH 7,4 con ^{125}I -insulina (100.000 cpm/tubo), insulina fría, a 16 °C por 2 h.

C: $K_a^1 = 3 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$; $K_a^2 = 4 \cdot 7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$; $R_o = 3 \cdot 9 \cdot 10^5$ sitios/célula.
 H: $K_a^1 = 5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$; $K_a^2 = 7 \cdot 7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$; $R_o = 4 \cdot 0 \cdot 10^5$ sitios/célula.
 K_a : constante de afinidad; R_o : capacidad de los sitios.

ratura. Ellos explican la mayor capacidad de las células del animal hipotiroideo para utilizar glucosa en presencia de bajos niveles de insulina y la localización en ellas de un efecto post-receptor para responder a esta hormona.

Morfología de los islotes de Langerhans: la organización de los islotes de Langerhans muestra características relevantes en relación con los mecanismos de secreción de insulina. En los mamíferos, los islotes se hallan dispersos en el tejido acinar, constituyendo solamente el 1-2 % del parénquima pancreático. Son de forma y tamaño variable, presentando un diámetro que oscila entre 50-300 μm (41). Los islotes de Langerhan están compuestos por una población heterogénea de células. Su identificación es posible sobre la base de técnicas de inmunohistoquímica. De esta manera se han descrito cuatro tipos celulares, responsables de la secreción de insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático. La figura 8 muestra un esquema de la distribución y proporción de las células en un islote pancreático humano (42).

Las células B, secretoras de insulina, ocupan preferentemente la parte central de los islotes. Observándose con el microscopio electrónico, muestran gránulos de secreción con una membrana envolvente, separada del contenido del gránulo por un amplio halo claro.

Las células A, secretoras de glucagón, se distribuyen en la periferia del islote, así como también rodeando los capilares sanguíneos que penetran en

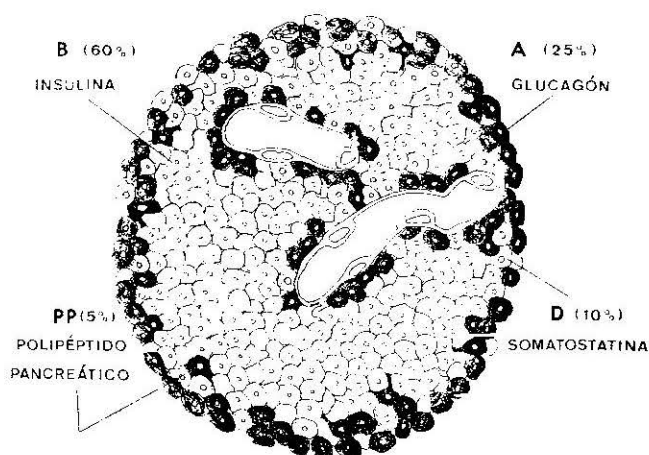


FIG. 8. Composición celular de un islote pancreático. El esquema muestra la distribución y proporción de las distintas células que componen un islote pancreático humano (42).

el mismo. El microscopio electrónico revela en ellas gránulos de secreción densos, rodeados por un estrecho halo claro por debajo de la membrana envolvente.

Las células D, secretoras de somatostatina, también se encuentran en la periferia del islote y junto a los capilares. Al microscopio electrónico muestran gránulos de secreción redondeados, de moderada densidad electrónica, con una membrana envolvente adosada al contenido granular.

Las células PP, responsables de la secreción del polipéptido pancreático, se han localizado rodeando a capilares y también en la periferia del islote, algo más profundamente que las células A y D. La ultraestructura de los gránulos los muestran de forma redondeada u ovalada, con una membrana envolvente adosada al núcleo denso.

Previamente se ha demostrado la disminución en la secreción de insulina en el hipotiroidismo, a través de estudios *in vivo* o *in vitro* (3) (5) (6)

TABLA II. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE PÁNCREAS DE RATAS CONTROLES (C) E HIPOTIROIDEAS (H).

Grupo	V_v	V_{vB}	V_{vnoB}	$\frac{N^{\circ} B}{isl}$	$\frac{N^{\circ} noB}{isl}$	V_{isl}	(n)
C	$8 \cdot 10^{-3}$	0,64	0,36	0,52	0,48	$171,6 \pm 48$	(89)
H	$10 \cdot 10^{-3}$	0,71	0,28	0,65	0,36	$121,4 \pm 70$	(80)

V_v = densidad de volumen de islotes.

V_{vB} = densidad de volumen de células B.

V_{vnoB} = densidad de volumen de células no B.

$N^{\circ} B$

= número de células B contadas respecto al número total de células en cada islote.

$N^{\circ} noB$

= número de células no B contadas respecto al número total de células en cada islote.

V_{isl}

= volumen promedio de islotes en cada grupo experimental.

(n) = número de islotes contados por grupo.

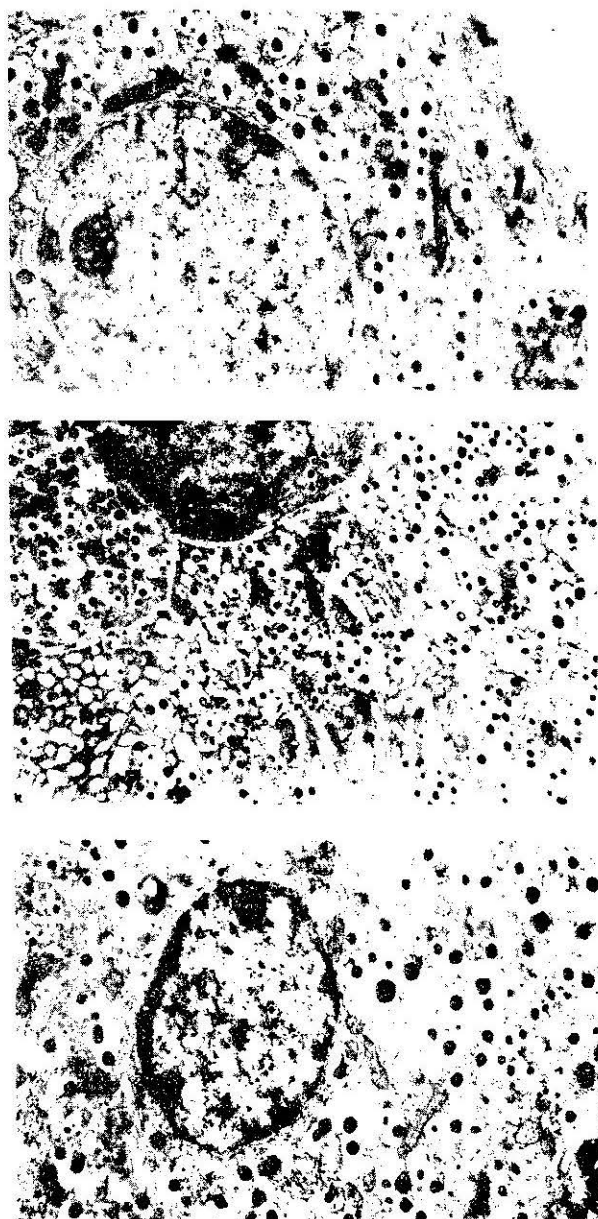


FIG. 9. Células B pancreáticas.

La cola de cada grupo de ratas, C, H y T, puestas en fijador de Karnovsky, fueron disecadas bajo microscopio estereoscópico. Los islotes parcialmente separados fueron procesados como se indicó en la leyenda de la figura 5.

- a) Célula B de un animal C, con aspecto normal. Se destacan los típicos gránulos de secreción, con un contenido denso separado de la membrana envolvente por un amplio halo claro ($\times 16.000$).
- b) Célula B de un animal hipotiroideo. Se observan numerosos gránulos de secreción con un halo claro anormalmente agrandado. Muchas vesículas carecen de contenido. En algunas zonas el retículo endoplásmico (RE) aparece vesiculoso y dilatado ($\times 10.000$).
- c) Células B de un animal tratado con T_4 , cuyo aspecto es normal ($\times 14.000$).

(12-14) (30) (37). Sin embargo, no hay datos en torno a los cambios ultraestructurales que puede sufrir el islote pancreático en esta situación.

Los estudios morfométricos a nivel de microscopia de luz no revelan cambios entre los animales controles e hipotiroideos (tabla II) (30). La densidad de volumen de los islotes, la densidad de células B y no B, así como también el volumen promedio de islotes, son semejantes en ambos grupos experimentales. Tampoco hay diferencias en el contenido de proteína de los islotes aislados de ratas C y H. De estos resultados, se puede concluir, que la hipoinsulinemia observada no puede explicarse a través de cambios cuantitativos en la población de células B pancreáticas.

El estudio a nivel de microscopia electrónica de islotes pancreáticos de ratas C y H, revela los cuatro tipos celulares ya descritos en el páncreas endocrino. Sin embargo, solamente las células B presentan cambios marcados entre los animales controles e hipotiroideos (fig. 9) (30) (33). Las células B de las ratas H muestran un gran número de gránulos secretorios, la mayoría de los cuales tienen un halo claro de mayor tamaño. Frecuentemente se encuentran vesículas de tamaño similar al de los gránulos, pero sin su característico material denso central. El retículo endoplásmico rugoso está significativamente agrandado, sugiriendo un aumento en la actividad biosintética. Contrariamente, no se hallan signos de aumento en la actividad secretoria de las células B de las ratas hipotiroideas. Este último aspecto está de acuerdo con nuestros valores de insulinemia (tabla I) y disminución en la secreción de insulina *in vitro* (ver más adelante).

El tratamiento con T_4 hasta alcanzar el estado eutiroideo, corrige completamente las alteraciones ultraestructurales descritas en las células B del islote (fig. 9).

Nuestros hallazgos muestran que en la rata hipotiroidea, la disminución de la secreción de insulina está acompañada por importantes cambios ultraestructurales de la célula B. Tales alteraciones podrían explicar, al menos en parte, la disminución en la secreción de insulina descrita en el hipotiroidismo.

Estudios *in vitro*

MECANISMO POR EL CUAL LA GLUCOSA ESTIMULA LA SECRECIÓN DE INSULINA

Aspectos generales: la insulina es una hormona polipeptídica, de peso molecular 5800, sintetizada y almacenada en la célula B de los islotes de Langerhans del páncreas.

Aun cuando existen otras formas, la secreción de insulina se lleva a cabo principalmente en forma de gránulos, por un proceso denominado "emiocitosis" o "exocitosis". Este proceso consiste en la migración de los gránulos dispersos en el citoplasma hasta la membrana plasmática, la fusión de las dos membranas, su ruptura en ese punto y la descarga del contenido del gránulo en el intersticio celular (43). En la figura 10 se observa un esquema del proceso.

El proceso de secreción de insulina puede considerarse como una serie de eventos metabólicos, catiónicos y mecánicos (44). Los eventos metabólicos implican, en primer término, el reconocimiento por parte de la célula B del estímulo de la secreción de insulina. Es decir, supone la existencia de un sistema sensor de la glucosa. En segundo lugar, implica la formación de segundos mensajeros intracelulares que activan flujos iónicos y la redistribu-

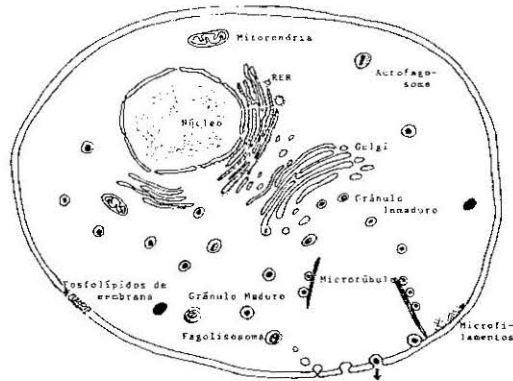


FIG. 10. Esquema del proceso de secreción de insulina.

La insulina sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso (RER) es transferida al aparato de Golgi y luego almacenada en forma de gránulos. Frente al estímulo de glucosa u otra señal, los gránulos son transportados a la membrana celular a través del sistema de microtúbulos y microfibrilamentos. Allí se funden las dos membranas y el contenido del gránulo es liberado por la célula B por un mecanismo conocido como exocitosis.

ción de ciertos iones en el interior de la célula B. Finalmente, éstos llevan a la activación del sistema motil de microtúbulos y microfibrilamentos encargados de la translocación y exocitosis de los gránulos de insulina. Esta ulterior etapa involucra también cambios de las propiedades fisicoquímicas de la membrana celular.

La insulina, al igual que otras hormonas peptídicas, es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso, ubicado a un lado del núcleo. La hormona es sintetizada como un precursor de mayor peso molecular, la proinsulina (PM: 11.500), que es sucesivamente segmentada para dar la proinsulina (PM: 9.000) y un péptido N-terminal caracterizado por una gran proporción de aminoácidos hidrofóbicos (45). La proinsulina es transferida a la región del aparato de Golgi mediante un proceso que requiere energía. Allí es empaquetada en forma de "progránulos" y se lleva a cabo la proteólisis limitada de proinsulina. Como resultado de esta digestión enzimática, la molécula inicial da lugar a la formación de insulina y al péptido conector o péptido C. Se sabe que la glucosa estimula la síntesis de proinsulina en los islotes pancreáticos de rata. Esto ocurre principalmente a nivel de la traducción y en menor grado también regula la transcripción (46).

El gránulo de secreción muestra diferentes grados de maduración: se habla de "gránulos maduros" o electrónicamente densos y de "gránulos pálidos" o inmaduros (47). Los gránulos maduros son transportados a la membrana celular a través del sistema de microtúbulos y microfibrilamentos (48).

Para que se produzca la emiocitosis, la membrana del gránulo de secreción debe fusionarse con la membrana plasmática de la célula. Dado que las membranas no tienden a fusionarse espontáneamente, debe existir algún mecanismo que favorezca este proceso. Tal mecanismo lleva, en último término, a la aparición de una zona o microentorno de estructura rígida o poco fluida, donde la fusión de las dos membranas es posible (49).

Luego de la exocitosis, tiene lugar un proceso conocido como "endocitosis mediada por exocitosis" (50). Por este mecanismo, se lleva a cabo la incorporación de segmentos de membrana plasmática dentro del citoplas-

ma. Esto le permitiría la célula recuperar los componentes de membrana granular fusionados con la plasmática y mantener dentro de límites constantes la longitud de su membrana y, por consiguiente, el diámetro celular.

Características del proceso secretorio: la glucosa estimula la secreción de insulina en una forma dosis-respuesta que si se grafica, es de tipo sigmoide (51). Concentraciones de glucosa menores de 3 mM no modifican la secreción basal de insulina. La concentración de glucosa capaz de superar dicha secreción (umbral) está alrededor de 4-5 mM y la respuesta secretoria máxima ocurre entre 5-17 mM de glucosa. En esta zona, que coincide con el rango de concentración fisiológica de glucosa en sangre, la célula B es extremadamente sensible a pequeños cambios en la concentración extracelular de glucosa.

El primer paso en el metabolismo intracelular de la glucosa, implica su transporte a través de la membrana plasmática. Éste ha sido definido como un proceso mediado, con alta capacidad de transporte y especificidad para D-glucosa (52-55). Una vez dentro de la célula, la glucosa es fosforilada a una velocidad que explica su máxima utilización por los islotes. A través de medidas cinéticas, Ashcroft demostró que el paso limitante del metabolismo es justamente la fosforilación de la glucosa (56). Por otro lado, el grupo de Matschinsky (57) encontró que la glucosa es fosforilada por una glucoquinasa, semejante en sus propiedades a la enzima de hígado. Esta enzima muestra su máxima actividad dentro del rango de concentraciones de glucosa que existen normalmente en los fluidos extracelulares.

Una vez fosforilada a glucosa-6-fosfato, la vía más importante del metabolismo de la glucosa en el islote es la glicólisis, ya que solamente 2-4 % del flujo de átomos de C deriva a la vía de las pentosas (58) (59).

Señales para la liberación de insulina: son varios los compuestos identificados como mensajeros que, en el interior de la célula B, son capaces de acoplar el estímulo a la respuesta secretoria. Entre ellos pueden mencionarse la actividad de la glucoquinasa (57), intermediarios de la glicólisis (56), nucleótidos clínicos (44) (60), compuestos con actividad redox (44) (56) (61) (62), cambios en el potencial de membrana (63), la calmodulina o proteína reguladora dependiente de calcio (CDR) (64) (65), inositol-tris-fosfato, PG y leucotrienos (42).

El rol del calcio en el mecanismo de secreción de insulina, merece una consideración especial. La secreción de insulina estimulada por glucosa depende de la presencia de Ca^{2+} extracelular (66-68). Dependiendo de la concentración de glucosa en el medio, se produce un aumento en la captación de calcio del medio por los islotes aislados. En la célula B en reposo, la concentración citosólica de calcio es baja (10^{-7} M) comparada con la existente a nivel extracelular (10^{-3} M). Frente al estímulo de glucosa, se produce un aumento en la concentración del calcio citosólico (10^{-5} M) (102).

Este aumento es debido, en parte, a un cambio en el balance del flujo de entrada y salida de calcio a través de la membrana de la célula B (69). Si bien la entrada es mediada a través de varios canales, la salida de la célula se lleva a cabo principalmente por acción de una Ca^{2+} -ATPasa, localizada en la membrana plasmática (70) (71).

Tan importante como estos mecanismos, es el intercambio del catión entre el citosol y distintas estructuras celulares, como la membrana plasmática, las mitocondrias, los gránulos de secreción, el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico e incluso el núcleo de las células B (69) (72-79).

Todos los procesos regulados por el calcio son mediados por su unión a la calmodulina (80) (81). En los islotes de Langerhans, la proteína regula tanto la captación neta de calcio-inducida por glucosa (82), como el patrón de distribución de calcio en las células B (78). Además, la ATPasa-dependiente de Ca^{2+} es regulada, al igual que otras ATPasas, por la calmodulina (83) (84).

Merece también destacarse, en el proceso de secreción de insulina, la participación de las membranas celulares. Uno de los principales factores implicados en el proceso de fusión es el "recambio" de fosfolípidos de membranas (85-89). En los islotes de Langerhans, varios autores estudiaron los procesos de recambio de fosfolípidos y la secreción de insulina inducida por glucosa (90-96). Así, la incorporación de ^{32}P , 3H -mioinositol o 3H -glicerol en fosfolípidos del islote es función de la concentración de glucosa del medio. Por otra parte, compuestos vinculados con el metabolismo de fosfolípidos, como las prostaglandinas (PG), también son liberados al medio en forma sincrónica a la secreción de insulina (97). Recientemente, Kelly y Laychock demostraron la presencia de una serie de PG y compuestos relacionados en homogenado de islotes (98). Además, algunas drogas que inhiben la síntesis de PG, modifican significativamente la secreción de insulina (79) (99).

En conjunto, estos datos sugieren una acción inicial de la glucosa a nivel de la membrana en el proceso de secreción de insulina (fig. 11) (79). Su

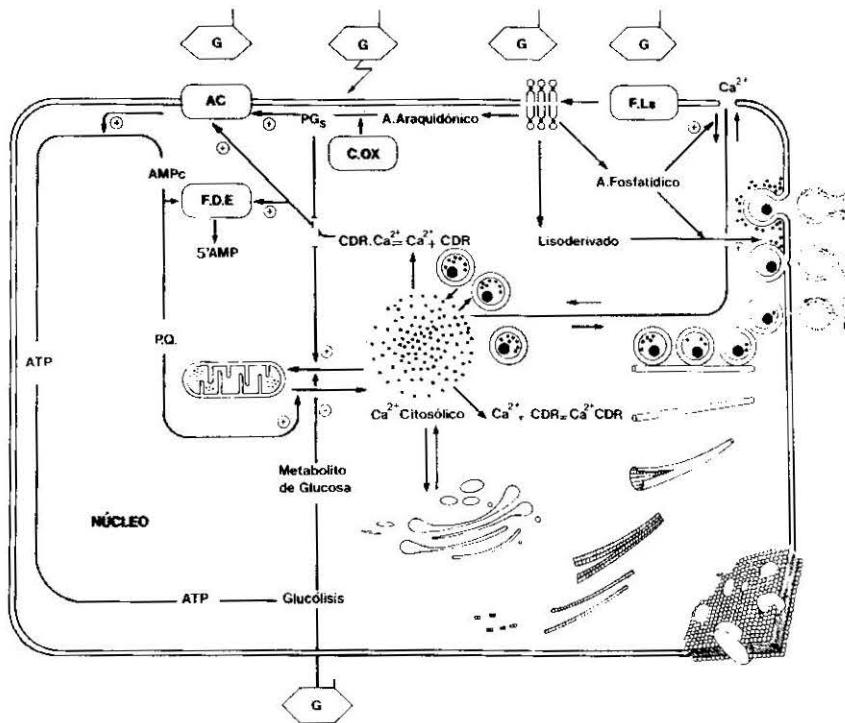


FIG. 11. Señales involucradas en el mecanismo de secreción de insulina. El esquema representa el mecanismo de secreción de insulina inducido por glucosa, y algunas de las señales que intervienen en el proceso. F.Ls: fosfolipasas; AC: adenilato ciclasa; COx: ciclooxigenasa; FDE: fosfodiesterasa; PQ: proteína quinasa; PGs: prostaglandinas; CDR: regulador dependiente de Ca o calmodulina (42).

acción sobre el *turnover* de fosfolípidos, a través de la activación de fosfolipasas de membrana, proveería ácido araquidónico para la síntesis de PG y otros posibles moduladores. El ácido fosfatídico y lisoderivados de fosfolípidos de membrana, por su acción ionófora y fusogénica, participarían en el proceso de emiocitosis. En la figura 11 se muestra también la participación del calcio y la calmodulina y su distribución intracelular.

EFEECTO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA

El estudio de la función endocrina del páncreas se puede realizar mediante diversas técnicas experimentales. En 1967, Lacy y Kostianovsky (100) describieron una técnica para obtener islotes desprovistos totalmente de tejido acinar, por medio de una digestión controlada con colagenasa (fig. 12).



FIG. 12. Islotes pancreáticos aislados. Se observa una preparación de islotes de Langerhans, aislados por la técnica de digestión con colagenasa de Lacy y Kostianovsky.

Ésta es una de las técnicas más empleadas actualmente, con la ventaja que los islotes así obtenidos, pueden ser no sólo incubados por plazos breves, sino, también, mantenidos en cultivo para estudios a largo plazo.

La disminución en la secreción de insulina en respuesta a la glucosa en el hipotiroidismo, ha sido estudiada extensamente (3) (5) (6) (9) (12) (13) (37), aunque el mecanismo de tal alteración no fue definido. Usando el modelo de ratas radioiodotiroidectomizadas, nosotros estudiamos la respuesta a la glucosa de islotes aislados de animales controles, hipotiroideos y tratados con T_4 hasta alcanzar el estado eutiroideo (30) (fig. 13). La glucosa estimula la secreción de insulina de islotes obtenidos de los tres grupos estudiados. Esta respuesta es mayor en presencia de 16,6 mM que de 3,3 mM de glucosa. La secreción de insulina frente a bajas concentraciones de glucosa, es similar en islotes de ratas C y H y mayor en las ratas T. Sin embargo, en presencia de 16,6 mM de glucosa, la respuesta de los islotes de ratas H es significativamente menor que en los controles. Esta hipofunción se corrige mediante el tratamiento de los animales hipotiroideos con T_4 .

Esta menor respuesta no puede ser atribuida a una simple disminución de la disponibilidad de insulina, ya que el contenido de la hormona es similar en los islotes de ratas hipotiroideas y controles (H: 1.095 ± 54 (24) *vs.*

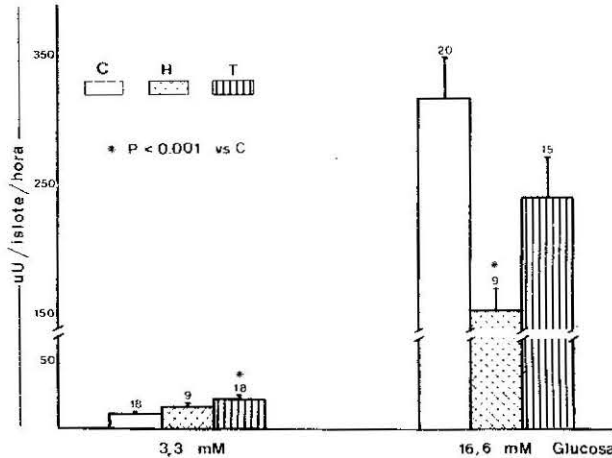


FIG. 13. Secreción de insulina inducida por glucosa.

Grupos de 5 islotes aislados de diferentes grupos experimentales, se incubaron durante 60 min a 37 °C en 0,6 ml de KRB pH 7,4, 1 % BSA, trasyolol y glucosa 3,3 ó 16,6 mM. La preparación fue gaseada previamente con una mezcla de 95 % O₂: 5 % CO₂. Alícuotas del medio fueron separadas para la determinación de insulina por radioinmunoensayo (30). C: control; H: hipotiroidismo; T: hipotiroideo tratado con T₄. Cada barra representa la media ± ESM y el número de casos arriba de cada barra. El análisis estadístico se llevó a cabo usando el test de t de Student.

C: 1.231 ± 68 (29) µU/islole). Por lo tanto, esto sugiere alguna alteración localizada a nivel del proceso de estímulo:secreción de la hormona.

Otra forma de estudiar el efecto de las hormonas tiroideas sobre la secreción de insulina, es mediante el agregado de estas hormonas al medio de incubación o cultivo de islotes. De esta forma se puede analizar el efecto directo de las mismas a corto o largo término. El efecto directo a corto plazo no ha sido descrito hasta el momento, por el contrario, Vrbova y Howell (101) encontraron un efecto inhibitorio de T₄ en concentraciones supra-

TABLA III. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE T₃ SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA.

Glucosa (mM)	Insulina (µU/i/h)	T ₃ (M)
3,3	10,8 ± 1,0 (18)	—
	13,1 ± 1,9 (10)	10 ⁻¹³
	12,7 ± 1,5 (10)	10 ⁻¹¹
	19,9 ± 2,8 (8)**	10 ⁻⁹
	22,6 ± 4,3 (10)*	10 ⁻⁷
16,6	317,8 ± 32,5 (20)	—
	327,0 ± 12,8 (9)	10 ⁻¹³
	287,5 ± 31,6 (10)	10 ⁻¹¹
	201,9 ± 14,9 (8)***	10 ⁻⁹
	211,1 ± 27,8 (20)*	10 ⁻⁷

Islotes aislados de ratas Wistar, fueron incubados durante 60 min en presencia de las concentraciones de glucosa y T₃ indicadas en la tabla. Los valores representan la media ± ESM y el número de casos entre paréntesis. El análisis estadístico se llevó a cabo usando el test de t de Student.

* P < 0,02, ** P < 0,01, *** P < 0,005; respecto a los correspondientes controles en ausencia de T₃.

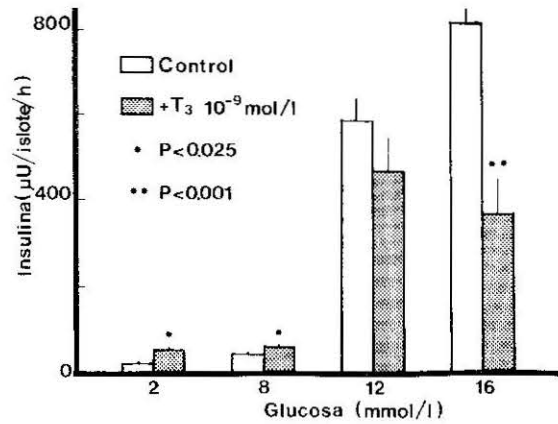


FIG. 14. Efecto de T₃ sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa. Islotes aislados fueron incubados como se indicó en la leyenda de la figura 13 en presencia de 10⁻⁹ M de T₃ y la concentración de glucosa indicada en la abscisa de la figura. Cada barra representa la media ± ESM, número de casos n = 10.

fisiológicas (1 µg/ml) sobre la secreción de insulina de islotes cultivados durante 24 h en presencia de glucosa 20 mM.

Recientemente nosotros estudiamos el efecto de T₃ en diferentes concentraciones, sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa de islotes de ratas controles (tabla III y fig. 14) (102). Puede verse que el efecto de la hormona depende de la dosis empleada y de la concentración de glucosa en el medio. A concentraciones de 10⁻⁹ y 10⁻⁷ M, la T₃ potencia significativamente o inhibe la liberación de insulina en presencia de glucosa 3,3 ó 16,6 mM, respectivamente. Este efecto dual se puede ver también en el estudio dosis-respuesta de islotes incubados en presencia de T₃ 10⁻⁹ M (concentración fisiológica) (fig. 14). En presencia de concentraciones de glucosa basales (2-8 mM) el efecto es estimulante, a 12 mM no se observa efecto y frente a concentraciones de 16,6 mM de glucosa hay una franca inhibición en la secreción de insulina.

Si el defecto secretorio de los islotes de ratas hipotiroideas fuera debido a la falta de hormonas tiroideas, cultivando estos islotes en presencia de T₃ y/o T₄, la secreción de insulina debería reponerse, tal como ocurre en los experimentos *in vivo* con la administración de T₄. Para probar esta hipótesis, islotes provenientes de animales controles e hipotiroideos fueron mantenidos en cultivo, en presencia de concentraciones de glucosa de 7,8 mM. Al igual que los islotes obtenidos inmediatamente después del sacrificio de los animales, los islotes de ratas H mantenidos en cultivo durante 7 días, liberan menos insulina que los provenientes de ratas C (fig. 15). Esta diferencia entre islotes de animales C y H desaparece luego de 7 días de cultivo, como consecuencia de la disminución en la liberación de insulina que experimentan los islotes controles. Esta disminución de la respuesta secretora en función del tiempo de cultivo, ya ha sido descrita previamente por diversos autores (103). El agregado al medio de cultivo de T₄ y T₃, a la inversa de lo observado luego de la terapia sustitutiva administrada *in vivo*, no corrige esa alteración. Por el contrario, las hormonas tiroideas agregadas al medio de cultivo acentúan aun más la disminución en la respuesta insulínica de los islotes provenientes de animales hipotiroideos.

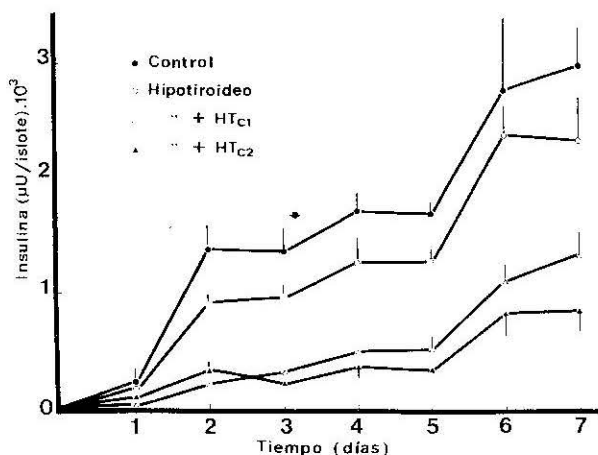


FIG. 15. Liberación de insulina por islotes incubados.

Islotes aislados de ratas controles e hipotiroides, fueron cultivados en medio RPMI 1 640 con 10 % de suero fetal inactivado por calor y glucosa 7,8 mM y $T_3 + T_4$ cuando se indica.

$HT_{c_1} = T_3 + T_4$ en concentraciones de 0,6 ng/ml y 30 ng/ml, respectivamente (concentración fisiológica).

$HT_{c_2} = T_3 + T_4$ en concentraciones de 20 ng/ml y 1 µg/ml, respectivamente (concentración suprafisiológica).

Cada punto representa la media \pm ESM, n = 3 casos.

Todos estos estudios muestran que las hormonas tiroideas tienen un efecto directo sobre la secreción de insulina, aunque por el momento no podemos definir cuál es su mecanismo de acción.

MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE LAS SEÑALES INTRACELULARES INVOLUCRADAS EN LA SECRECIÓN DE INSULINA

El aumento en la concentración de glucosa extracelular produce un aumento en la secreción de insulina. Como ya se mencionó, para que se produzca una respuesta adecuada al estímulo, la célula B del islote dispone de un conjunto de señales intracelulares que acoplan la respuesta al estímulo. En la literatura, no existen estudios previos del efecto de las hormonas tiroideas sobre estas señales en el páncreas endocrino.

Por nuestra parte, usando siempre el modelo del hipotiroidismo, estudiamos los efectos sobre el calcio, el metabolismo de glucosa y fosfolípidos de islotes aislados (30) (104).

Metabolismo de glucosa: la producción de $^{14}CO_2$ de los islotes aislados, a partir de ^{14}C -glucosa, aumenta frente al incremento de la glucosa en el medio, de 3,3 a 16,6 mM (fig. 16). Los islotes de animales hipotiroides muestran una disminución, estadísticamente significativa, en la producción de $^{14}CO_2$, tanto en presencia de bajas como altas concentraciones de glucosa, frente a los islotes controles.

En presencia de glucosa 16,6 mM, la producción de $^{14}CO_2$ por islotes obtenidos de ratas T y C, está dentro del mismo rango. Sin embargo, esta producción es más alta que los controles en presencia de 3,3 mM de glucosa.

Diversos autores han señalado la importancia de la fosforilación inicial de la glucosa (56) (57) y su posterior metabolización, para que el aumento

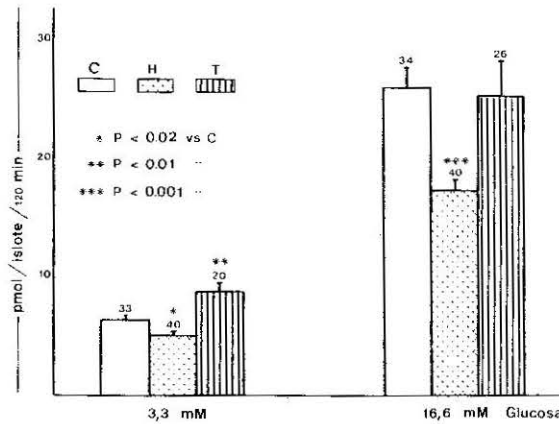


FIG. 16. Oxidación de glucosa.

Grupos de 20 islotes aislados de cada grupo experimental, fueron incubados por 2 h a 37 °C en 150 µl de KRB con (U-¹⁴C)-glucosa (1,2 ó 6 µCi/tubo) en presencia de 3,3 ó 16,6 mM de glucosa. La producción de ¹⁴CO₂ fue medida como se indicó (30). C: controles; H: hipotiroideas; T: tratadas con T₄. Cada barra representa la media ± ESM y el número de casos arriba. El análisis estadístico se realizó usando el test de t de Student.

en la concentración extracelular de la hexosa, se acompañe de una correcta liberación de insulina. Por lo tanto, la disminución en dicha oxidación descrita en nuestro trabajo, sería una de las responsables de la hiposecreción de insulina observada en los islotes de animales hipotiroideos.

Captación de calcio: el aumento en la concentración de glucosa del medio de 3,3 a 16,6 mM, provoca un incremento en la captación de ⁴⁵Ca²⁺ por islotes aislados de ratas controles, hipotiroideas y tratadas (fig. 17). En

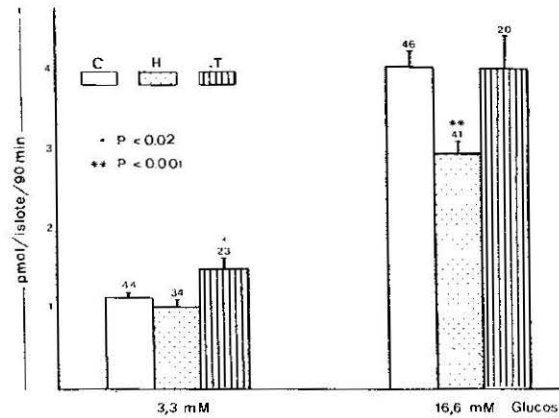


FIG. 17. Captación de ⁴⁵Ca²⁺.

De cada lote de ratas en estudio, se aislaron grupos de 100 islotes e incubaron en 300 µl de KRB, pH 7,4, 1 % BSA, glucosa 3,3 ó 16,6 mM y ⁴⁵Ca²⁺ (20 µCi) durante 90 min a 37 °C. Al final de este período se sacó el medio de incubación y reemplazó por el mismo medio sin ⁴⁵Ca²⁺. Después de 5 lavados sucesivos, se transfirieron los islotes en grupos de 10, a viales de centelleo para la determinación de la radiactividad retenida dentro de ellos. C: control; H: hipotiroideo; T: hipotiroideo tratado con T₄. Cada barrera representa la media ± ESM y el número de casos arriba de las barras. El análisis estadístico se realizó usando el test de t de Student.

presencia de bajas concentraciones de glucosa, el calcio acumulado en islotes de ratas H es similar al de los controles. Sin embargo, con altas concentraciones de glucosa, los islotes de ratas H muestran una disminución significativa en la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, respecto al control. Nuevamente, el tratamiento con T_4 corrige este defecto, alcanzándose en los islotes de ratas tratadas, niveles semejantes a los controles en presencia de glucosa 16,6 mM. En cambio, se encontró un incremento estadísticamente significativo respecto a los controles, a nivel basal.

No se conoce exactamente cómo, el incremento de glucosa extracelular produce un cambio en el flujo bidireccional de calcio a través de la membrana plasmática de las células B. Tales cambios redundan en una retención neta de calcio a nivel intracelular. En este proceso, la acción de la glucosa se halla relacionada con la calmodulina. Drogas que inhiben la acción de esta proteína (79) (105-109) o la captación de calcio, disminuyen la secreción de insulina en respuesta a la glucosa.

Nuestros datos demuestran que la captación neta de calcio está disminuida significativamente en los islotes provenientes de ratas hipotiroideas. Por lo tanto, la alteración en el flujo de calcio, ya sea directamente o a través de una interacción con la calmodulina, sería otra alteración metabólica capaz de contribuir a la producción de la menor secreción de insulina observada en los animales hipotiroideos. Aunque los cambios en el metabolismo de glucosa podrían afectar, en forma secundaria, la captación de calcio, no podemos descartar la posibilidad de una acción directa de las hormonas tiroideas sobre este proceso en el islote, como ocurre en otros tejidos (110).

Metabolismo de fosfolípidos: en islotes provenientes de ratas controles, estudiamos la composición de las distintas fracciones de fosfolípidos (tabla 4) (104). El contenido de fósforo de fosfolípidos de islotes de ratas hipotiroideas es significativamente menor que el de las ratas controles. Esta diferencia se debe principalmente a los cambios en fracciones de fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilcolina (PC).

TABLA IV. CONTENIDO DE P DE FOSFOLÍPIDOS DE ISLOTES AISLADOS DE RATAS CONTROLES (C) E HIPOTIROIDEAS (H).

Fosfolípido	Fósforo (ng/i)	
	C	H
PS	0,8 ± 0,16	0,5 ± 0,02
PI	0,7 ± 0,02	0,5 ± 0,02**
PC	2,0 ± 0,04	1,4 ± 0,09*
PE	1,4 ± 0,06	0,9 ± 0,12
TPL	4,9 ± 0,14	3,3 ± 0,03**

Los lípidos de 700 islotes aislados de cada grupo experimental, fueron extraídos y separados como se indicó (104).

PS: fosfatidil serina; PI: fosfatidil inositol; PC: fosfatidil colina; PE: fosfatidil etanolamina; TPL: fosfolípidos totales. Cada dato representa la media ± ESM para dos experimentos hechos por triplicado. El análisis estadístico se realizó usando el test de t de Student.

* P < 0,05, ** P < 0,01; respecto al grupo control.

El recambio de fosfolípidos estudiado a través de la incorporación de ^3H -glicerol en fosfolípidos de islotes, es similar en ambos grupos cuando los islotes son incubados en presencia de glucosa 3,3 mM (C: 267,4 ± 13,9 vs.

TABLA V. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE ^3H -GLICEROL INCORPORADO EN FOSFOLÍPIDOS DE ISLOTES.

Grupo	% ^3H -glicerol incorporado			
	PS	PI	PC	PE
Glucosa 3,3 mM				
C	2,5 ± 0,33	5,9 ± 0,51**	66,2 ± 2,34*	25,4 ± 2,65
H	2,1 ± 0,22	6,1 ± 0,85	66,3 ± 3,11	25,5 ± 0,82
Glucosa 16,6 mM				
C	3,7 ± 0,59	13,3 ± 0,21	58,8 ± 2,04	24,3 ± 2,81
H	1,7 ± 0,04a	6,4 ± 0,43c	65,8 ± 0,56b	26,0 ± 0,42

Grupos de 50 islotes aislados de ratas controles (C) e hipotiroideas (H) fueron incubados por 60 min en 1 ml de *buffer* KRBB, glucosa 3,3 ó 16,6 mM y 5 ó 25 μCi de ^3H -glicerol (10 mCi/mmol), respectivamente. Al final del período de incubación, los islotes fueron sonicados y los lípidos extraídos como se indicó (104). Cada valor representa la media \pm ESM de tres experimentos hechos por triplicado. El análisis estadístico se realizó usando el *test* de *t* de Student.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,001$; respecto al control incubado con glucosa 16,6 mM.
a $P < 0,05$, b $P < 0,02$, c $P < 0,001$; C vs. H en presencia de glucosa 16,6 mM.

H: $254,5 \pm 18,6$ dpm/islote/h). Contrariamente, en presencia de glucosa 16,6 mM, los islotes de animales controles, incorporan mayor cantidad de ^3H -glicerol que los islotes de ratas hipotiroideas (C: $486,2 \pm 30,3$ vs. H: $340,9 \pm 12,4$ dpm/islote/h; $P < 0,001$). El porcentaje de ^3H -glicerol incorporado en las diferentes fracciones de fosfolípidos del islote, muestra un patrón similar (tabla V). En presencia de bajas concentraciones de glucosa no se encuentran diferencias significativas, pero con glucosa 16,6 mM, los islotes controles muestran un aumento significativo en la incorporación de ^3H -glicerol en la fracción de PI, uno menos importante en PS y una marcada disminución en los niveles de PC. Este efecto estimulador de la incorporación de glicerol en fosfolípidos no se obtiene en los islotes provenientes de ratas hipotiroideas.

La importancia del metabolismo de fosfolípidos en el islote ya ha sido comentada. Recientemente, Best y Malaisse (111) resumieron los datos disponibles en la literatura, sugiriendo el rol regulatorio del *turnover* de fosfolípidos en el mecanismo de secreción de insulina inducida por glucosa. De acuerdo a nuestros resultados, el reducido efecto de la glucosa sobre la secreción de insulina en el estado hipotiroideo, podría deberse, en parte, a la modificación en la composición de fosfolípidos y a las alteraciones en el *turnover* de fosfolípidos observada en los islotes pancreáticos. Nuevamente, entonces, las hormonas tiroideas se hallarían involucradas en el control de una de las señales importantes en el mecanismo de secreción de insulina.

ACCIÓN INTRACELULAR DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN LOS ISLOTES DE LANGERHANS

La terapia sustitutiva con T_4 es capaz de retrotraer tanto las alteraciones ultraestructurales de las células B en el hipotiróidismo, así como también las correspondientes a la oxidación de glucosa y captación de calcio. Por consiguiente, ésta es una evidencia experimental que permite sugerir una importante correlación entre el déficit secretor de las células B y la disponibilidad de hormonas tiroideas. Sin embargo, el modelo hasta aquí descrito, si bien sugiere la posibilidad de un efecto directo de las hormonas tiroideas sobre el islote, no permite aseverarlo con certeza.

Para tratar de responder a este interrogante, y dado que no existen en la literatura estudios previos al respecto, se realizaron nuevos experimentos. El efecto directo de las hormonas tiroideas sobre la secreción de insulina inducida por glucosa a corto y largo plazo, ya ha sido descrito. Comentaremos ahora los estudios acerca de la unión de $^{125}\text{I-T}_3$ a islotes aislados y la deiodinación de $^{125}\text{I-T}_4$ por los mismos.

Binding de hormonas tiroideas: el primer paso en la acción de las hormonas tiroideas en cualquier tejido, es su entrada en la célula "blanco" (19) y ulterior unión a sitios receptores específicos. Aunque tradicionalmente, el locus hormonal fue considerado de origen nuclear (22), actualmente hay suficiente evidencia experimental para aceptar que existen también receptores en las mitocondrias (24) y la membrana plasmática (26) (27).

Si la T_3 , que es la hormona tiroidea más activa, tiene una acción directa en los islotes de Langerhans (tablas III, IV y fig. 14), deberían existir sitios de unión que funcionen como receptores. Los ensayos preliminares de caracterización de estos sitios en islotes aislados incubados con $^{125}\text{I-T}_3$, se ven en la figura 18 (102). La unión de $^{125}\text{I-T}_3$ a los islotes, es directamente

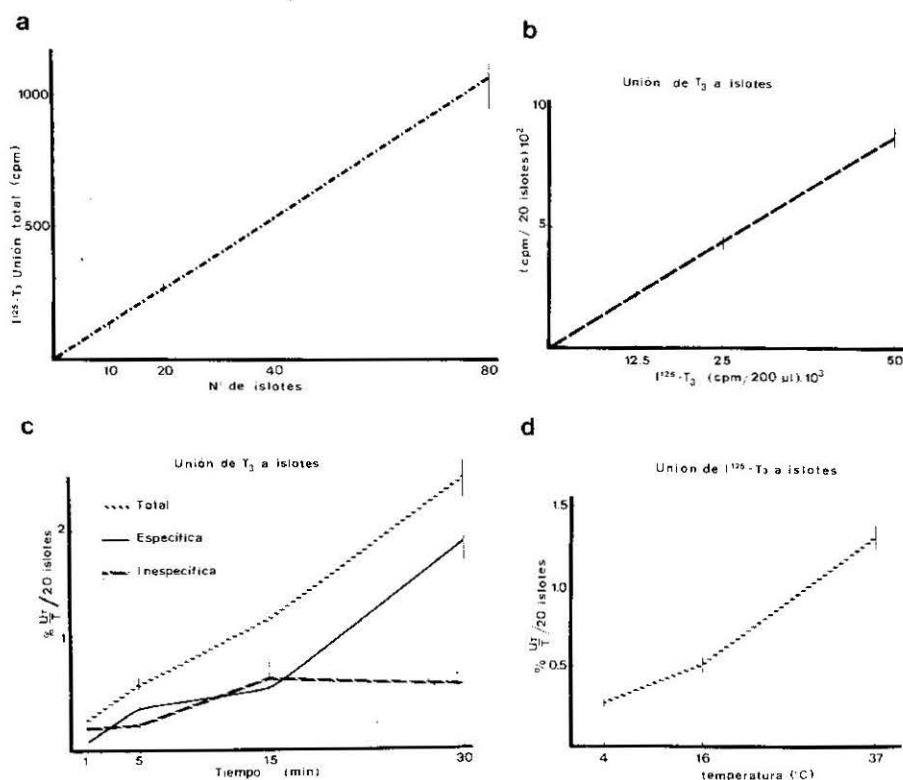


FIG. 18. Unión de $^{125}\text{I-T}_3$ a islotes aislados. Islotes aislados de ratas Wistar se incubaron bajo diferentes condiciones experimentales con $^{125}\text{I-T}_3$ en KRB-glucosa 3,3 mM pH 7,4. La separación de la hormona libre de la unida se realizó como se describe en otra parte (102). La unión inespecífica se midió en presencia de T_3 10^{-4} M. La unión se estudió en función de: a) número de islotes; b) hormona marcada; c) tiempo de incubación y d) temperatura de incubación. Cada punto representa la media \pm ESM de 2-3 experimentos, cada uno hecho por triplicado.

UT: unión total; T: cuentas totales agregadas a cada tubo.

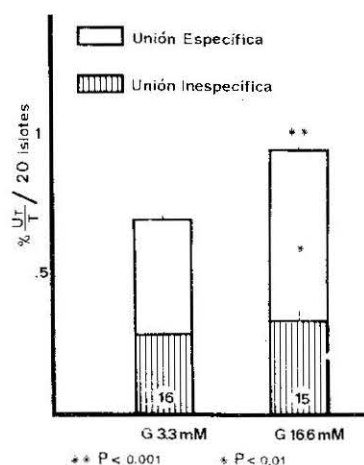


FIG. 19. Unión de T₃ a islotes en función de la concentración de glucosa. Grupos de 20 islotes aislados fueron incubados en 200 μ l de KRB con glucosa 3,3 ó 16,6 mM, pH 7,4, ¹²⁵I-T₃ (50.000 cpm/tubo) con o sin T₃ fría (10⁻⁴ M), durante 30 min a 37 °C. Cada barra representa la media \pm ESM de 4 experimentos hechos por triplicado. El análisis estadístico se realizó usando el test de t de Student. *: representa la diferencia entre la unión específica de islotes incubados en presencia de glucosa 3,3 y 16,6 mM. **: ídem para la unión total.

proporcional al número de islotes empleados. Es también lineal con la concentración del trazador empleado y con la temperatura de incubación entre 4 y 37 °C.

El *binding* total y específico (TB y SB, respectivamente) también se incrementa linealmente en función del tiempo de incubación hasta los 30 min. Sin embargo, el *binding* inespecífico (NB) alcanza un máximo a los 15 min de incubación, permaneciendo constante a partir de ese tiempo. Por lo tanto, se eligió un período de 30 min para los siguientes experimentos.

Una característica de este sistema, es que la unión específica es dependiente de la concentración de glucosa del medio (fig. 19), siendo mayor en presencia de 16,6 mM que de 3,3 mM de glucosa. Diferentes concentraciones de glucosa en el medio, no afectan la unión inespecífica.

La unión de ¹²⁵I-T₃ se estudió en presencia de diferentes concentraciones de T₃ no marcada, en el rango de 10⁻¹⁰ a 10⁻⁴ M, en presencia tanto de 3,3 como de 16,6 mM de glucosa (fig. 20). El *binding* máximo (en ausencia

TABLA VI. DATOS OBTENIDOS DEL ANÁLISIS DE SCATCHARD PARA LA UNIÓN DE T₃ A ISLOTES AISLADOS.

Parámetro	Glucosa 3,3 mM	Glucosa 16,6 mM
K _a ¹	2,1 10 ⁹	0,77 10 ⁹
R ¹	5,1 10 ⁸	5,1 10 ⁹
K _a ²	3,3 10 ⁵	0,3 10 ⁵
R ²	7,4 10 ¹²	2,2 10 ¹³

K_a = constante de afinidad (M⁻¹).
R = capacidad de los receptores (sitios/100 μ g proteína).

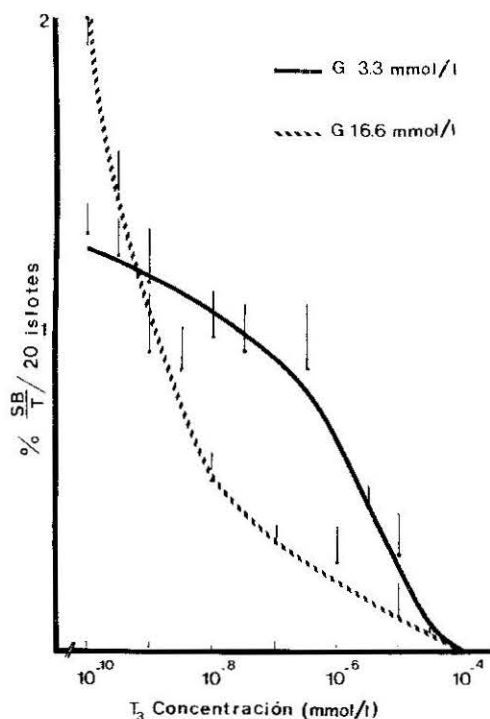


FIG. 20. Curva de desplazamiento de $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ unida a islotes. Islotes aislados fueron incubados como se indicó en la leyenda de la figura 19, en presencia de concentraciones crecientes de T_3 fría.

de T_3 fría) es mayor cuando los islotes son incubados frente a altas concentraciones de glucosa. Este *binding* disminuye progresivamente a medida que aumenta la concentración de T_3 fría. La forma de las curvas de desplazamiento son diferentes para los experimentos con glucosa 3,3 ó 16,6 mM de glucosa. En ambos casos, su pendiente sugiere la existencia de más de un sitio de unión.

El análisis de Scatchard de estos sitios revela la presencia de dos clases aparentes de sitios de unión, uno de alta afinidad y baja capacidad y otro de baja afinidad y alta capacidad. La tabla VI resume los datos obtenidos de este análisis.

Debido a las características de la preparación "cruda" empleada, nuestros valores de constantes deben considerarse como provisionales. Sin embargo, varias propiedades de los sitios de *binding* para T_3 reafirman la probabilidad de su existencia real y sugieren que ellos están ligados a la acción de las hormonas sobre los islotes de Langerhans. Previamente se han descrito en otros tejidos la existencia de sitios de alta y baja afinidad, similares a los encontrados en los islotes (22) (24) (26) (27) (112-116). En nuestro caso, las propiedades de los sitios de unión de T_3 son fuertemente influidos por la concentración extracelular de glucosa, un regulador bien conocido de la función del islote.

Por otro lado, las propiedades de estos sitios recuerdan los cambios en el *binding* de T_3 ya descritos, de acuerdo al grado de utilización de la glucosa por las células (117).

Además, las afinidades relativas de los sitios de unión a T_3 en los islotes, guarda una estrecha correlación con la concentración de T_3 necesaria para modificar la respuesta secretoria de los islotes al estímulo de glucosa (tablas III y IV). Este hecho refuerza la idea de una posible interacción entre los sitios de *binding* a T_3 y la respuesta fisiológica en islotes pancreáticos.

Deiodinación de Tiroxina: varios autores han considerado a la Tiroxina (T_4) como una hormona precursora de la T_3 (16) (18) (20). Su acción se lleva a cabo a través de su deiodinación a nivel del hígado y otros tejidos periféricos (20) a una forma biológicamente más activa, la T_3 . La existencia de sitios receptores para T_3 no necesariamente implica la presencia de tal sistema deiodinante de T_4 .

El metabolismo de T_4 por islotes, se estudia incubando islotes aislados en presencia de $^{125}\text{I}-T_4$ y glucosa 3,3 ó 16,6 mM (tabla VII) (102). Estos estudios revelan que los islotes son capaces de deiodinar T_4 produciendo T_3 , rT_3 e I^- . La producción de T_3 y rT_3 es dependiente de la concentración de la glucosa en el medio, siendo significativamente mayor en presencia de glucosa 16,6 mM.

TABLA VII. DEIODINACIÓN DE $^{125}\text{I}-T_4$ POR ISLOTES AISLADOS.

Glucosa (mM)	% de radiactividad total en el cromatograma				
	Origen	I^-	rT_3	T_4	T_3
3,3	3,45 ± 0,01	7,08 ± 0,18	2,48 ± 0,04	72,33 ± 4,01	3,83 ± 0,08
16,6	3,88 ± 0,06	12,21 ± 0,93	4,82 ± 0,93	62,76 ± 1,78	5,79 ± 0,38

Grupos de 100 islotes aislados de ratas Wistar, fueron incubados en 500 μl de *buffer* KRB, pH 7,4, con glucosa 3,3 ó 16,6 mM y 1 μCi de $^{125}\text{I}-T_4$ (actividad específica: 100-150 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) durante 60 min a 37 °C, en oscuridad. Al final de este período, los islotes fueron lavados y procesados como se indicó (102). Cada valor representa la media ± ESM, n = 4. El análisis estadístico se llevó a cabo usando el *test* de t de Student. Comparación entre grupos incubados con glucosa 3,3 vs. 16,6 mM:

Origen: no significativo.

I^- : P < 0,005.

rT_3 : P < 0,05.

T_4 : no significativo.

T_3 : P < 0,005.

El efecto de la glucosa sobre la deiodinación de T_4 ha sido atribuido a la provisión de NADPH a través de la vía de las pentosas (20). Sin embargo, recientemente se ha sugerido que la molécula de insulina *per se* puede estimular la deiodinación de T_4 . Dado que la vía de las pentosas es operativa en los islotes de Langerhans y la concentración de insulina es la más alta alcanzada en el cuerpo, ambas explicaciones son compatibles con el efecto de la glucosa sobre el metabolismo de T_4 .

Considerando la actividad específica de $^{125}\text{I}-T_4$ utilizada y el contenido de proteínas del islote, puede calcularse que la producción de T_3 a partir de T_4 es de 5.000 y 7.800 pg/mg de proteína, en presencia de glucosa 3,3 ó 16,6 mM, respectivamente. Estos datos son más altos que los descritos por otros autores en distintos tejidos. Por ejemplo, Harris (118) encontró que se producían 64 pg de T_3 /mg de proteína a partir de T_4 en el hígado. Pensamos que la alta capacidad deiodinante del islote responde a necesidades metabólicas propias y no alcanzaría para proveer de T_3 al resto de los tejidos del organismo, ya que en masa, el páncreas endocrino constituye aproximadamente el 1 % del páncreas total.

Estos resultados indican que los islotes son capaces de regular tanto la relación como los niveles intracelulares de las iodotironinas activa e inactiva. La presencia de tal fino mecanismo aporta más argumentos para pensar en una acción local de las hormonas tiroideas sobre los islotes pancreáticos. De esta manera, ellas pueden jugar un rol regulatorio directo sobre la secreción de insulina, a través de su metabolismo intracelular y posterior interacción con receptores específicos localizados en los islotes de Langerhans.

Conclusiones

De acuerdo con lo hasta aquí expuesto, queda claro que las hormonas tiroideas modifican la secreción de insulina en respuesta a la glucosa. Su modo de acción se traduce tanto a nivel periférico (indirecto) como local (directo) sobre el páncreas endocrino.

La regulación periférica se explica a través de cambios generales en la homeostasis endocrino-metabólica. La disminución en los niveles circulantes de hormonas tiroideas actuaría a nivel insular, probablemente a través de cambios metabólicos generales. Dichos cambios modificarían la producción de señales en el interior de la célula B, responsables del acoplamiento estímulo:respuesta, con la consiguiente disminución en la liberación de insulina.

La presencia de un mecanismo insular de deiodinación de T_4 y receptores específicos de T_3 , explicarían la acción directa de las hormonas tiroideas en los islotes de Langerhans. Esta acción se manifiesta a través de una modificación de la secreción de insulina que depende de la concentración de glucosa en el medio extracelular:potenciadora con glucosa baja, sin efecto con glucosa 12 mM e inhibidora en presencia de 16,6 mM.

Teniendo en cuenta nuestros resultados y los obtenidos por otros autores, creemos que se puede sugerir la siguiente hipótesis:

En el animal normal, las hormonas tiroideas regulan la función del páncreas endocrino por un doble mecanismo, directo o local e indirecto a través de cambios metabólicos producidos en la homeostasis del organismo.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Juan José Gagliardino, por su guía y críticas en la preparación de esta revisión. Al Sr. Pedro Allegre por el material fotográfico y la presentación de este trabajo.

Los experimentos del autor fueron parcialmente subsidiados con fondos del CONICET, CIC provincia de Buenos Aires y Fundación Lucio Cherny de Argentina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HOUSSAY, B. A., "Thyroid and metathyroid diabetes", *Endocrinology*, **35**, 158-172, 1944.
2. HOUSSAY, B. A., "The thyroid and diabetes", *Vitamins and Hormones*, **4**, 187-206, 1946.
3. KATSILAMBROS, N.; ZIEGLER, R.; SCHATZ, H.; HINZ, M.; MAIER, V. and PFEIFFER, E. F., "Intravenous glucose tolerance and insulin secretion in the rat after thyroidectomy", *Horm. Metab. Res.*, **4**, 377-379, 1972.
4. MARECEK, R. L. and FELDMAN, J. M., "Effect of hyperthyroidism on insulin and glucose dynamics in rabbits", *Endocrinology*, **92**, 1.604-1.611, 1973.

5. SHAH, J. H. and CERCHIO, G. M., "Hypoinsulinemia of hypothyroidism", *Arch. Intern. Med.*, 132, 657-661, 1973.
6. RENAULD, A.; SVERDLIK, R. C. and ANDRADE, L. L., "Effect of hypothyroidism on serum immunoreactive insulin, free fatty acids and blood sugar in the dog as tested for oral glucose tolerance. Corrective effects of thyroxine therapy", *Horm. Metab. Res.*, 6, 137-141, 1974.
7. SHAH, J. H.; MOTTO, G. S.; PAPAGIANNES, E. and WILLIAMS, G. A., "Insulin metabolism in hypothyroidism", *Diabetes*, 24, 922-925, 1975.
8. RENAULD, A.; SVERDLIK, R. C.; ANDRADE, L. L. and RODRÍGUEZ, R. R., "Experimental hyperthyroidism in dogs evaluation and effects on blood sugar, serum insulin and free fatty acids during glibenclamide infusion test", *Horm. Metab. Res.*, 7, 382-385, 1975.
9. ZAMRAZIL, V.; NEDVIDKOVA, J.; FELT, V.; NEMIC, J. and HAVELKA, J., "The influence of thyroid function on the diabetogenic action of thiamcinolone in man. Glucose insulin and growth hormone patterns after oral load", *Horm. Metab. Res.*, 8, 282-286, 1976.
10. ANDERSEN, O. O.; FRUUS, T. and OTTESEN, B., "Glucose tolerance and insulin secretion in hyperthyroidism", *Acta Endocr.*, (Copenh.), 84, 576-587, 1977.
11. KACIUBA-USCILKO, H. and BRZEZINSKA, Z., "Effect of Thyroxine treatment on metabolic responses to a single insulin injection", *Horm. Metab. Res.*, 11, 561-566, 1979.
12. MALAISSE, W. J.; MALAISSE-LAGAE, F. and MCGRAW, F., "Effects of thyroid function upon insulin secretion", *Diabetes*, 16, 643-646, 1967.
13. LENZEN, S.; JOOST, H. G. and HASSELBLATT, A., "Thyroid function and insulin secretion from the perfused pancreas in the rat", *Endocrinology*, 99, 125-129, 1976.
14. AHREN, B. and LUNDQUIST, I., "Insulin secretory response to different secretagogues in hyper- and hypothyroid mice", *Acta Endocr.*, (Copenh.), 97, 508-513, 1981.
15. KENDALL-TAYLOR, P., "Thyroid function and disease", en *Recent advances in endocrinology and metabolism*, O'Riordan, J. L. H. and Livingstone, C. (eds.), 37-59, 1978.
16. LARSEN, P. R.; SILVA, J. E. and KAPLAN, M. M., "Relationships between circulating and intracellular thyroid hormones: physiological and clinical implications", *Endocrine Rev.*, 2, 87-102, 1981.
17. PISAREV, M. A., "Mecanismo de acción de las hormonas tiroideas", en *Endocrinología molecular*, Calandra-De Nicola (eds.), 39-46, 1981.
18. FRIEDEN, E., "Iodine and thyroid hormones", *Trends Biochem. Sci.*, 6, 50-53, 1981.
19. RAO, G. S., "Mode of entry steroid and thyroid hormones into cells", *Mol. Cell Endocr.*, 21, 97-108, 1981.
20. CHOPRA, I. J.; SOLOMON, D.; CHOPRA, U.; SINGYUNG, W. U.; FISHER, D. A. and NAKAMURA, Y., "Pathway of metabolism of thyroid hormones", *Rec. Prog. Horm. Res.*, 34, 521-567, 1978.
21. VIDAL, A.; ULLOA, E. R.; BOADO, S. y ZANINOVICH, A. A., "Deiodinación de la tiroxina por tejidos de rata diabética. Efectos de la insulina *in vitro*", *Medicina*, 40, 407-410, 1980.
22. OPPENHEIMER, J. H., "Thyroid hormone action at the cellular level", *Science*, 203, 971-979, 1979.
23. DEGROOT, L. J. and NAKAMURA, H., "Thyroid hormones receptors and action", en *Tiroides '82*. Proceeding of the first latin american thyroid congress. Niempomiszczce, H., Pisarev, M. A. (eds.), 13-32, 1982.
24. STERLING, K; MILCH, P. O.; BRENNER, M. A. and LAZARUS, J., "Thyroid hormone action: the mitochondrial pathway", *Science*, 199, 996-999, 1980.
25. INGBAR, S. H. and SEGAL, J., "Observation in support of the hypothesis that thyroid hormones act at the level of the cellular plasma membranes", en *Tiroides '82*. Proceeding of the first latin american thyroid congress, Niempomiszczce, H., Pisarev, M. A. (eds.), 33-41, 1982.
26. PLIAM, N. B. and GOLDFINE, I. D., "High affinity thyroid hormone binding sites on purified rat liver plasma membranes", *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 79, 166-172, 1977.
27. SEGAL, J. and INGBAR, S. H., "Specific binding sites for triiodothyronine in the plasma membrane of rat thymocytes. Correlation with biochemical responses", *J. Clin. Invest.*, 70, 919-926, 1982.

28. TATA, J. R., "Growth and developmental action of thyroid hormones at the cellular level", en *Handbook of Physiology*, sec. 7, *Endocrinology*, vol. III. Thyroid. R. O. Greep and E. B. Astwood (eds.), Washington, D.C. American Physiological Society, 469-478, 1974.
29. GLASSCOCK, G. F. and NICOLL, C. S., "Hormonal control of growth in the infant rat", *Endocrinology*, 109, 176-184, 1981.
30. CORTIZO, A. M.; GÓMEZ DUMM, C. L. A. and GAGLIARDINO, J. J., "Effect of thyroid hormone levels upon pancreatic islet function", *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.*, 35, 181-191, 1985.
31. GARCÍA, M. D.; ESCOBAR DEL REY, F. and MORREALE DE ESCOBAR, G., "Thyrotropin-releasing hormone and thyroid hormone interactions on Thyrotropin secretion in the rat: lack of inhibiting effects of small doses of triiodo-L-thyronine in the hypothyroid rat", *Endocrinology*, 98, 203, 1976.
32. DE GROOT, L. J. (ed.), *Thyroid gland.*, *Endocrinology*, vol. I, 305.
33. GÓMEZ DUMM, C. L. A.; CORTIZO, A. M. and GAGLIARDINO, J. J., "Morphological and functional changes in several endocrine glands induced by hypothyroidism in the rat", *Acta anat.*, 124, 81-87, 1985.
34. GOLUBOFF, L. G.; MAC RAE, M. E.; AZRIN, C. and SELLERS, E. A., "Autoradiography of tritiated thymidine labeled anterior pituitary cells in propylthiouracil treated rats", *Endocrinology*, 87, 1.113-1.118, 1970.
35. DEFESI, C. R.; ASTIER, H. S. and SURKS, M. I., "Kinetics of thyrotrophs and somatotrophs during development of hypothyroidism and L-triiodothyronine treatment of hypothyroid rats", *Endocrinology*, 104, 1.172-1.180, 1979.
36. COPINCHI, G.; LECLERQ, R.; BRUNO, O. D. and CORNIL, A., "Effects of altered thyroid function upon cortisol secretion in man", *Hormone Metab. Res.*, 3, 437-442, 1971.
37. LENZEN, S. and BAILEY, C. J., "Thyroid hormones, gonadal and adrenocortical steroid and the function of the islets of Langerhans", *Endocr. Rev.*, 5, 411-434, 1984.
38. BRATUSCH-MARRAIN, P. R., "Insulin-counteracting hormones: their impact on glucose metabolism", *Diabetologia*, 24, 74-79, 1983.
39. CINGOLANI, G. E. de; CORTIZO, A. M. and GAGLIARDINO, J. J., "Effect of hypothyroidism on glucose metabolism by isolated rat fat cell", *IRCS Medical Science*, 9, 737-738, 1981.
40. CZECH, M. P.; MALBON, C. C.; KERMAN, K.; GITOMER, W. and PILCH, P. F., "Effect of thyroid status on insulin action in rat adipocytes and skeletal muscle", *J. Clin. Invest.*, 66, 574-582, 1980.
41. HEDESKOV, C. J., "Mechanism of glucose-induced insulin secretion", *Phys. Rev.*, 60, 442-509, 1980.
42. GAGLIARDINO, J. J.; HERNÁNDEZ, R.; GÓMEZ DUMM, C. y REBOLLEDO, O., "Fisiología del islote", en *Diabetes Mellitus*, M. Ruiz (ed.), 34-66, 1986.
43. LACY, P. E., "Functional morphology of the islet cells", *Nobel Symp.*, 13, 109-113, 1970.
44. MALAISSE, W. J.; SENER, A.; HERCHUELZ, A. and HUTTON, J. C., "Insulin release: the fuel hypothesis", *Metabolism*, 28, 373-386, 1979.
45. STEINER, D. F., "Insulin today", *Diabetes*, 26, 322-340, 1977.
46. ITOH, N. and OKAMOTO, H., "Translational control of proinsulin synthesis by glucose", *Nature*, 283, 100-102, 1980.
47. AERTS, L.; VAN ASSCHE, F. A.; FAURE, A. and SUTTER-DUB, M. T., "Effects of treatment with progesterone and oestradiol-17 β on the endocrine pancreas in ovariectomized rats: ultrastructural variations in the B cells", *J. Endocrinol.*, 84, 317-322, 1980.
48. LACY, P. E.; FINKE, E. H. and CODILLA, R. C., "Cinematic studies on B granule movement in monolayer culture islet cells", *Lab. Invest.*, 33, 570-576, 1975.
49. SHINITZKY, M. and HENKART, P., "Fluidity of cell membranes-current concepts and trends", *Int. Rev. of Cytol.*, 60, 121-147, 1979.
50. ORCI, L., "Macro- and micro-domains in the endocrine pancreas", *Diabetes*, 31, 538-565, 1982.
51. MALAISSE, W. J., "Etude de la secretion insulínique in vitro", *Collection Medicomonographies d'agreges*, Editions Arsacia s.a. Bruxelles, 46-71, 1969.
52. HELLMAN, B.; SEHLIN, J. and TALJEDAL, I.-B., "Evidence for mediated transport of glucose in mammalian pancreatic-cells", *Biochim. Biophys. Acta*, 241, 147-154, 1971.

53. HELLMAN, B.; IDAHL, L.-Å.; LERNMARK, A.; SEHLIN, J. and TALJEDAL, I.-B., "The pancreatic cell recognition of insulin secretagogues. Effects of calcium and sodium on glucose metabolism and insulin release", *Biochem. J.*, **138**, 33-45, 1974.
54. HELLMAN, B.; IDAHL, L.-Å.; SEHLIN, J. and TALJEDAL, I.-B., "Influence of anoxia on glucose metabolism in pancreatic islets: lack of correlation between fructose-1,6-diphosphate and apparent glycolytic flux", *Diabetologia*, **11**, 495-500, 1975.
55. LERNMARK, A.; SEHLIN, J. and TALJEDAL, I.-B., "The use of dispersed pancreatic islet cells in measurements of transmembrane transport", *Anal. Biochem.*, **63**, 73-79, 1975.
56. ASHCROFT, S. J. H., "Glucoreceptor mechanism and the control of insulin release and biosynthesis", *Diabetologia*, **18**, 5-15, 1980.
57. TRUS, M. D.; ZAWALICH, W. S.; BURCH, P. T.; BERNER, D. K.; WEILL, V. A. and MATSCHINSKY, F. H., "Regulation of glucose metabolism in pancreatic islets", *Diabetes*, **30**, 911-922, 1981.
58. ASHCROFT, S. J. H.; WEERASINGHE, L. C. C.; BASSETT, J. M. and RANDLE, P. J., "The pentose cycle and insulin release in mouse pancreatic islets", *Biochem. J.*, **126**, 525-532, 1972.
59. HEDESKOV, C. L. and CAPITO, K., "The pentose cycle and insulin release in isolated mouse pancreatic islets during starvation", *Biochem. J.*, **152**, 571-576, 1975.
60. MALAISSE, W. J.; MALAISSE-LAGAE, F. and MAYHEW, D., "A possible role for the adenylcyclase system in insulin secretion", *J. Clin. Invest.*, **46**, 1.724-1.734, 1967.
61. PANTEN, U.; CHRISTIANS, J.; KRIEGSTEIN, E. V.; POSER, W. and HASSELBLATT, A., "Effect of carbohydrates upon fluorescence of reduced pyridine nucleotides from perfused isolated pancreatic islets", *Diabetologia*, **9**, 477-482, 1973.
62. AMMON, H. P. T.; GRIMM, A.; LUTZ, S.; WAGNER-TESCHNER, D.; HANDEL, L. and HAGENLOH, I., "Islet glutathione and insulin release", *Diabetes*, **29**, 830-834, 1980.
63. DEAN, P. M. and MATTHEWS, E. K., "Electrical activity in pancreatic islet cells", *Nature*, **219**, 389-390, 1968.
64. SUGDEN, C. M.; CHRISTIE, M. R. and ASHCROFT, S. J. H., "Presence and possible role of calcium-dependent regulator (calmodulin) in rat islets of Langerhans", *FEBS Lett.*, **105**, 95-100, 1979.
65. GAGLIARDINO, J. J.; HARRISON, D. E.; CHRISTIE, M. R.; GAGLIARDINO, E. E. and ASHCROFT, S. J. H., "Evidence for the participation of calmodulin in stimulus-secretion coupling in the pancreatic B cell", *Biochem. J.*, **192**, 919-927, 1980.
66. CURRY, D. L.; BENNETT, L. L. and GRODSKY, G. M., "Requirement for calcium ion in insulin secretion by the perfused rat pancreas", *Am. J. Physiol.*, **214**, 174-178, 1968.
67. GRODSKY, G. M. and BENNETT, L. L., "Cation requirement for insulin secretion in the isolated perfused pancreas", *Diabetes*, **15**, 910-913, 1966.
68. HELLMAN, B., "The significance of calcium for glucose stimulation of insulin release", *Endocrinology*, **97**, 392-398, 1975.
69. WOLLHEIM, C. B. and SHARP, G. W., "Regulation of insulin release by calcium", *Physiol. Rev.*, **61**, 914-973, 1981.
70. MCDONALDS, J. M.; PERSHADSINGH, C. G.; BRY, M. L.; MCDANIEL, M. L. and LACY, P. E., "Identification of a high affinity Ca^{2+} -ATPase in plasma membranes from pancreatic islets" (abstr.), *Fed. Proc.*, **39**, 380, 1980.
71. FORMBY, B.; CAPITO, K.; AGERBERG, J. and HEDESKOV, C. J., "Ca-activated ATPase activity in subcellular fractions of mouse pancreatic islets", *Am. J. Physiol.*, **230**, 441-448, 1976.
72. SCHAFER, H. J. and KLOPPEL, G., "The significance of calcium in insulin secretion. Ultrastructural studies on identification and localization of calcium in activated and inactivated B cells of mice", *Vichows Arch.*, **A362**, 231-245, 1974.
73. HOWELL, S. L.; MONTAGUE, W. and TYHURST, M., "Calcium Distribution in islets of Langerhans: a study of calcium accumulation in B cell organelles", *J. Cell Sci.*, **19**, 395-409, 1975.
74. HERMAN, L.; SATO, T. and HALES, C. N., "The electron microscopic localization of cations to pancreatic islets of Langerhans and their possible role in insulin secretion", *J. Ultrastruct. Res.*, **42**, 298-311, 1973.
75. RAVAZZOLA, M.; MALAISSE-LAGAE, F.; AMHERDT, M.; PERRELET, A.; MALAISSE, W. J. and ORCI, L., "Patterns of calcium localization in pancreatic endocrine cells", *J. Cell Sci.*, **27**, 107-117, 1976.
76. KLOPPEL, G.; BOMMER, G. RUTTMAN, E. and SCHAFER, H. J., "Qualitative and semiquantitative calcium cytochemistry in B cells of mice treated with cyproheptadine and mannoheptulose", *Acta Endocr. (Copenh.)*, **87**, 786-798, 1978.

77. KLOPPEL, G. and BOMMER, G., "Ultracytochemical calcium distribution in B cells in relation to biphasic glucose-stimulated insulin release by the perfused rat pancreas", *Diabetes*, 28, 585-592, 1979.
78. GAGLIARDINO, J. J.; SEMINO, M. C.; REBOLLEDO, O. R.; GÓMEZ DUMM, C. L. and HERNANDEZ, R. E., "Sequential determination of calcium distribution in B cells at the various phases of glucose-induced insulin secretion", *Diabetologia*, 26, 290-296, 1984.
79. GAGLIARDINO, J. J., "Concurrent factors in the regulation of insulin secretion", En 11th Congress of the International Diabetes Federation, Nov. 10-17, Nairobi, Kenya, 1982. *Excerpta Medica*, Amsterdam, 19-27, 1982.
80. CHEUNG, W. Y., "Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation", *Science*, 207, 19-27, 1980.
81. MEANS, A. R., "Calmodulin: properties, intracellular localization and multiple roles in cell regulation", *Recent. Progr. Horm. Rec.*, 37, 333-368, 1981.
82. GAGLIARDINO, J. J., "Calmodulin-dependence of calcium uptake in pancreatic islets", *IRCS Medical Science*, 9, 572-573, 1981.
83. LEVIN, R. M. and WEISS, B., *Mol. Pharmacol.*, 13, 690-697, 1977.
84. PERSHADSINGH, H. A.; MCDANIEL, M. L.; LANDT, M.; BRY, C. G.; LACY, P. E. and MCDONALD, J. M., "Ca²⁺-activated ATPase and ATP-dependent calmodulin stimulated Ca²⁺ transport in islet cell plasma membrane", *Nature*, 288, 492-495, 1980.
85. MITCHELL, R. H., "Inositol phospholipids and cell surface receptor function", *Biochim. Biophys. Acta*, 415, 81-147, 1975.
86. BERRIDGE, M. J., "Receptors and calcium signalling", *Trends-Pharmacol. Sci.*, 1, 419-424, 1980.
87. BERRIDGE, M. J., "Phosphatidylinositol hydrolysis: a multifunctional transducing mechanism", *Mol. Cell Endocr.*, 24, 115-140, 1981.
88. PUTNEY, J. W. (Jr.), "Recent hypothesis regarding the phosphatidylinositol effect", *Life Sci.*, 29, 1.183-1.194, 1981.
89. VAN DEENEN, L. L. M., "Topology and dynamics of phospholipids in membranes", *FEBS Lett.*, 123, 3-15, 1981.
90. FEX, C. and LERNMARK, A., "Effect of D-glucose on the incorporation of ³²P into phospholipids of mouse pancreatic islets", *FEBS Lett.*, 25, 287-291, 1972.
91. FREINKEL, N.; EL YOUNSI, C. and DAWSON, R. M., "Interrelation between the phospholipids of the pancreatic islets during glucose stimulation and their response to medium inositol and tetracaine", *Eur. J. Biochem.*, 59, 245-252, 1975.
92. CLEMENTS, R. S. (Jr.) and RHOTEN, W. B., "Phosphoinositide metabolism and insulin secretion from isolated rat pancreatic islets", *J. Clin. Invest.*, 57, 684-691, 1976.
93. CLEMENTS, R. S. (Jr.); RHOTEN, W. B. and STARNES, W. R., "Subcellular localization of the alteration in phosphatidylinositol metabolism following glucose-induced insulin release from pancreatic islets", *Diabetes*, 26, 1.109-1.116, 1977.
94. SANDO, H.; AKANUMMA, Y. and KOSAKA, K., "Effect of sodium desoxycholate and phospholipase C on insulin secretion", *Horm. Metab. Res.*, 9, 94, 1977.
95. MONTAGUE, W. and PARKIN, E. N., "Changes in membrane lipids of the B-cell during insulin secretion", *Horm. Metab. Res.*, suppl., 10, 153-157, 1980.
96. CLEMENTS, R. S. (Jr.), EVANS, M. H. and PACE, C. S., "Substrate requirements for the phosphoinositide response in rat pancreatic islets", *Biochim. Biophys. Acta*, 674, 1-9, 1981.
97. CANDELA, S. B.; HERNÁNDEZ, R. E. and GAGLIARDINO, J. J., "Prostaglandins in the islets of Langerhans: synchronous release of PG F_{2α} and insulin following acetylcholine administration", *IRCS Med. Sci.*, 9, 381-382, 1981.
98. KELLY, K. L. and LAYCHOCK, S. G., "Prostaglandins synthesis and metabolism in isolated pancreatic islets of rat", *Prostaglandins*, 21, 759-769, 1981.
99. ROBERTSON, R. R., "Prostaglandins as modulators of pancreatic islet function", *Diabetes*, 28, 943-948, 1979.
100. LACY, P. E. and KOSTIANOVSKY, M., "Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas", *Diabetes*, 16, 35-39, 1967.
101. VRBOBA, H. and HOWELL, S. L., "Long-term regulation of the insulin secretion", en Proceeding of VI International congress of endocrinology. Melbourne, Australia, febrero 10-16, 1980. *Endocrinology*, 607-610, 1980.
102. CORTIZO, A. M.; CHAZELBERG, G. D.; GAGLIARDINO, J. J.; GARCÍA, M. E.; PISAREV, M. A. and GAGLIARDINO, J. J., "Thyroid hormones binding and deiodination by pancreatic islets: relationship with their *in vitro* effect upon insulin secretion", Trabajo en consideración, 1986.

103. BRUNSTEDT, J.; NIELSEN, J. H., "Long-term effect of pH on B-cell function in isolated islets of Langerhans in tissue culture", *Diabetologia*, 15, 181-186, 1978.
104. CORTIZO, A. M.; GARCÍA, M. E.; PASQUINI, J. M. and GAGLIARDINO, J. J., "Effect of hypothyroidism on the composition and turnover rate of islet phospholipids", *IRCS Med. Sci.*, 12, 1.117-1.118, 1984.
105. VALVERDE, I.; SENER, A.; LEBRUN, P.; HERCHUELZ, A. and MALAISSE, W. J., "The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XLVII: The possible role of calmodulin", *Endocrinology*, 108, 1.305, 1.312, 1981.
106. WOLLHEIM, C. B.; KRAUSZ, Y.; WEIDENKELLER, D. E., SHARP, G. W. G., "Stimulation and inhibition of insulin release by trifluoperazine, an antagonist of Calmodulin", *Diabetologia*, 19, 325-328, 1981.
107. HENQUIN, J. C., "Effects of trifluoperazine and pimozide on stimulus secretion-coupling in pancreatic B-cells. Suggestion for a role of calmodulin", *Biochem. J.*, 196, 771-781, 1981.
108. KRAUSZ, Y.; WOLLHEIM, C. B.; SIEGEL, E. and SHARP, G. H. G., "Possible role of calmodulin in insulin release: studies with trifluoperazine in rat pancreatic islets", *J. Clin. Invest.*, 66, 603-607, 1980.
109. GAGLIARDINO, J. J.; HARRISON, D. E.; CHRISTIE, M. R.; GAGLIARDINO, E. E. de, and ASHCROFT, S. J. H., "Evidence for the participation of calmodulin in stimulus-secretion coupling in the pancreatic B cell", *Biochem. J.*, 192, 919-927, 1980.
110. WALLACH, S.; BELLAVIA, J.; GAMPONIA, P. J. and BRISTRIM, P., "Thyroxine induced stimulation of hepatic cell transport of calcium and magnesium", *J. Clin. Invest.*, 51, 1.572-1.577, 1972.
111. BEST, L. and MALAISSE, W. J., "Phospholipids and islet function", *Diabetologia*, 25, 299-305, 1983.
112. SAMUELS, H. H. and TSAI, J. S., "Thyroid hormone action in cell culture: demonstration of nuclear receptor in intact cells and isolated nuclei", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 70, 3.488-3.492, 1973.
113. OPPENHEIMER, J. H.; SCHWARTZ, H. L.; SURKS, M. I.; KOERNER, D. and DILLMANN, W. H., "Nuclear receptors and the initiation of thyroid hormone action", *Recent. Prog. Horm. Res.*, 32, 529-565, 1976.
114. BAXTER, J. D.; EBERHARDT, N. L.; APRILETTI, J. W.; JOHNSON, L. K.; IVARIE, R. D.; SCHACHTER, B. S.; MORRIS, J. A.; SEEBURG, P. H.; GOODMAN, H. M.; LATHAM, K. R.; POLANSKY, J. R. and MARTIAL, J. A., "Thyroid hormone receptors and responses", *Recent. Prog. Horm. Res.*, 35, 97-153, 1979.
115. STERLING, K., "Thyroid hormone action at the cell level", *N. Engl. J. Med.*, 300, 173-177, 1979.
116. INOUE, A.; NAKAGAWA, K. and MORISAWA, S., "Effect of DNA on thyroid hormone binding by specific receptor proteins from rat-liver nuclei", *Eur. J. Biochem.*, 114, 509-516, 1979.
117. WARTOFSKY, L.; LATHAM, K. R.; DJUH, Y. Y. and BURMAN, K. D., "Alterations in T₃ and T₄ receptor binding in fasting and diabetes mellitus", *Life Sci.*, 28, 1.683-1.691, 1981.
118. HARRIS, A. R. C.; FANG, S. L.; VAGANAKIS, A. G. and BAVERMAN, L. E., "Effect of starvation, nutriment replacement and hypothyroidism on in vitro hepatic T₄ to T₃ conversion in the rat", *Metabolism*, 27, 1.680-1.690, 1978.
119. SATO, K. and ROBBINS, J., "Thyroid hormone metabolism in primary culture rat hepatocytes. Effects of glucose, glucagon and insulin", *J. Clin. Invest.*, 68, 475-483, 1981.