

*La Serie Universitaria de la Fundación Juan March presenta resúmenes, realizados por el propio autor, de algunos estudios e investigaciones llevados a cabo por los becarios de la Fundación y aprobados por los Asesores Secretarios de los distintos Departamentos.*

*El texto íntegro de las Memorias correspondientes se encuentra en la Biblioteca de la Fundación (Castelló, 77. Madrid-6).*

*La lista completa de los trabajos aprobados se presenta, en forma de fichas, en los Cuadernos Bibliográficos que publica la Fundación Juan March.*

*Los trabajos publicados en Serie Universitaria abarcan las siguientes especialidades:  
Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas;  
Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales;  
Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía;  
Física; Geología; Historia; Ingeniería;  
Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina;  
Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología.  
A ellas corresponden los colores de la cubierta.*

Edición no venal de 300 ejemplares  
que se reparte gratuitamente a investigadores,  
Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Fundación Juan March



FJM-Uni 152-Cal  
Papel modulador de los glucocorticoides  
Calle García, Consuelo.  
1031588



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

Consuelo Calle García

Papel modulador de los  
glucocorticoides en la población de  
receptores para insulina y glucagón.

152 - Papel modulador de los glucocorticoides en la población de receptores para insulina y glucagón/Consuelo Calle García

FJM  
Uni-  
152  
Cal  
152



Fundación Juan March  
Serie Universitaria

152



Consuelo Calle García

Papel modulador de los  
glucocorticoides en la población de  
receptores para insulina y glucagón



Fundación Juan March  
Castelló, 77. Telef. 225 44 55  
Madrid - 6

Fundación Juan March (Madrid)

*Este trabajo fue realizado con una Beca de la  
Convocatoria de España, 1979, individual.  
Departamento de MEDICINA, FARMACIA y VETERINARIA.  
Centro de trabajo: Cátedra de Fisiología General, Química Biológica y Fisiología  
Especial. Facultad de Medicina de la Universidad Complutense.*

Los textos publicados en esta Serie Universitaria son elaborados por  
los propios autores e impresos por reproducción fotostática.

Depósito Legal: M - 20230 - 1981

I.S.B.N. : 84 - 7075 - 207 - 3

Impresión: Gráficas Ibérica, Tarragona, 34, Madrid-7

Debo manifestar mi más profundo  
agradecimiento a la Fundación JUAN MARCH  
por la concesión de esta beca de investi-  
gación sin la cual el presente trabajo no  
podría haberse llevado a cabo.

Asimismo, deseo transmitir mi gratitud a las siguientes  
personas: Prof. J. Tamarit, Prof. E. Blázquez, Prof. J.  
Tamarit Jr., Dra. I. Valverde. Pilar Mayor, María Anto-  
nia Simón, Felipe Gómez, Mercedes Jiménez y Paloma Cas-  
tro.



## INDICE

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCION .....	7
2. MATERIALES Y METODOS .....	9
2.1. Animales .....	9
2.2. Preparación de los adipocitos .....	10
2.3. Marcaje de la insulina y del glucagón .....	10
2.4. Estudios de unión .....	10
2.5. Estudios de degradación .....	11
2.6. Determinación de glicerol en el medio de incubación de los adipocitos .....	13
3. RESULTADOS .....	14
3.1. Unión de la insulina a sus receptores en adipocitos procedentes de ratas controles (S) y adrenalectomizadas (A) .....	14
3.2. Unión del glucagón a sus receptores en adipocitos procedentes de ratas controles (S) y adrenalectomizadas (A) .....	17
3.3. Efecto del tratamiento de sustitución con cortisona a la rata adrenalectomizada sobre la unión de la insulina a sus receptores en el adipocito .....	20
3.4. Efecto del tratamiento de sustitución con cortisona a la rata adrenalectomizada sobre la unión del glucagón a sus receptores en el adipocito .....	20
3.5. Degradación de la insulina y del glucagón .....	23
3.6. Valoración del glicerol en el medio de incubación de los adipocitos ..	24
4. DISCUSION .....	25
5. BIBLIOGRAFIA .....	30
6. RESUMEN .....	36



## 1. INTRODUCCION

=====

La primera comunicación sobre la influencia de la corteza suprarrenal en la secreción de insulina, se la debemos a Perley y Kipnis en 1966 (1). Pero no es hasta el año 1973 y siguientes cuando debido a nuestros trabajos se descubre una relación entre corteza suprarrenal y secreción de glucagón. Estos trabajos indican, que el tratamiento con glucocorticoides, estimula tanto la secreción de insulina como la de glucagón in vivo en el hombre (2), e in vitro en islotes pancreáticos procedentes de ratones previamente tratados con glucocorticoides (3). Y por el contrario, en la rata adrenalectomizada es detectable una disminución de la insulinemia, acompañada de una elevación de los niveles circulantes de glucagón (4).

Los descubrimientos a nivel de secreción y los nuevos conceptos de acción hormonal a través de la unión a receptores específicos a nivel de membrana, constituyeron dos líneas paralelas que permitieron comenzar a relacionar los valores en plasma de una hormona con el grado de unión de ésta a sus receptores específicos en una determinada célula diana.

Vann Bennett y Cuatrecasas en 1972 (5), relacionando la situación de resistencia periférica a la insulina producida por los glucocorticoides con grado de unión de la insulina a sus receptores, no detectan diferencias en la cantidad ni afinidad de los receptores para insulina en los adipocitos de ratas tratadas con prednisona (1 mg/día/7 días) cuando se les compara a controles.

En 1973, Goldfine y cols (6), detectan un decrecimiento en la unión de la insulina a sus receptores en membranas hepáticas procedentes de ratas con resistencia periférica a la insulina provocada por la implantación de un tumor artificial de pituitaria el cual segrega gran cantidad de GH, prolactina y ACTH; en contraste no son apreciables cambios en la unión del glucagón a sus receptores en estas circunstancias. En los mismos animales, la adrenalectomía restaura la unión de la insulina a sus receptores en membranas hepáticas según Kahn y cols (7).

En 1975, Olefsky y cols (8), describen los efectos agudos y crónicos de la administración de dexametasona sobre la unión de la insulina a hepatocitos y adipocitos. En general, hay una disminución de la unión de la insulina (30-50%) en relación a valores controles cuando se utilizan células de animales tratados con dexametasona, siendo el decrecimiento en la unión mayor, tras el tratamiento agudo (1,5 mg/Kg/6 días), que en el crónico (0,125 mg/Kg/ 21 días), en este último se detecta una tendencia hacia valores normales.

Estos mismos autores, no encontraron diferencias en la unión de la insulina a sus receptores en ratas adrenalectomizadas y controles, aunque no daban ningún resultado numérico, ni tampoco indicaban el número de días de la operación.

De nuevo Olefsky (9), en 1975, estudia el efecto de la dexametasona, pero ahora directamente in vitro, deduciendo que, la dexametasona ( $8 \times 10^{-8}$  M) durante dos horas de preincubación e incluso a diez veces esa concentración y aumentan- do el tiempo de preincubación hasta 5 horas, no decrece el tanto por cien de unión normal de la insulina a sus receptores en adipocitos, aunque inhibe otras funciones biológicas como el transporte de glucosa a través de la célula.

En 1978, Kahn y cols (10), indican que el tratamiento con dexametasona (1mg/ día/4 días) da lugar a un decrecimiento en la unión de sus receptores especí- ficos en membranas hepáticas a través de una disminución de la afinidad pero no de la capacidad. Mientras que la adrenalectomía, causa un incremento en la unión de la insulina a sus receptores debido a un incremento en la afinidad sin cambios aparentes asimismo en el número de receptores.

Por último, trabajos nuestros de 1980 (11), realizados durante nuestra estan- cia en el Institut fuer Diabetesforschung de Munich (Alemania Federal), indican que los adipocitos de ratas adrenalectomizadas en relación a controles, tienen un 37% de incremento en la unión de la insulina a sus receptores debido a un incremento en la capacidad pero no en la afinidad.

Por todo lo antes indicado, nos propusimos realizar el presente estudio de la modulación por los glucocorticoides de los receptores de insulina y glucagón, tanto en el sentido de aclarar las contradicciones entre los diversos autores por lo que respecta al receptor de insulina, como investigar la modulación por

los glucocorticoides del receptor de glucagón -sin estudiar hasta este momento-.

Dado que aparte de una acción a nivel de membrana de la célula diana, los glucocorticoides ejercen un control del metabolismo en el interior de esa célula; también quisimos relacionar la idea de unión con la de función.

Los parámetros de degradación tanto de la hormona como de su receptor, pueden influir en la acción biológica de esta hormona, por eso también hemos estudiado estos parámetros tanto para insulina como para glucagón.

## 2. MATERIALES Y METODOS

=====

### MATERIALES:

Los standards de glucagón y de insulina porcina fueron un generoso regalo de NOVO. La cortisona fue suministrada por SERVA. La albumina humana purísima fue de la firma BEHRING y la albumina bovina fracción V de SIGMA. El I<sup>125</sup> procede de RADIOCHEMICAL CENTER, AMERSHAN. La colagenasa fue de la marca WORTHINGTON. Las demás sustancias procedían de las firmas MERCK o SIGMA.

### METODOS:

#### 2.1. Animales

Los animales utilizados en todos los experimentos fueron ratas Wistar de 100-130 g. de peso, alimentadas "ad libitum" hasta el momento del sacrificio.

De estas ratas se hicieron tres grupos experimentales:

Grupo A: Ratas adrenalectomizadas bilateralmente durante 4 días (12), a las que se les suministraba suero fisiológico en la bebida, para suplir la deficiencia mineral-corticoide.

Grupo T: Ratas adrenalectomizadas y tratadas con cortisona (2mg/día/4 días).

Grupo S: Grupo control con simulación de la adrenalectomía.

Los animales eran sacrificados por decapitación sin anestesia. La adrenalectomía era comprobada "post-mortem".

## 2.2. Preparación de los adipocitos.

Los adipocitos aislados fueron extraídos del tejido epididimal de la rata a través de digestión con colagenasa, según el método de Rodbell (13). El buffer utilizado para la digestión y manejo de las células fue el Krebs-bicarbonato (14) con glucosa (3,3 mM) y pH 7,4. Se utilizó siempre un grupo de 4 epididimos y se incubó en un baño con agitación a 37° C durante 30 minutos.

Tras de la incubación, las células eran lavadas repetidamente con el buffer para separar los posibles restos de la colagenasa. Tras llevarlas a un volumen adecuado y gasearlas (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 95:5), las células eran contadas en un microscopio con la ayuda de una cámara de Neubauer, la concentración celular venía a ser de 100.000-200.000 cel en el volumen de muestra de 0,1 ml utilizado posteriormente para la incubación. No se detectaron diferencias estadísticamente significantes entre el tamaño de los adipocitos de los tres grupos de animales y fue del orden de 70-73 μm.

## 2.3. Marcaje de la insulina y del glucagón.

Tanto la mono-I<sup>125</sup> insulina como el mono-I<sup>125</sup> glucagón radioactivos fueron preparados en nuestro laboratorio con actividades específicas de (200-300 μCi/μg) y (450-550 μCi/μg) respectivamente, según una modificación del método de Nottey y Rosselin (15). Los marcajes se guardaron en alícuotas a -20°C y se usaron sólo una vez para cada ensayo. Cada marcaje puede ser utilizado aproximadamente durante un mes.

## 2.4. Estudios de unión.

Para los estudios de unión de ambas hormonas, los adipocitos (0,2-0,5 x 10<sup>6</sup> cels/ml) se incubaron a un volumen final de 350 μL con mono-I<sup>125</sup> insulina

( $0,1-0,2 \times 10^{-9}$  mol/l) o mono-I<sup>125</sup> glucagón ( $0,3-0,5 \times 10^{-9}$  mol/l) a 30° C, durante 30 minutos, en el buffer Krebs-Hepes pH 7,4 con glucosa (3,3 mM), A.H. (1%) y bacitracina (0,94 mM) en la presencia o ausencia respectivamente de insulina fría ( $0-0,125 \times 10^{-6}$  M) o glucagón frío ( $0-4,075 \times 10^{-7}$  M).

Tras de la incubación, los adipocitos fueron separados del medio de incubación por centrifugación a través de dinonilo-talato según Glieman y col (16), esta capa superior de células, que contiene a la hormona ligada, fue cortada y puesta a medir en un contador gamma.

Todos los resultados se expresarán en términos de "unión específica", sustrayendo la "unión no específica" que se produce en presencia de  $0,125 \times 10^{-6}$  M de insulina fría y de  $4,075 \times 10^{-7}$  M de glucagón frío.

Todos los resultados aparecerán normalizados para la concentración de  $10^6$  cel/ml.

## 2.5. Estudios de degradación.

### Degradación de la hormona:

El estudio de la degradación tanto de la mono-I<sup>125</sup> insulina como del mono-I<sup>125</sup> glucagón se llevó adelante a través de dos métodos:

- Precipitación por ácido tricloroacético 5%.
- Unión a nuevos adipocitos.

### Método de la precipitación por ácido tricloroacético.

Se tomaron como control muestras libres de células que representaron el 100% del sustrato capaz de ser degradado, es decir, la hormona monoyodada intacta real que existe.

Las otras muestras fueron alicuotas de 20  $\mu$ l de los infranadantes de cada una de las muestras de incubación en la no presencia de la hormona fría. A estos

infranadantes se les añadió respectivamente 180  $\mu\text{l}$  de buffer sin albúmina, 300  $\mu\text{l}$  de suero de carnero, y 0,5 ml de TCA al 10%. Tras de la centrifugación se separó el sobrenadante del soluto y se procedió a su contaje. El soluto o hormona precipitada por el TCA representará la hormona intacta, el sobrenadante la hormona degradada.

Los resultados los expresaremos como:

$$\begin{aligned} & \text{Tanto por cien H. intacta tras de la incubación} = \\ = & \frac{\text{Tanto por cien H. intacta de la muestra problema}}{\text{Tanto por cien H. intacta de la muestra libre de células}} \times 100 \end{aligned}$$

#### Método de la unión a nuevos adipocitos.

Se procedió a la primera incubación como en el caso del primer método, a continuación se tomaron las siguientes muestras:

- una alicuota de 50  $\mu\text{l}$  de la radioactividad inicial
- una alicuota de 150  $\mu\text{l}$  del infranadante que resulta de la centrifugación de la primera incubación de cada una de las muestras, se incubó otra vez (2° incubación) en las mismas condiciones anteriores pero en este caso con sus células respectivas nuevas.
- una alicuota de 50  $\mu\text{l}$  del infranadante de la 1° incubación de cada una de las muestras para contaje.

Los resultados los expresaremos como tanto por cien de unión de la hormona monoyodada durante la 2° incubación en relación a  $10^6$  células.

### Degradación del receptor.

Para el estudio de la degradación del receptor de insulina y de glucagón se procedió de la siguiente manera:

- 1° incubación, se incubaron alícuotas de 1 ml de adipocitos de cada una de las muestras en el buffer bicarbonato inicial, en las condiciones normales del sistema de incubación.
- 2° incubación, 100  $\mu$ l de cada una de estas muestras preincubadas, se incubaron de nuevo en las condiciones normales.

Los resultados los expresaremos como diferencia en tanto por cien de la unión a la hormona marcada de los adipocitos sin preincubación en relación a lo que unen los adipocitos preincubados.

### 2.6. Determinación de glicerol en el medio de incubación de los adipocitos.

Los adipocitos aislados por el método de la colagenasa se incubaron en el buffer Krebs-Hepes con A.B. 1%, añadiendo nada o norepinefrina como estímulo de la lipólisis a la concentración de  $0,14 \times 10^{-6}$  M.

Se incubó durante 1 hora a 37° C en un baño con agitación, tras lo cual, las muestras se centrifugaron a través de dinonilotalato para separar las células del medio de incubación. De este se tomaron las muestras de 100  $\mu$ l para valorar glicerol.

El método utilizado fue el de Lambert y Neish (17) con la modificación de Korn (18), es un método colorimétrico en el que se utiliza como reactivo el ácido cromotrópico.

Los resultados vendrán expresados como contenido de glicerol del medio de incubación en  $\text{nmol}/10^5$  cel/hora de incubación.

## 3. RESULTADOS

=====

3.1. Unión de la insulina a sus receptores en adipocitos procedentes de ratas controles (S) y adrenalectomizadas (A).

El efecto de la adrenalectomía sobre la unión de la insulina a sus receptores en relación a ratas controles, está representado en la Fig. 1. Es una representación de Scatchard, en abscisas está representada la hormona ligada (B), y en ordenadas la hormona ligada (B) partido por la hormona libre (F). Las constantes de afinidad para la interacción insulina receptor en ambas rectas de las dos gráficas son:

- Recta tangente de máxima afinidad y baja capacidad (sitio I)

$$(A) K_1 = 0,77 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$$

$$(S) K_1 = 0,76 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$$

- Recta tangente de mínima afinidad y alta capacidad (sitio II)

$$(A) K_2 = 0,48 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$$

$$(S) K_2 = 0,52 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$$

Como puede observarse en la figura 1, teniendo en cuenta los datos de las constantes de afinidad, en la adrenalectomía no hay diferencias en relación a controles en la afinidad de los receptores para insulina (representado por la inclinación de las dos rectas), pero sí un incremento en la capacidad ( $R_0$ ) (intercepción con las abscisas). Nuestros resultados muestran una elevación del 46% en el número de receptores para insulina en adipocitos de ratas (A) en relación a (S). Esta variación en capacidad podría modular o modificar la respuesta biológica.

En la Fig. 2, está representada otra forma de expresión de los mismos resultados. En abscisas está indicada la insulina total (radioactiva + fría) y en ordenadas la insulina ligada en  $\text{ng}/10^6$  cel. Como puede observarse, los adipocitos de ratas adrenalectomizadas ligan más insulina que los controles.

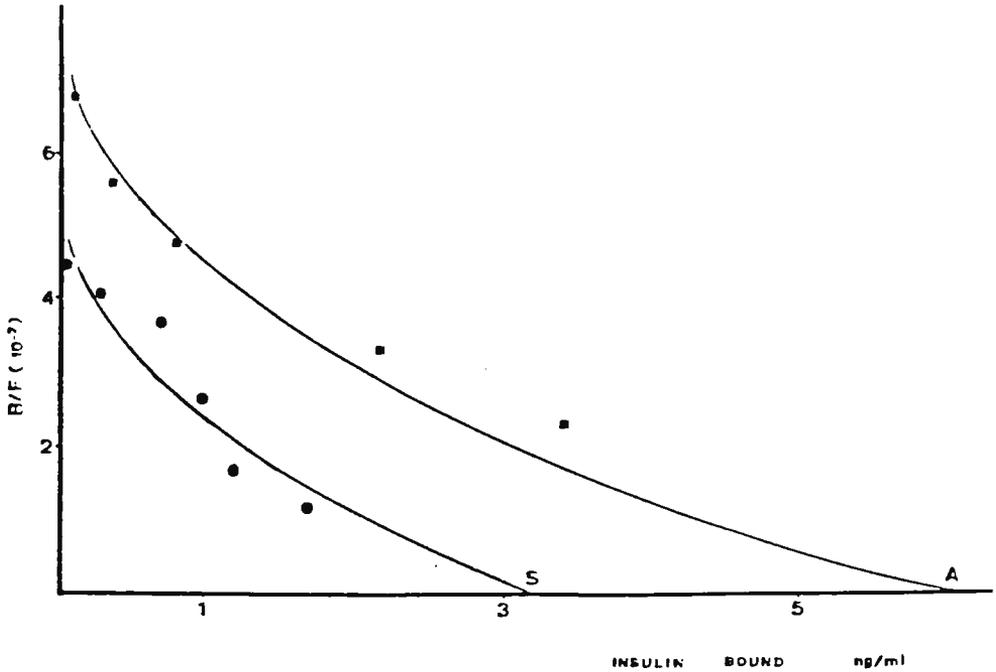


Figura 1. Representación de Scatchard de la unión de la insulina a sus receptores en adipocitos procedentes de ratas controles (S) y adrenalectomizadas (A).

En abscisas está representada la hormona ligada (B) y en ordenadas la hormona ligada (B) partido por la hormona libre (F).

Todos los datos están corregidos sustrayendo la unión inespecífica refiriéndola a la unión que se produce con  $0,1 \times 10^{-6}$  de insulina fría.

Los valores son media de dos experimentos realizados por triplicado.

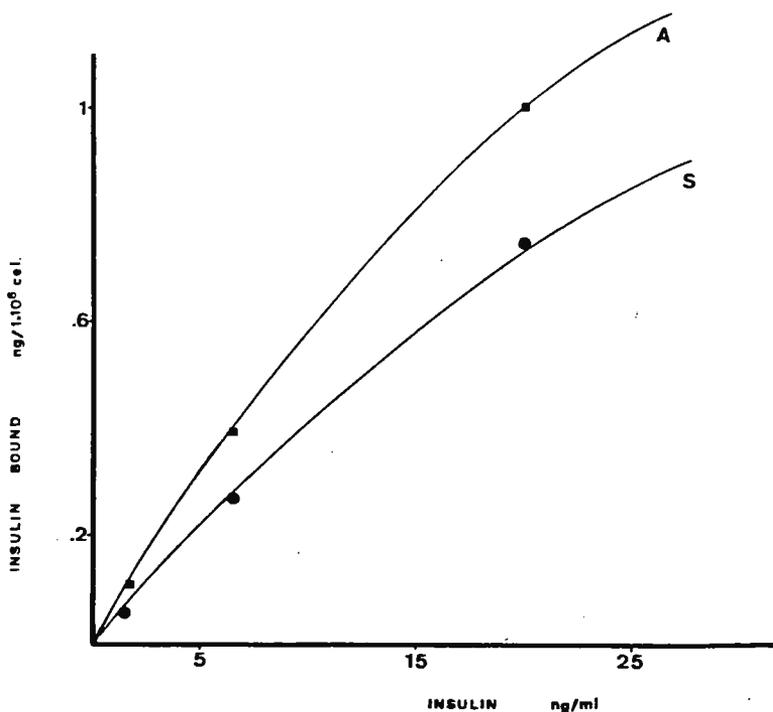


Figura 2. Habilidad de los adipocitos de ratas control (S) y adrenalectomizadas (A) para unirse a concentraciones crecientes de insulina (total).

En abscisas están representadas las concentraciones de insulina total (ng/ml) y en ordenadas la insulina ligada ( $\text{ng}/10^6$  cel).

Todos los datos están corregidos sustrayendo la unión inespecífica refiriéndola a la unión que se produce con  $0,1 \times 10^{-6}$  M de insulina fría.

Los valores son medio de dos experimentos, realizados por triplicado.

### 3.2. Unión del glucagón a sus receptores en adipocitos procedentes de ratas controles (S) y adrenalectomizadas (A).

El efecto de la adrenalectomía sobre la unión del glucagón a sus receptores en relación a ratas controles está representado en la Figura 3. Es una representación de Scatchard, en abscisas está representada la hormona ligada (B) y en ordenadas la hormona ligada (B) partido por la hormona libre (F). Las constantes de afinidad para la interacción glucagón-receptor en ambas rectas serán:

- Recta tangente de máxima afinidad y baja capacidad (sitio I)

$$(A) K_1 = 0,39 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$$

$$(S) K_1 = 0,27 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$$

- Recta tangente de mínima afinidad y alta capacidad (sitio II)

$$(A) K_2 = 0,21 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$$

$$(S) K_2 = 0,23 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$$

Como puede observarse en la Fig. 3, al igual que sucedía en la adrenalectomía no hay diferencias en relación a controles en la afinidad de los receptores, pero sí en su capacidad. Nuestros resultados muestran una disminución del 55% en el número de receptores para glucagón en adipocitos de ratas (A) en relación a (S). Como decíamos para la insulina, variaciones en la capacidad podrían modular la respuesta biológica.

En la Figura 4, está representada otra forma de expresión de los mismos datos. En abscisas está representado el glucagón total (radioactivo + frío) y en ordenadas el glucagón ligado en  $\text{pg}/10^6 \text{ cel.}$  Como es observable, los adipocitos de ratas adrenalectomizadas ligan menos glucagón que los controles.

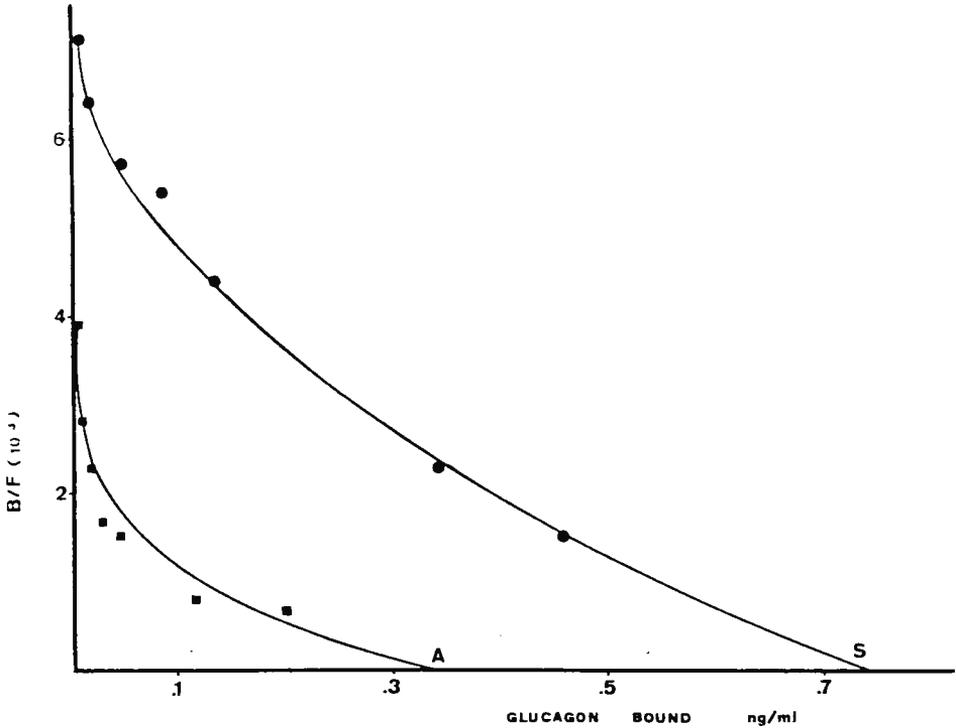


Figura 3. Representación de Scatchard de la unión del glucagón a sus receptores en adipocitos procedentes de ratas controles (S) y adrenalectomizadas (A).

En abscisas está representada la hormona ligada (B) y en ordenadas la hormona ligada (B) partipor la hormona libre (F).

Todos los datos están corregidos sustrayendo la unión inespecífica refiriéndola a la unión que se produce con  $4,075 \times 10^{-7}$  moles/l.

Los valores son media de cuatro experimentos para ratas controles y de tres para adrenalectomizadas siempre realizados por triplicado.

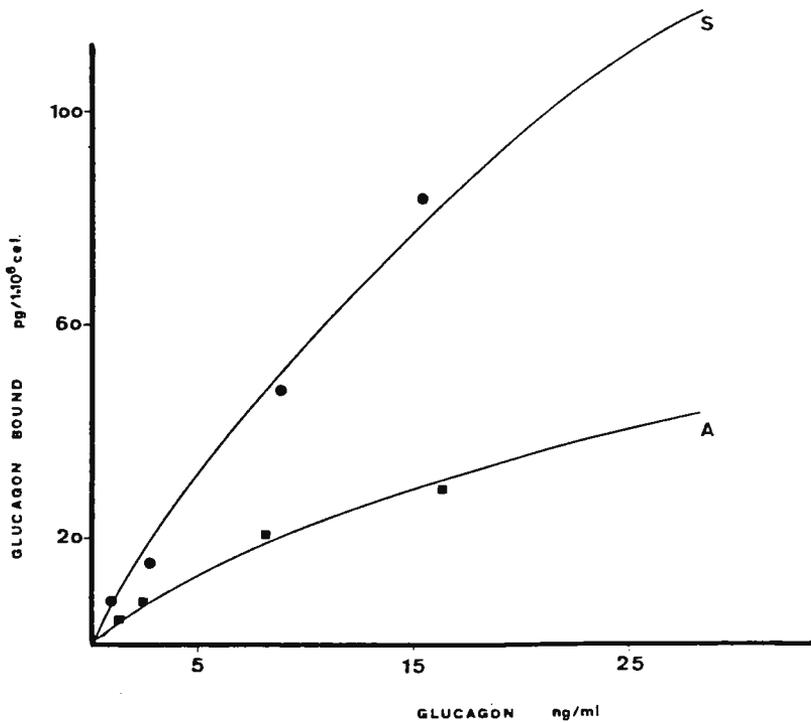


Figura 4. Habilidad de los adipocitos de ratas control (S) y adrenalectomizadas (A) para unirse a concentraciones crecientes de glucagón (total).

En abscisas están representadas las concentraciones de glucagón total (ng/ml) y en ordenadas el glucagón ligado (pg/10<sup>6</sup> cel).

Todos los datos están corregidos sustrayendo la unión inespecífica refiriéndola a la unión que se produce con  $4,075 \times 10^{-7}$  moles/l.

Los valores son media de cuatro experimentos para ratas controles y de tres para adrenalectomizadas siempre realizados por triplicado.

3.3. Efecto del tratamiento de sustitución con cortisona a la rata adrenalectomizada sobre la unión de la insulina a sus receptores en el adipocito.

En la Figura 5, está representado el efecto del tratamiento de sustitución con cortisona (2mg/día/4 días) a la rata adrenalectomizada sobre la unión de la insulina a sus receptores en adipocitos. Como puede observarse los adipocitos procedentes de ratas (T) ligan menos insulina que los correspondientes a ratas (A), estando su capacidad de unión muy cercana a la de los adipocitos procedentes de ratas controles (S). Es decir, tras el tratamiento con cortisona, los adipocitos de ratas tratadas, tienden a acercarse a la capacidad de unión de los adipocitos de ratas controles.

3.4. Efecto del tratamiento de sustitución con cortisona a la rata adrenalectomizada sobre la unión del glucagón a sus receptores en el adipocito.

En la Figura 6, está representado el efecto del tratamiento de sustitución con cortisona (2 mg/día/4 días) a la rata adrenalectomizada sobre la unión del glucagón a sus receptores en adipocitos. En este caso, contrariamente a lo que ocurre con la insulina, los adipocitos procedentes de ratas (T), ligan más glucagón que los correspondientes a ratas (A), situándose en un término medio entre (S) y (A), es decir, hay una especie de recuperación de la capacidad de unión tras el tratamiento corticoide.

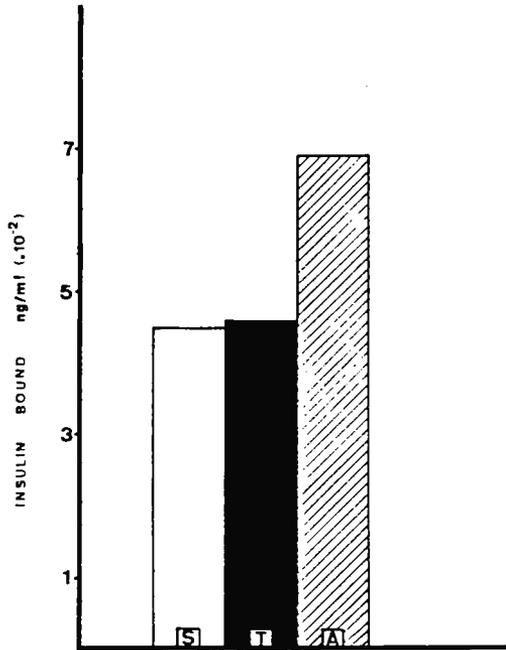


Figura 5. Efecto del tratamiento de sustitución con cortisona (2 mg/día/4 días) a la rata adrenalectomizada sobre la unión de la insulina a sus receptores específicos en el adipocito.

S (ratas controles), A (ratas adrenalectomizadas),  
T (ratas adrenalectomizadas + tratamiento cortisona).

Los valores son media de cuatro experimentos realizados por triplicado.

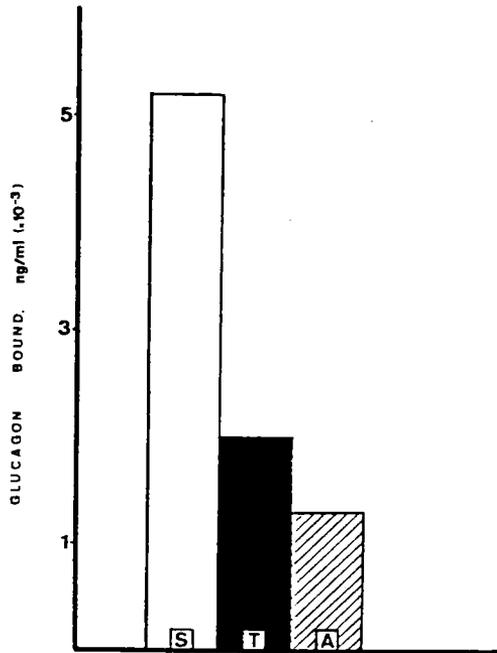


Figura 6. Efecto del tratamiento de sustitución con cortisona (2 mg/día/4 días) a la rata adrenalectomizada, sobre la unión del glucagón a sus receptores específicos en el adipocito.

S (ratas controles), A (ratas adrenalectomizadas)  
T (ratas adrenalectomizadas + tratamiento cortisona).

Los valores son media de cuatro experimentos realizados por triplicado.

### 3.5. Degradación de la insulina y del glucagón.

#### Método de la precipitación por tricloroacético.

La degradación de la insulina radioactiva en presencia de adipocitos, en nuestras condiciones de incubación tanto de ratas controles (S) como adrenalectomizadas (A) y tratadas (T), representa un 5-6%. Mientras que la degradación del glucagón en idénticas circunstancias viene representando un 18-20%.

Recordemos que tanto para el estudio de la unión de la insulina como del glucagón, utilizamos siempre Bacitracina (0,94 mM) en el medio de incubación como sustancia antidegradante (19), si no lo hicieramos, más del 80% del glucagón y más del 30% de la insulina, sufrirían degradación tras el proceso de incubación.

Es de resaltar el hecho de la no variación, según este método, de los valores de degradación producidos por adipocitos procedentes tanto de ratas (A), como (T) o (S), tanto de insulina como de glucagón.

#### Método de la unión a nuevos adipocitos.

Según este método, la insulina radioactiva se une aproximadamente entre un 7-8% a  $10^6$  adipocitos nuevos, procedentes tanto de ratas controles (S) como de adrenalectomizadas (A) y tratadas (T).

A su vez el glucagón radioactivo se une específicamente entre un 0,2-0,3% a  $10^6$  adipocitos procedentes de los tres tipos de ratas.

Resumiendo, ni por el método de unión a nuevas células, ni por el método del TCA, se detectan variaciones en la degradación de ambas hormonas producidas por los adipocitos de los tres tipos de ratas. Es decir, ni la adrenalectomía, ni el tratamiento de sustitución con corticoides, son causa de una diferente degradación por el tejido graso epididimal de la rata blanca.

### Degradación de los receptores de insulina y de glucagón.

El receptor de insulina tanto en adipocitos procedentes de ratas controles (S), como adrenalectomizadas (A) o tratadas (T) con cortisona, sufre una degradación mínima (entre el 0-4%). Sin embargo, el receptor de glucagón sufre distinto porcentaje de degradación según proceda de adipocitos de ratas controles (20%), ratas adrenalectomizadas (34%) o ratas tratadas (0).

Estas diferencias en la degradación del receptor de glucagón quizá pueda ser una de las formas de control por los glucocorticoides de la unión del glucagón a sus receptores en la célula diana.

### 3.6. Valoración del glicerol en el medio de incubación de los adipocitos.

Como dato de la actividad biológica de los adipocitos de los tres grupos de ratas, hemos valorado glicerol como parámetro clave del índice de lipólisis que se encuentra disminuída en la circunstancia de adrenalectomía (20). Los resultados están reseñados en la Tabla I.

TABLA I.

<u>Adiciones</u>	<u>Controles (S)</u>	<u>Tratadas (T)</u>	<u>Adrenalectomizadas (A)</u>
Basal	18,4 ± 3,7	25 ± 5	16,5 ± 3,2
Basal + Norepinefrina	84,5 ± 17	115 ± 23	78,9 ± 15

Contenido de glicerol en el medio de incubación de adipocitos aislados del tejido epididimal de la rata en distintas condiciones fisiológicas. Los valores vienen reflejados en  $\text{nmol}/10^5$  células/h de incubación y son una media de 4 experimentos por triplicado.

Como puede observarse, la concentración tanto basal de glicerol como la estimulada por norepinefrina, es algo menor en el medio de incubación de adipocitos procedentes de ratas adrenalectomizadas (A), que en controles (S), sin llegar a ser la diferencia estadísticamente significativa, seguramente, por el número de casos. Sin embargo, hay un claro incremento estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ), tanto de la lipólisis basal como de la estimulada por norepinefrina tras el tratamiento con glucocorticoides. No sólo porque llegue a valores controles sino por que los supera; desarrollando la fuerte acción lipolítica de estos esteroides.

#### 4. DISCUSION

=====

Los datos aquí presentados indican que los adipocitos de ratas adrenalectomizadas presentan un incremento en la unión de la insulina y una disminución en la unión del glucagón a sus receptores respectivos en relación a controles. Esta variación está en su capacidad pero no en su afinidad.

A su vez, el tratamiento de sustitución con glucocorticoides a la rata adrenalectomizada, causa un aumento en la unión del glucagón a sus receptores en relación a ratas adrenalectomizadas sin llegar a valores controles. Y paralelamente una disminución de la unión de la insulina a sus receptores en relación a ratas adrenalectomizadas sin llegar asimismo a valores controles.

Por lo que se refiere a la insulina, estos resultados están en contraste a los reportados por Olefsky y cols (8), quienes sin aportar datos numéricos describen la no existencia de cambio en los receptores de ratas adrenalectomizadas.

Por otro lado, el grupo de Kahn y cols (7), encuentran indirecta evidencia de una posible influencia de la adrenalectomía en la unión de la insulina

a sus receptores, ya que la disminución de unión inducida por el transplante de un tumor que segrega ACTH, GH y prolactina en ratas, puede ser revertida por la adrenalectomía.

Más recientemente Kahn y cols (10), han descrito un incremento en la unión de la insulina a sus receptores en membranas hepáticas de ratas adrenalectomizadas relacionándolo sólo a un incremento en la afinidad. Una comparación directa de nuestros datos de unión con aquellos reportados por estos últimos investigadores es difícil de realizar, dado que hemos utilizado unas concentraciones trazadoras distintas y con nuestras concentraciones no hemos podido detectar en la afinidad, pero quizá no haya que excluir esa posibilidad.

La "up-regulation" del receptor de insulina, puede ser explicada a través de la disminución de los niveles de insulina producidos por la adrenalectomía. La disminución de los niveles de insulina después de la adrenalectomía ha sido descrita por nosotros (4), y puede ser explicado al menos en parte por la respuesta reducida a la glucosa de la célula beta de las ratas adrenalectomizadas (21) y de hecho la relación inversa entre los niveles de insulina y la unión de su receptor ha sido bien mostrada y no sólo en hiperinsulinemia (22 rev.), sino también en estados de hipoinsulinemia (23-30).

El tratamiento con cortisona a los animales adrenalectomizados previene el fallo de la insulina en suero y el incremento en unión de la insulina a sus receptores.

La posibilidad de una acción directa de los glucocorticoides sobre el receptor de insulina no la descartamos, pero nos faltan datos y en esa línea estamos actualmente investigando. Hasta ahora sabemos por nuestros previos estudios de infusión intravenosa de 100 mg de prednisolona durante 4 horas en el hombre (2), o la adición de prednisolona ( $5 \times 10^{-5}$  M) durante 3 horas

al medio de incubación de islotes pancreáticos aislados de ratones (3), que no resulta afectada la secreción de insulina. Y que además, por los estudios de Olefsky la dexametasona ( $8 \times 10^{-8}$  M) directamente in vitro no ejerce ninguna influencia en la unión de la insulina a sus receptores en adipocitos, mientras que el tratamiento in vivo con cortisol da lugar a una disminución de la unión de la insulina a sus receptores (6,7). Sin embargo, muy recientemente Cigolini y cols (31), demuestran un efecto directo in vitro del cortisol sobre la unión de la insulina a sus receptores en células grasas. Por tanto, una posibilidad de efecto directo es aceptable aunque esto estuviera en contraposición con uno de los principios básicos del estudio de receptores que dice que los receptores son específicos para una hormona dada y sólo son regulados por ella.

Por lo que se refiere al glucagón, nuestros resultados están en contradicción indirecta con el único dato de Goldfine y cols (6), los cuales no detectan cambios en la unión del glucagón a sus receptores tras la ya citada implantación de un tumor que segrega ACTH, GH y prolactina. Esta contradicción creemos puede deberse, a las no muy buenas condiciones de trabajo de estos investigadores en esos años, tanto en las condiciones de incubación como en las condiciones del glucagón marcado, además de la no adición de ninguna sustancia antidegradante.

La "down-regulation" del receptor de glucagón aquí descrita, podría ser explicada a través de la elevación de los niveles de glucagón producidos por la adrenalectomía. Esta elevación ha sido previamente reportada por nosotros (4) y puede ser explicada al menos en parte como un mecanismo compensador que favoreciera la producción endógena de glucosa. La relación inversa entre los niveles de glucagón en sangre y la unión a su receptor en la célula diana ha sido ya demostrada en otros estados que cursan también con hiper-glucagonemia (32-35).

El tratamiento con cortisona a los animales adrenalectomizados produce un aumento en la unión del glucagón a sus receptores sin llegar a valores con-

troles, posiblemente a través de una disminución de los valores de glucagón en suero.

Como en el caso de la insulina, la posibilidad de una acción directa de los glucocorticoides sobre el receptor de glucagón no la descartamos y estamos trabajando en ella. Pero ni la infusión intravenosa de prednisolona en el hombre (2), ni la adición de prednisolona al medio de incubación de islotes pancreáticos aislados de ratones (3), modifica la secreción de glucagón, como ya vimos, tampoco modificaba la secreción de insulina y no existen datos en la literatura de un efecto directo in vitro de los glucocorticoides sobre la unión del glucagón a sus receptores en la célula diana.

De los datos de glicerol, parece deducirse que los adipocitos procedentes de ratas adrenalectomizadas segregan menos glicerol que los controles, tanto en basal como tras el estímulo de la norepinefrina. Es conocido que los adipocitos de ratas adrenalectomizadas son menos sensitivos al efecto de las catecolaminas (20). Células grasas de ratas tratadas tienen no sólo restaurada la respuesta normal a la epinefrina sino que además está estimulada.

De los datos de degradación, no hemos detectado diferencias en relación a la insulina en la degradación de esta hormona o de su receptor en las circunstancias estudiadas ni tampoco hemos detectado diferencias en la degradación del glucagón pero sí en la degradación de su receptor.

Estas diferencias en la degradación del receptor de glucagón deben tener algún significado o ser la vía o una de las vías de actuación de los glucocorticoides sobre la unión del glucagón a sus receptores. Así, la menor unión del glucagón a sus receptores en ratas adrenalectomizadas podría estar soportada por una mayor degradación del receptor de glucagón, lo cual estaría de acuerdo con la idea de que los receptores que están ocupados por hormona parecen ser más resistentes a la degradación (36).

En suma, utilizando el concepto de "receptores de reserva" (37), la adrenalectomía podría hacer disminuir la unión del glucagón a sus receptores para llegar a un óptimo de unión glucagón-receptor y así a un óptimo efecto biológico, fundamentalmente quizá, a nivel de incrementar la gluconeogénesis para mantener un adecuado nivel de glucosa en sangre y así actuar menos sobre la lipólisis ya que las reservas de grasas corporales están disminuídas.

Paralelamente, la adrenalectomía aumentaría la unión de la insulina a sus receptores sin influenciar el máximo efecto biológico, pero sí dando lugar a un incremento de la sensibilidad a esta hormona por el adipocito, aumentando así la acción de la insulina como agente antilipolítico e incrementando también la tasa de transporte de glucosa al interior de la célula.

Creemos que nuestros datos pueden ampliar el conocimiento de la acción biológica de los glucocorticoides como agentes diabetógenos, y quizá contribuir a un mejor entendimiento de las observaciones clínicas tanto de insuficiencia adrenal como de hiperfunción cortical en el hombre.

Este trabajo ha sido presentado en parte en el 16<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, de 1980, Atenas, Grecia. Y en el V Congreso de la Sociedad Española de Diabetes, de 1980, Sevilla, España.

## 5. BIBLIOGRAFIA

=====

1. Perley, M., Kipnis, D.M.:  
Effect of glucocorticoids on plasma insulin.  
N. Engl. J. Med. 274: 1237, 1966.
2. Marco, J., Calle, D., Roman, D., Diaz-Fierros, M., Villanueva, M.L.,  
Valverde, I.:  
Hyperglucagonism induced by glucocorticoid treatment in man.  
N. Engl. J. Med. 288: 128, 1973.
3. Marco, J., Calle, C., Hedo, J.A., Villanueva, M.L.:  
Enhanced glucagon secretion by pancreatic islets from prednisolone  
treated mice.  
Diabetologia 12: 307, 1976.
4. Calle, C.:  
Influencia de los glucocorticoides sobre la secreción del páncreas en-  
docrino.  
Tesis doctoral, Universidad Complutense. 1976.
5. Vann Bennett, G., Cuatrecasas, P.:  
Insulin receptor of fat cells in insulin-resistant metabolic states.  
Science 176: 805, 1972.
6. Goldfine, I.D., Kahn, C.R., Neville, Jr. D.M., Roth, J., Garrison, M.M.,  
Bates, R.W.:  
Decreased binding of insulin to its receptors in rats with hormone in-  
duced insulin resistance.  
Biochem. Biophys. Res. Commun 53: 852, 1973.

7. Kahn, C.R., Goldfine, I.D., Neville, Jr. D.M., Roth, J., Bates, R.W., Garrison, M.M.:  
Insulin receptor defect: a major factor in the insulin resistance of glucocorticoid excess.  
Endocrinology 93: 168, 1973 (Abstract).
8. Olefsky, J.M., Johnson, J., Liu, F., Jeu, P., Reaven, G.M.:  
The effects of acute and chronic dexamethasone administration on insulin binding to isolated rat hepatocytes and adipocytes.  
Metabolism 24: 517, 1975.
9. Olefsky, J.M.:  
Effect of dexamethasone on insulin binding, glucose transport, and glucose oxidation of isolated rat adipocytes.  
J. Clin. Invest. 56: 1499, 1975.
10. Kahn, C.R., Goldfine, I.D., Neville, Jr. D.M., De Meyts, P.:  
Alterations in insulin binding induced by changes in vivo in the levels of glucocorticoids and growth hormone.  
Endocrinology 103: 1054, 1978.
11. Haering, H., Calle, C., Bug, A., Renner, R., Hepp, K.D., Kemmler, W.:  
Insulin binding and insulin action in rat fat cells after adrenalectomy  
Diabetologia 19: 379, 1980.
12. Lascano-González, J.M.:  
Las suprarrenales accesorias de la rata blanca.  
Rev. Soc. Argent. Biol. 10: 28, 1934.
13. Rodbell, M.:  
Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis.  
J. Biol. Chem. 235: 375, 1964.

14. Krebs, H.A., Henseleit, K.:  
Untersuchungen ueber die Harnstoffbildung in Tierkoerper.  
Hoppe-Seyler' s Z. physiol. Chemie 210: 33, 1932.
15. Nottey, J.J., Rosselin, G.:  
Monoiodoglucagon: Preparation isolement, identification, contrôle  
radio-immunologique.  
C.R. Acad. S. Ci. París, 273: 2118, 1971.
16. Gliemann, J., Østerlind, K., Vinten, J., Gammeltoft, S.:  
A procedure for measurement of distribution spaces in isolated fat  
cells.  
Bioch. Biophy. Acta 286: 1, 1972.
17. Lambert, M., Neish, A.C.:  
Rapid method for estimation of glicerol in fermentation solution.  
Can. J. Reser. 28: 83, 1950.
18. Korn, E.D.:  
Clearing factor, a heparin-activated lipoprotein lipase.  
Isolation and charecterization of the enzyme from normal rat heart.  
J. Biol. Chem 215: 1, 1955.
19. Sonne, O., Gliemann, J.:  
Receptor binding of glucagon and adenosine 3'5'-monophosphate accumula-  
tion in isolated rat fat cells.  
Biochim, Biophy, Acta 449: 259, 1977.
20. Exton, J.H., Friedmann, N., Wong, E.H., Brineaux, J.P., Corbin, J.D.,  
Park, C.R.:  
Interaction of glucocorticoids with glucagon and epinephrine in the  
control of gluconeogenesis and glycogenolysis in liver and of lipolysis  
in adipose tissue  
J. Biol. Chem. 247: 3579, 1972.

21. 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, 1967.
22. Kahn, C.R., Roth, J.:  
Insulin receptors in diseased states. En: Hormone-receptor interaction; molecular aspects. 1976.  
Levey G.S. (ed). Marcel Dekker Inc., Ney York Basel, p:1-29.
23. Hepp, K.D., Langley, J., Funcke, H.J. v., Renner, R., Kemmler, W.:  
Increased insulin binding capacity of liver membranes from diabetic Chinese hamsters.  
Nature 258: 154, 1975.
24. Olefsky, J.M.:  
Effects of fasting on insulin binding, glucose transport and glucose oxidation in isolated rat adipocytes: relationship between insulin receptors and insulin action.  
J. Clin. Invest. 58: 1450, 1976.
25. Kasuga, M., Akamuna Y., Iwamoto, Y., Kosaka, K.:  
Effects of fasting and refeeding on insulin receptors and glucose metabolism in rat adipocytes.  
Endocrinology 100: 1384, 1977.
26. Kasuga, M., Akamuna, Y., Iwamoto, Y., Kosaka, K.:  
Insulin binding and glucose metabolism in adipocytes of streptozotocin-diabetic rats.  
Am. J. Physiol. 235: 175, 1978.

27. Wieringa, T., Krans, H.M.:  
Reduced glucose transport and increased binding of insulin in adipocytes from diabetic and fasted rats.  
Biochim. Biophys. Acta 538: 563, 1978.
28. Davidson, M.B., Kaplan, S.A.:  
Increased insulin binding by hepatic plasma membranes from diabetic rats. Normalization by insulin therapy.  
J. Clin. Invest. 59: 22, 1978.
29. Schoenle, E., Zapf, J., Froesch, E.R.:  
Effects of insulin and NSILA on adipocytes of normal and diabetic rats: Receptor binding, glucose transport and glucose metabolism.  
Diabetologia 13: 243, 1977.
30. Kahn, C.R.:  
Insulin resistance, Insulin insensitivity and insulin unresponsiveness: A necessary distinction.  
Metabolism 27: 1893, 1978.
31. Cigolini, M., Bosello, O., Scuro, L.A., Smith, U.:  
Interrelations between glucocorticoid hormones and insulin: The influence of cortisol on insulin binding to human fat cells in vitro.  
Diabetologia 14: 224, 1978 (Abstract).
32. Livingston, J.N., Cuatrecasas, P., Lockwood, D.H.:  
Studies of glucagon resistance in large rat adipocytes:  
I<sup>125</sup>-labeled glucagon binding and lipolytic capacity.  
J. Lip. Res. 15: 26, 1974.
33. Fouchereau-Peron, M., Rançon, F., Freychet, P., Rosselin, G.:  
Effect of feeding and fasting on the early steps of glucagon action in isolated rat liver cells.  
Endocrinology 98: 755, 1976.

34. Blazquez, E., Rubalcava, B., Montesano, R., Orci, L., Unger, R.H.:  
Development of insulin and glucagon binding and the adenylate cyclase response in liver membranes of the prenatal postnatal and adult rat: Evidence of glucagon "resistance".  
Endocrinology 98: 1014, 1976.
35. Soman, V., Felig, P.:  
Regulation of the glucagon receptor by physiological hyperglucagonaemia.  
Nature 272: 830, 1978.
36. Czech, M.P., Fain, J.N.:  
Insulin protection against fat cell receptor inactivation by trypsin.  
Endocrinology 87: 191, 1970.
37. Freychet, P.:  
Interactions of polipeptides hormones with cell membrane specific receptors: Studies with insulin and glucagon.  
Diabetologia 12: 83, 1976.

## 6. RESUMEN

=====

Los glucocorticoides son conocidos agentes diabéticos que modulan tanto la secreción de insulina como la de glucagón. Para comprobar si los cambios en el nivel de glucocorticoides podrían afectar al grado de unión tanto de la insulina como del glucagón a sus receptores específicos, hemos estudiado este problema en adipocitos procedentes de ratas adrenalectomizadas (A), controles a las cuales se les había simulado la operación (S), y adrenalectomizadas con tratamiento de sustitución con cortisona (T).

Nuestros resultados muestran una reducción del 55% en el número de receptores para glucagón y una elevación del 46% en el número de receptores para insulina en adipocitos de ratas (A), en relación a (S), sin ningún cambio significativo en su afinidad.

El tratamiento de sustitución con cortisona en las ratas (T), produce un aumento en la unión de los receptores para glucagón y a su vez una disminución en la unión de los receptores para insulina en estos animales en relación a (A), acercándose a valores de (S).

No hay diferencias en la degradación ni de la insulina ni del glucagón por los adipocitos de los tres tipos de ratas. Tampoco hay diferencias en la degradación del receptor de insulina, pero sí en el de glucagón (20% en S), (34% en A) y (0% en T).

En conclusión, los niveles de corticoides parecen modular la población de los receptores para insulina y glucagón en el adipocito, como, asimismo, la degradación del receptor de glucagón. Esta modulación podría ser mediada a través de la alteración de los niveles de glucagón e insulina circulantes o bien deberse a una acción directa de estos esteroides.



## FUNDACION JUAN MARCH

### SERIE UNIVERSITARIA

#### TITULOS PUBLICADOS

#### Serie Verde

(Matemáticas, Física, Química, Biología, Medicina)

- 2 Mulet, A.:  
**Estudio del control y regulación, mediante un calculador numérico, de una operación de rectificación discontinua.**
- 4 Santiuste, J. M.:  
**Combustión de compuestos oxigenados.**
- 5 Vicent López, J. L.:  
**Películas ferromagnéticas a baja temperatura.**
- 7 Salvá Lacombe, J. A.:  
**Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental.**
- 8 Plá Carrera, J.:  
**Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos.**
- 11 Drake Moyano, J. M.:  
**Simulación electrónica del aparato vestibular.**
- 19 Purroy Unanua, A.:  
**Estudios sobre la hormona Natriurética.**
- 20 Serrano Molina, J. S.:  
**Análisis de acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-adrenérgicos.**
- 22 Pascual Acosta, A.:  
**Algunos tópicos sobre teoría de la información.**
- 25 I Semana de Biología:  
**Neurobiología.**
- 26 I Semana de Biología:  
**Genética.**
- 27 I Semana de Biología:  
**Genética.**
- 28 Zugastl Arbizu, V.:  
**Analizador diferencial digital para control en tiempo real.**
- 29 Alonso, J. A.:  
**Transferencia de carga en aleaciones binarias.**
- 30 Sebastián Franco, J. L.:  
**Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas.**
- 39 Blasco Olcina, J. L.:  
**Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos.**
- 44 Sánchez Rodríguez, L.:  
**Estudio de mutantes de saccharomyces cerevisiae.**
- 45 Acha Catalina, J. I.:  
**Sistema automático para la exploración del campo visual.**
- 47 García-Sancho Martín, F. J.:  
**Uso del ácido salicílico para la medida del pH intracelular.**
- 48 García García, A.:  
**Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina.**
- 49 Trillas, E., y Alsina C.:  
**Introducción a los espacios métricos generalizados.**
- 50 Pando Ramos, E.:  
**Síntesis de antibióticos aminoglicosídicos modificados.**
- 51 Orozco, F., y López-Fanjul, C.:  
**Utilización óptima de las diferencias genéticas entre razas en la mejora.**

- 52 Gallego Fernández, A.:  
**Adaptación visual.**
- 55 Castellet Solanas, M.:  
**Una contribución al estudio de las teorías de cohomología generalizadas.**
- 56 Sánchez Lazo, P.:  
**Fructosa 1,6 Bisfosfatasa de hígado de conejo: modificación por proteasas lisosomales.**
- 57 Carrasco Llamas, L.:  
**Estudios sobre la expresión genética de virus animales.**
- 59 Afonso Rodríguez, C. N.:  
**Efectos magneto-ópticos de simetría par en metales ferromagnéticos.**
- 63 Vidal Costa, F.:  
**A la escucha de los sonidos cerca de  $T_\lambda$  en el 4<sup>to</sup> líquido.**
- 65 Andréu Morales, J. M.:  
**Una proteína asociada a membrana y sus subunidades.**
- 66 Blázquez Fernández, E.:  
**Desarrollo ontogénico de los receptores de membrana para Insulina y glucagón.**
- 69 Vallejo Vicente, M.:  
**Razas vacunas autóctonas en vías de extinción.**
- 76 Martín Pérez, R. C.:  
**Estudio de la susceptibilidad magnetoelectrica en el  $Cr_2O_3$  policristalino.**
- 80 Guerra Suárez, M.ª D.:  
**Reacción de Amidas con compuestos organoaluminicos.**
- 82 Lamas de León, L.:  
**Mecanismo de las reacciones de iodación y acoplamiento en el tiroides.**
- 84 Repollés Mollner, J.:  
**Nitrosación de aminas secundarias como factor de carcinogénesis ambiental.**
- 86 II Semana de Biología:  
**Flora y fauna acuáticas.**
- 87 II Semana de Biología:  
**Botánica.**
- 88 II Semana de Biología:  
**Zoología.**
- 89 II Semana de Biología:  
**Zoología.**
- 91 Viéitez Martín, J. M.:  
**Ecología comparada de dos playas de las Rías de Pontevedra y Vigo.**
- 92 Cortijo Mérida, M., y García Blanco, F.:  
**Estudios estructurales de la glucógeno fosforilasa b.**
- 93 Aguilar Benítez de Lugo, E.:  
**Regulación de la secreción de LH y prolactina en cuadros anovulatorios experimentales.**
- 95 Bueno de las Heras, J. L.:  
**Empleo de polielectrolitos para la floculación de suspensiones de partículas de carbón.**
- 96 Núñez Alvarez, C., y Ballester Pérez, A.:  
**Lixiviación del cinabrio mediante el empleo de agentes complejantes.**
- 101 Fernández de Heredia, C.:  
**Regulación de la expresión genética a nivel de transcripción durante la diferenciación de Artemia salina.**
- 103 Guix Pericas, M.:  
**Estudio morfométrico, óptico y ultraestructural de los inmunocitos en la enfermedad celíaca.**
- 105 Llobera i Sande, M.:  
**Gluconeogénesis «in vivo» en ratas sometidas a distintos estados tiroideos.**
- 106 Usón Finkenzeller, J. M.:  
**Estudio clásico de las correcciones radiactivas en el átomo de hidrógeno.**
- 107 Gallán Jiménez, R.:  
**Teoría de la dimensión.**
- 111 Obregón Perea, J. M.:  
**Detección precoz del hipotiroidismo congénito.**

- 115 Cacicedo Egües, L.:  
**Mecanismos moleculares de acción de hormonas tiroideas sobre la regulación de la hormona tirotrópica.**
- 121 Rodríguez García, R.:  
**Caracterización de lisozimas de diferentes especies.**
- 122 Carravedo Fantova, M.:  
**Introducción a las Orquídeas Españolas.**
- 125 Martínez-Almoyna Rullán, C.:  
**Contribución al estudio de la Manometría Ano-rectal en niños normales y con alteraciones de la continencia anal.**
- 127 Marro, J.:  
**Dinámica de transiciones de fase: Teoría y simulación numérica de la evolución temporal de aleaciones metálicas enfriadas rápidamente.**
- 129 Gracia García, M.:  
**Estudio de cerámicas de interés arqueológico por espectroscopia Mössbauer.**
- 131 García Sevilla, J. A.:  
**Receptores opiáceos, endorfinas y regulación de la síntesis de monoaminas en el sistema nervioso central.**
- 132 Rodríguez de Bodas, A.:  
**Aplicación de la espectroscopia de RPE al estudio conformacional del ribosoma y el tRNA.**
- 136 Aragón Reyes, J. J.:  
**Interacción del Ciclo de los Purín Nucleótidos con el Ciclo del Acido Cítrico en Músculo Esquelético de Rata durante el Ejercicio.**
- 139 Genís Gálvez, J. M.:  
**Estudio citológico de la retina del camaleón.**
- 140 Segura Cámara, P. M.:  
**Las sales de tiazolio ancladas a soporte polimérico insoluble como catalizadores en química orgánica.**
- 141 Vicent López, J. L.:  
**Efectos anómalos de transporte eléctrico en conductores a baja temperatura.**
- 143 Nieto Vesperinas, M.:  
**Técnicas de prolongación analítica en el problema de reconstrucción del objeto en óptica.**
- 145 Arias Pérez, J.:  
**Encefalopatía portosistémica experimental.**
- 147 Palanca Soler, A.:  
**Aspectos Faunísticos y Ecológicos de Carábidos Altoaragoneses.**
- 150 Vioque Cubero, B.:  
**Estudio de procesos bioquímicos implicados en la abscisión de la acituna.**
- 151 González López, J.:  
**La verdadera morfología y fisiología de Azotobacter: células germinales.**



