

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 (Castello, 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.

Estos trabajos 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.

Este trabajo ha sido realizado con una Beca de España, 1976, individual. Departamento de Medicina, Farmacia y Veterinaria. Centro de trabajo: Instituto Gregorio Marañón del C. S. I. C. (Madrid).

Fundación Juan March



FJM-Uni 66-B1a
Desarrollo ontogénico de los rec
Blázquez Fernández, Enrique.
1031623



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

Desarrollo ontogénico de los receptores de membrana para insulina y glucagón

Enrique Blázquez Fernández

FJM
Uni-
66
B1a

66

Desarrollo ontogénico de los receptores de membrana para insulina y glucagón/Enrique Blázquez Fernández

Fundación Juan March
Serie Universitaria



66

Desarrollo ontogénico de los receptores de membrana para insulina y glucagón

Enrique Blázquez Fernández



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

Fundación Juan March (Madrid)

*La Fundación Juan March no se solidariza
necesariamente con las opiniones de los
autores cuyas obras publica.*

Depósito Legal: M-25612-1978
I.S.B.N. 84-7075-095-X
Ibérica, Tarragona, 34.-Madrid-7.

INDICE

	Página
1. INTRODUCCION	1
2. MATERIALES Y METODOS	4
2.1. Animales	4
2.2. Determinación de las concentraciones de glucagón (IRG) e insulina (IRI) inmunorreactivas en el suero de fetos y ratas lactantes	5
2.3. Purificación de las membranas hepáticas	6
2.4. Unión de Insulina-I ¹²⁵ , Glucagón-I ¹²⁵ y HGH-I ¹²⁵ a membranas hepáticas	7
2.5. Valoración de las actividades de la adenilato ciclasa en membranas hepáticas de fetos, ratas lactantes y adultas	8
2.6. Determinaciones de 5' nucleotidasa y proteínas	9
2.7. Aislamiento de hepatocitos a partir de hígados pertenecientes a fetos, ratas lactantes y adultas	9
3. RESULTADOS	11
3.1. Concentraciones en suero de glucagón (IRG) e insulina (IRI) inmunorreactivas en fetos y ratas lactantes	11
3.2. Estudio comparativo de la unión de glucagón-I ¹²⁵ e insulina-I ¹²⁵ a membranas hepáticas de fetos, ratas lactantes y adultas	13
3.3. Número de receptores y afinidad de las hormonas pancreáticas por sus receptores en membranas hepáticas de fetos, ratas lactantes y adultas	15
3.4. Efecto de diferentes concentraciones de glucagón sobre la actividad de la adenilato ciclasa presente en membranas hepáticas de fetos, ratas lactantes y adultas	19

3.5. Unión de glucagón- I^{125} e insulina- I^{125} a hepatocitos aislados o células de Küpffer, hematopoyéticas y circulantes de fetos, ratas lactantes y adultas	19
3.6. Unión de HGH- I^{125} a membranas hepáticas de fetos, ratas lactantes y adultas	23
3.7. Degradación de HGH- I^{125} por las membranas hepáticas de fetos, ratas lactantes y adultas	28
4. DISCUSION	28
5. BIBLIOGRAFIA	36

1.- INTRODUCCION

Durante la segunda mitad del periodo de gestación, el feto es autónomo para la biosíntesis, secreción y acción biológica de las hormonas pancreáticas, insulina y glucagon. Esta autonomía es la consecuencia de la aparición coordinada y secuencial de una serie de mecanismos que favorecen la independencia endocrina del páncreas fetal y materno.

Tanto la insulina como el glucagon no pueden atravesar la barrera placentaria (1,2) por lo cual las concentraciones de ambas hormonas detectadas en tejidos y líquidos biológicos fetales se consideran de origen embrionario. El feto de rata es capaz de sintetizar ambas hormonas a partir del día 11 de vida intrauterina (3), las cuales son liberadas a la circulación periférica en una proporción superior a la encontrada en los adultos. Mientras que la insulina ha podido ser detectada en páncreas, plasma sanguíneo y líquido amniótico, el glucagon se encuentra ampliamente distribuido en diferentes tejidos y líquidos biológicos (4,5).

Aunque los mecanismos íntimos que regulan

la biosíntesis de insulina y glucagon alcanzan - su madurez a una edad temprana de la vida intrauterina, aquéllos relacionados con el proceso de secreción no se desarrollan completamente hasta después del nacimiento (6,7). Asimismo la sensibilidad de los tejidos fetales a las hormonas - pancreáticas difiere sensiblemente de los efectos que ellas poseen sobre los tejidos de los - animales adultos. Así la célula miocárdica es - muy sensible a la insulina a partir del día 14 de gestación de la rata (8), el músculo diafragmático después del nacimiento (9), el hígado en los últimos días de gestación (10) y la grasa - marrón (11) en el último día de vida intrauterina. En cuanto al glucagon existe una "resistencia" del hígado y corazón que desaparece con la edad (12,13). Este diferente comportamiento de los - tejidos fetales puede estar relacionado con la - aparición de los receptores para insulina y glucagon en sus órganos dianas en distintos momentos del desarrollo de la rata, lo cual facilitaría la viabilidad del feto y la modulación de - los procesos metabólicos durante el período perinatal. De esta forma la insulina que es secre-

-tada por el páncreas fetal en grandes cantidades durante los últimos días de gestación, favorecería los procesos anabólicos tales como síntesis de proteínas, glucógeno y lípidos si poseyera una población suficiente de receptores en los órganos dianas. Estos efectos de la insulina podrían ser aún más relevantes dado que la hormona de crecimiento carece de actividad biológica en los tejidos embrionarios (14). Por otra parte el glucagon que es una hormona catabólica por excelencia, inhibe los procesos anabólicos tales como la síntesis hepática de DNA y proteínas y la deposición de glucógeno en este órgano, y a pesar de ello esta hormona circula en el feto en concentraciones superiores a los del animal adulto. Esta aparente paradoja entre las acciones biológicas de ambas hormonas pancreáticas podría ser explicada si los receptores para glucagon estuvieran ausentes o en una pequeña proporción durante la vida fetal y se desarrollaran después del nacimiento, lo cual evitaría los efectos antagónicos de estas hormonas durante la edad fetal y estimularía la movilización de los depósitos de lípidos y glucógeno inmediatamente después del nacimiento, cuando el feto pierde -

sus conexiones con la madre y entra en una fase de "ayuno fisiológico". Todo esto sería potenciado significativamente si después del nacimiento se produjese una hipersecreción de glucagon y una disminución hasta niveles basales de las concentraciones circulantes de insulina. Con objeto de verificar esta hipótesis hemos estudiado el desarrollo ontogénico de los receptores para insulina y glucagon en el hígado de rata, y los resultados obtenidos han sido correlacionados con las actividades biológicas de ambas hormonas durante los periodos de vida intra y extrauterina. Asimismo hemos estudiado las modificaciones que los receptores hepáticos para prolactina experimentan durante el desarrollo de la rata, dado el poder estimulante que esta hormona posee sobre el crecimiento de los roedores.

2.- MATERIALES Y METODOS

2.1.- Animales.

Ratas hembras de la raza Wistar con un peso de 200-250 gr., fueron mantenidas en jaulas metabólicas con machos de la misma raza. Los

animales fueron alimentados con una dieta equilibrada en los distintos principios inmediatos -- (Condor S.A.) y agua ad libitum, bajo situaciones constantes de temperatura, presión y ciclos de luz-obscuridad. Como día 1 de la gestación se -- consideró aquél en que fueron encontrados espermatozoides en el exudado vaginal. Dado que las ratas copulan durante la noche y la ovulación -- ocurre a las 2 de la mañana (15), la duración de la gestación fue estimada con un posible error -- de 6-12 horas.

2.2.- Determinación de las concentraciones de glucagón (IRG) e insulina (IRI) inmuno-reactivas en el suero de fetos y ratas lactantes.

Las muestras de sangre fueron recogidas en tubos previamente conservados a 4°C, y que contenían ~~un~~ ^{un} heparin (500 U.I. por ml de sangre recogida). Las células sanguíneas fueron separadas del suero mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C, y las determinaciones de insulina y glucagón fueron realizadas en el suero de fetos y ratas lactantes, mediante la --

aplicación de técnicas radioinmunológicas (16,17)

2.3.- Purificación de las membranas hepáticas.

Las membranas hepáticas utilizadas para la identificación de los receptores para insulina y glucagon fueron aisladas según el proceder experimental de Neville (18), a excepción del medio usado para la homogenización del tejido hepático. En nuestros experimentos utilizamos sacarosa 0,25 M en vez de bicarbonato sódico 1 mM, lo cual evita según Oliver y col. (19) la ruptura de las células hematopoyéticas durante la homogenización y por tanto la obtención de membranas a partir de este tipo de células.

Las membranas hepáticas utilizadas para la detección de los receptores para prolactina fueron aisladas por otro proceder experimental, ya que con el método de Neville los receptores para prolactina se pierden durante el proceso de purificación. Aquél proceder consiste en la homogenización del hígado en Tris-sacarosa al 10%, pH 7,5 y posterior centrifugación a baja velocidad (4000 rpm). El sobrenadante obtenido se somete a ultracentrifugación durante 45m a

100.000 g; el nuevo sedimento se lava varias veces en Krebs Ringer fosfato, pH 7,5 y se conserva en nitrogeno líquido hasta el momento en que vayan a ser utilizadas las membranas.

2.4.- Unión de Insulina-I¹²⁵, Glucagon-I¹²⁵ y HGH-I¹²⁵ a membranas hepáticas.

Mono-I¹²⁵ insulina y glucagon fueron obtenidas según los procederes de Freychet y col (20) y Nottey y Rosselin (21), respectivamente.

Para el estudio de los receptores para prolactina se utilizó la hormona de crecimiento humana marcada con I¹²⁵ (HGH-I¹²⁵), ya que esta hormona en membranas hepáticas de rata reconoce los receptores lactogénicos mientras que la hormona de crecimiento bovina en hepatocitos de rata reconoce los receptores somatogénicos.- La HGH-I¹²⁵ fué purificada en columna de Sephadex G-75 y la actividad específica obtenida fue de 100 μ Ci/ μ gr..

La unión de las hormonas a las membranas hepáticas (100-200 μ g proteínas/ml) se realizó en 20 mM Tris-ClH, pH 7,6 o Krebs Ringer - fosfato, pH 7,5 más albúmina al 1%.

Los tiempos y temperaturas de incuba-

-ción fueron dependientes del tipo de estudios realizados y de ello daremos amplia información en la sección dedicada a la exposición de los resultados. Mono-I¹²⁵ insulina y glucagon fueron añadidas al medio de incubación en una concentración de 2×10^{-9} M o 3×10^{-11} M, mientras que la HGH-I¹²⁵ se usó en una concentración de 0,5 mg/ml. Finalizado el período de incubación la hormona ligada a las membranas hepáticas fue separada de la libre mediante filtración de acuerdo con el proceder de Rubalcava y Rodbell (22).

2.5.- Valoración de las actividades de la adenilato ciclasa en membranas hepáticas de fetos, ratas lactantes y adultas.

La actividad de la adenilato ciclasa fue medida según el método de Solomon y col. (23) en 0,1 ml de una mezcla de incubación que contenía 5 mM Cl_2Mg , 1 mM EDTA, 3,2 mM ($\alpha\text{-P}^{32}$) ATP, creatín quinasa (1mg/ml), 25 mM creatina fosfato, 20 mM Tris-ClH, pH 7,6 y 30-50 μg de proteínas de membranas. Las incubaciones se realizaron a -30°C durante 10 minutos. La formación de 3',5' - AMP cíclico en respuesta a diferentes concentra-

-ciones de glucagon fue medida gracias a la purificación de este nucleótido en columnas de amberlita y alúmina.

2.6.- Determinaciones de 5' nucleotidasa y protef- nas.

Con objeto de obtener un índice de -- pureza de los distintos tipos de membranas hepáticas obtenidas, la actividad de la 5' nucleotidasa fue determinada en los distintos pasos de purificación según el proceder de Avruch y Wallach (24).

El contenido de proteínas en las membranas hepáticas fue valorado por el método de Lowry y col. (25).

2.7.- Aislamiento de hepatocitos a partir de hí- gados pertenecientes a fetos, ratas lac- tantes y adultas.

El aislamiento de hepatocitos fue realizado gracias a la acción digestiva de la colagenasa. En los grupos de ratas lactantes y adultas, los animales fueron anestesiados con éter y el hígado perfundido con tampón Hanks con ob-

-jeto de limpiar el órgano de las células presentes en la circulación sanguínea. Posteriormente se perfundió con tampón Hanks y colagenasa (0,5 mg/ml). El medio de perfusión fue inyectado a través de la vena porta y liberado por la vena cava inferior. Finalizado el período de perfusión el hígado fué troceado e incubado con tampón Hanks (sin colagenasa) a 37°C durante 8 minutos, y las células recogidas por sedimentación después de ser centrifugadas a baja velocidad. El aislamiento de hepatocitos pertenecientes a fetos fue realizado por la acción directa de colagenasa (2 mg/ml del medio de incubación) sobre pequeños trozos de hígado incubados durante 8 minutos a 37°C. La separación de los hepatocitos de las células no parequimatosas fue efectuada mediante centrifugación diferencial dado el mayor tamaño de aquéllas células en relación a las células circulantes, hematopoyéticas y de Küpffer.

La unión de insulina-I¹²⁵ y glucagon-I¹²⁵ (2×10^{-9} M) a los hepatocitos pertenecientes a los distintos grupos de animales se realizó con medio de cultivo 199 (Grand Island \odot) durante

30 minutos a 30°C. Finalizados los períodos de incubación las hormonas libres o ligadas a sus receptores fueron separadas de acuerdo con el proceder descrito para las membranas hepáticas. La unión inespecífica de ambas hormonas a los hepatocitos fue estudiada en experimentos en los que insulina y glucagon no radiactivos fueron añadidos en una concentración de 10^{-6} M.

Asimismo estas preparaciones de hepatocitos fueron utilizadas para estudiar el efecto del glucagon (25 µg/ml), sobre la producción de glucosa y la disminución de glucógeno presente en los hepatocitos.

3.- RESULTADOS

3.1.- Concentraciones en suero de glucagon (IRG) e insulina (IRI) inmunoreactivas en fetos y ratas lactantes.

Como puede observarse en la figura nº 1 las concentraciones de insulina circulante son muy elevadas en el feto durante los últimos días de gestación. Sin embargo después del nacimiento estos valores disminuyen significativamente hasta niveles basales, manteniéndose de esta forma

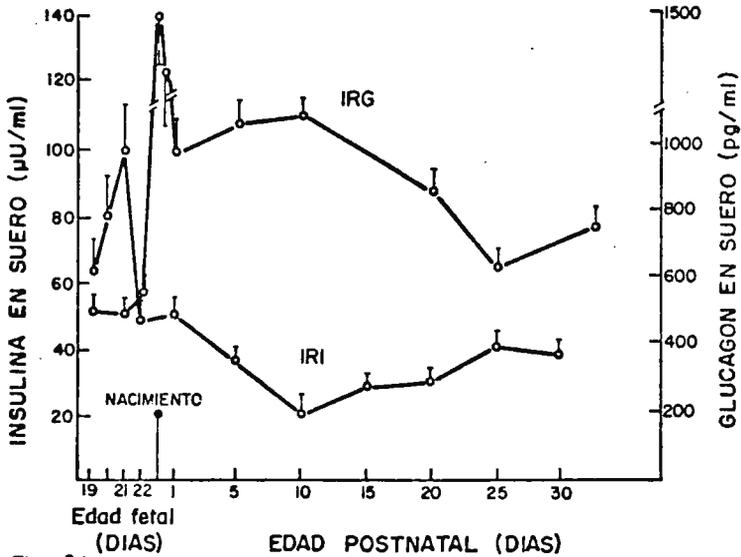


Fig. nº 1

Concentraciones en suero de glucagon (IRG) e insulina inmunoreactivas en fetos y ratas lactantes.

durante el período de lactancia. En contraposición con estos valores para insulina, las concentraciones de glucagon en suero aumentan inmediatamente después del nacimiento y permanecen elevadas durante el resto del período de lactación.

3.2.- Estudio Comparativo de la unión de glucagon- I^{125} e insulina- I^{125} a membranas hepáticas de fetos, ratas lactantes y adultas.

En relación a los animales adultos la unión de glucagon- I^{125} a las membranas hepáticas de fetos de 15 días fue sólo de 1% (fig. nº 2), del 23% en fetos de 21 días, y aún en el día 30 de vida extrauterina los valores detectados fueron significativamente inferiores. En contraste con estos resultados la unión de insulina- I^{125} a las membranas hepáticas de fetos de 15 días, fue de un 11% y del 45% en fetos de 21 días, alcanzando los valores del animal adulto el día 20 de vida extrauterina (fig. nº2).

Todas las membranas hepáticas utilizadas en estos experimentos y en los que comentaremos posteriormente poseían unos índices de pu-

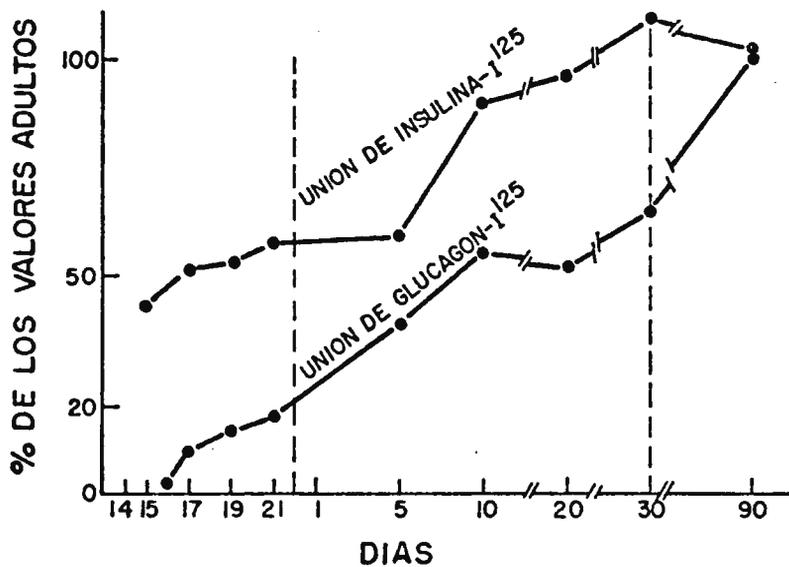


Fig. nº 2

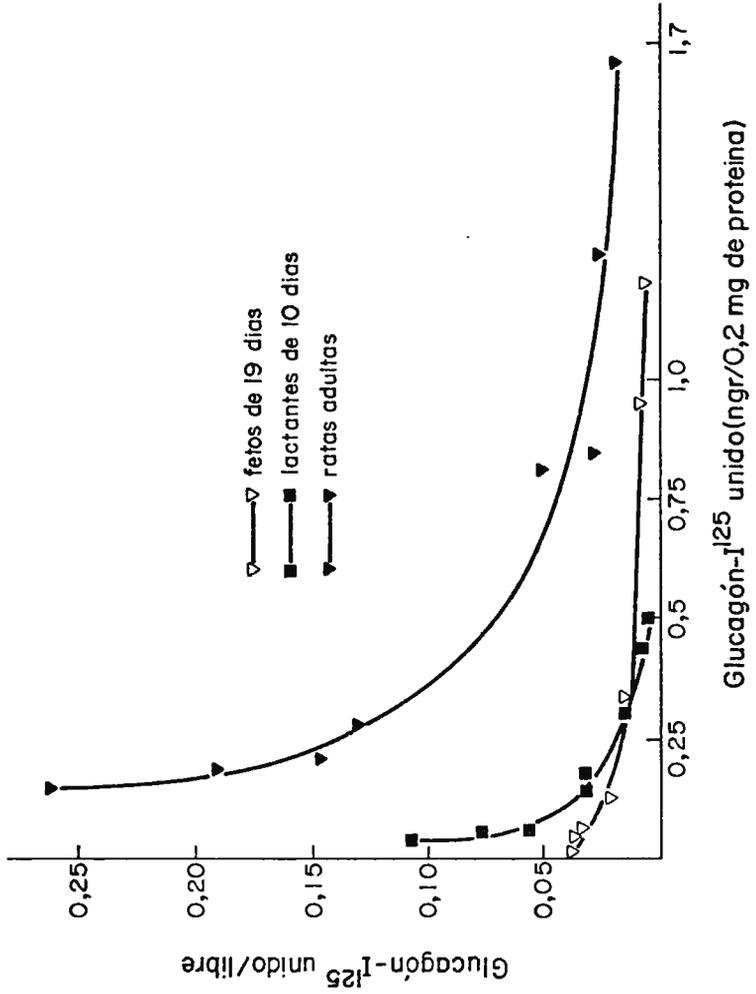
Estudio comparativo de la unión de glucagon- I^{125} e insulina- I^{125} a membranas hepáticas de fetos, ratas lactantes y adultas.

-reza semejantes. Estos índices se verificaron a través del estudio de la actividad de la 5' nucleotidasa y la unión de glucagon- I^{125} e insulina- I^{125} a las preparaciones obtenidas durante los distintos pasos del proceso de purificación de las membranas hepáticas.

3.3.- Número de receptores y afinidad de las hormonas pancreáticas por sus receptores en membranas hepáticas de fetos, ratas lactantes y adultas.

La menor unión de las hormonas pancreáticas a las membranas hepáticas de los animales más jóvenes pudiera ser la expresión de un menor número de receptores, una disminuida afinidad de la hormona por el receptor, diferentes constantes de asociación y disociación o a una mayor degradación de la hormona y/o el receptor durante los períodos de incubación. Con objeto de elucidar cual o cuales de estos factores era responsable de los resultados obtenidos anteriormente, las interacciones hormona-receptor fueron estudiadas bajo distintos criterios. Como puede observarse en la fig. nº 3, cuando el co-

Fig. nº 3.- Afinidad de mono- I^{125} glucagón a sus receptores en membranas hepáticas de fetos, lactantes y ratas adultas

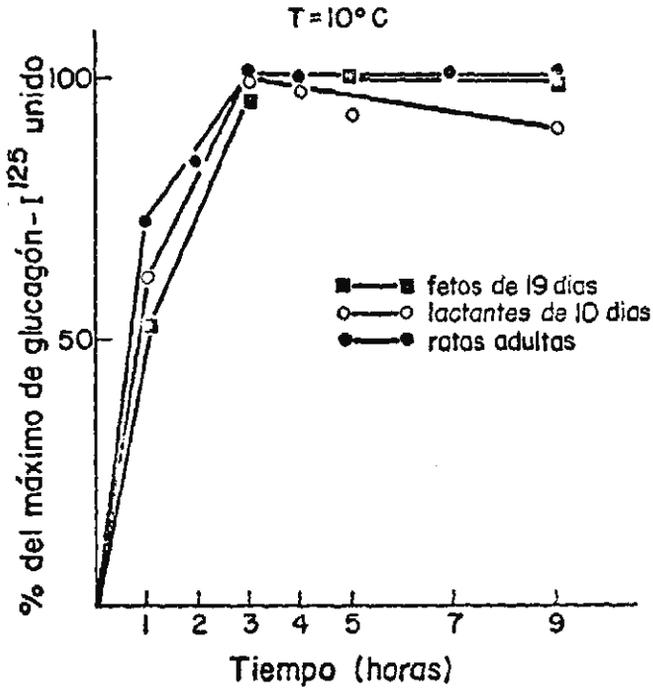


-ciente glucagon I^{125} /libre se comparó con las concentraciones de glucagon unido, observamos - diferencias notables entre los grupos control de fetos y ratas lactantes de 10 días. Las curvas obtenidas reflejaron una afinidad semejante del glucagon por su receptor, pero un menor número de receptores en los animales más jóvenes. De una forma similar se observó una menor población de receptores hepáticos para insulina en las ratas más jóvenes, aunque el receptor para esta hormona aparece antes y alcanza el número de los animales adultos a los 20 días de vida - extrauterina.

Por otra parte asociación y disociación de insulina y glucagon a sus receptores fue semejante en fetos, ratas lactantes y adultas. En la figura nº 4 podemos observar que en función del tiempo de incubación (1hr. a 9hr.) la asociación de mono- I^{125} glucagon a sus receptores fue semejante tanto durante la vida intrauterina como en la extrauterina. No se detectaron diferencias significativas en la degradación de Insulina- I^{125} y glucagon- I^{125} ó de sus receptores durante los períodos de incubación a los que -

Fig. nº 4

Curvas de asociación de mono- I^{125} glucagón a sus receptores en membranas de fetos, lactantes y ratas adultas



fueron sometidas las membranas fetales, de ratas lactantes y adultas.

3.4.- Efecto de diferentes concentraciones de glucagon sobre la actividad de la adenilato ciclasa presente en membranas hepáticas de fetos, ratas lactantes y adultas.

En la figura nº 5 se presentan las actividades de la adenilato ciclasa hepática en condiciones basales o tras la estimulación con glucagon (10^{-9} M a 10^{-6} M). Los resultados obtenidos indican que la respuesta de la enzima al glucagon durante la vida fetal y el primer mes de vida extrauterina es marcadamente inferior a la observada en el animal adulto. Estos datos se correlacionan fidelignamente con la menor unión de glucagon a las membranas hepáticas de los animales más jóvenes, lo cual puede ser interpretado como consecuencia del menor número de receptores en hígado para esta hormona durante las primeras etapas del desarrollo.

3.5.- Unión de glucagon- I^{125} e insulina- I^{125} a hepatocitos aislados o células de Küpffer, hematopoyéticas y circulantes de fetos -

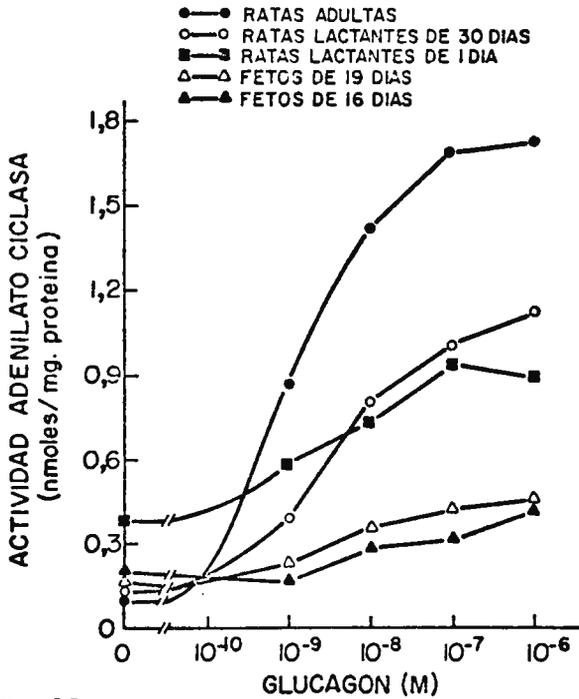


Fig.nº5

Efecto de diferentes concentraciones de glucagon sobre la actividad de la adenilato ciclasa presente en membranas hepáticas de fetos, ratas lactantes y adultas.

ratas lactantes y adultas.

Con objeto de excluir la posibilidad de que la menor unión de glucagon e insulina a las membranas hepáticas de los animales más jóvenes fuese debido a la inclusión de membranas procedentes de células hematopoyéticas o de la circulación sanguínea y no a cambios originados en las membranas de los hepatocitos, estos fueron aislados por la acción digestiva de la colagenasa y enriquecidos por centrifugación diferencial.

De acuerdo con lo ilustrado en la figura nº 6, las preparaciones de hepatocitos (con un índice de pureza del 90%-95% en relación a otras células no parequimatosas) pertenecientes a hígados de ratas durante distintos momentos -- del desarrollo, unen ambas hormonas pancreáticas de una forma semejante a lo observado con las membranas hepáticas, a excepción hecha de la elevada unión de insulina durante los primeros días de vida extrauterina. Esta última observación -- podría estar relacionado con el mecanismo de retroalimentación descrito recientemente en animales adultos entre niveles circulantes de insulina y glucagon y el número de sus receptores en

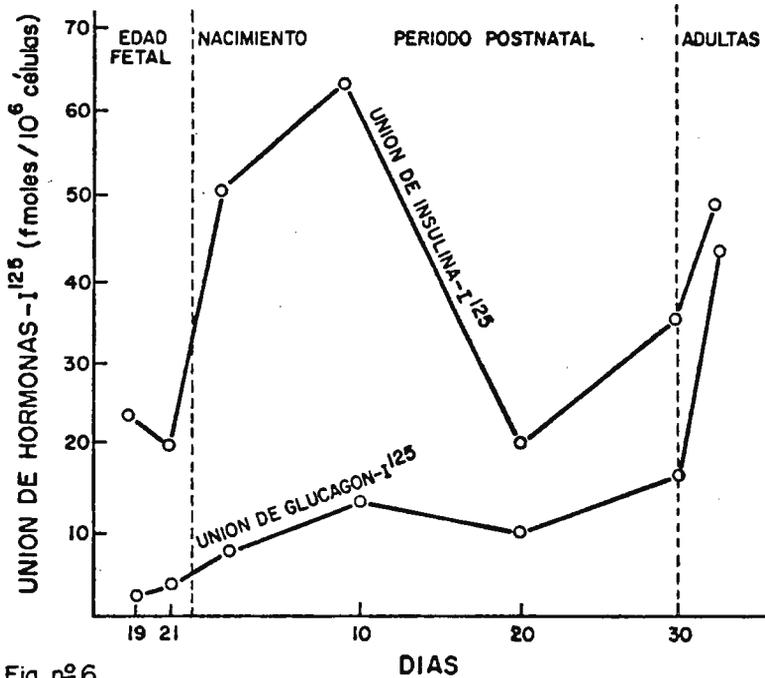


Fig. nº6

Unión de glucagon- I^{125} e insulina- I^{125} a hepatocitos de fetos, ratas lactantes y adultas.

los organos diana (26,27); lo cual explicaría la relación inversa observada entre concentraciones séricas y población de receptores hepáticos para ambas hormonas pancreáticas durante las primeras etapas de la vida extrauterina.

En comparación con los resultados obtenidos con los hepatocitos aislados, la unión de insulina- I^{125} y glucagon- I^{125} a las células no parenquimatosas fue mínima (fig. nº7), y aun este pequeño acoplamiento entre hormonas y receptores pudo estar relacionada con los hepatocitos contaminantes presentes en estas preparaciones celulares.

3.6.- Unión de HGH- I^{125} a membranas hepáticas de fetos, ratas lactantes y adultas.-

En colaboración con los Drs. S. Durán y J. Gómez Nieto estudiamos el desarrollo ontogénico de los receptores hepáticos para prolactina. Para ello y en una primera etapa las membranas hepáticas pertenecientes a distintos grupos de animales fueron incubados con HGH- I^{125} (0,5 ng/ml) en Krebs Ringer fosfato, pH 7,5 y

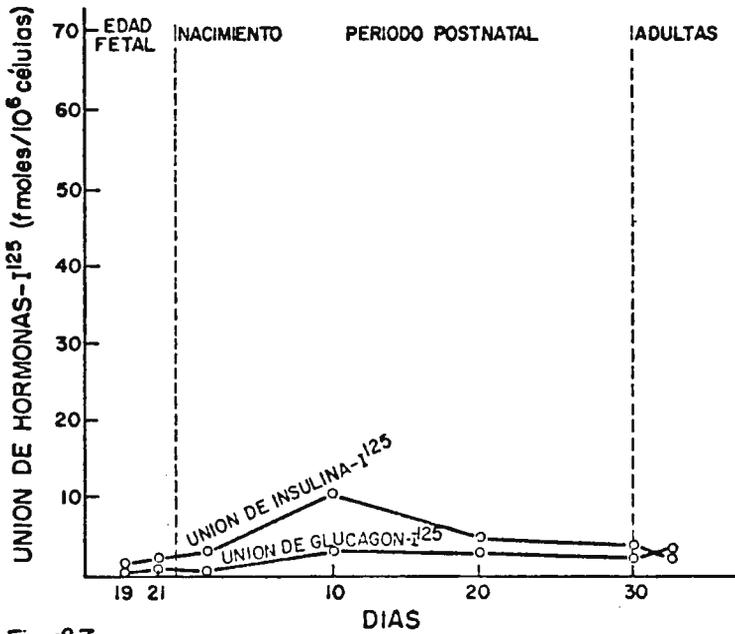


Fig. nº 7

Unión de glucagon- ^{125}I e insulina- ^{125}I a células hepáticas no parenquimatosas de fetos, ratas lactantes y adultas.

albúmina bovina (1%) a 20°C.

De acuerdo con los datos presentados en la tabla nº1, la unión de la hormona marcada a las membranas hepáticas de todos los grupos se incrementó considerablemente con la prolongación del tiempo de incubación, alcanzándose los valores máximos a las 3 horas. En membranas de fetos de 17 días no pudo detectarse unión de la hormona a su receptor, pero si en fetos de 19 días - (1,50% a las tres horas de incubación) y aun más en fetos de 21 días y ratas de 10 y 30 días de vida extrauterina. Sin embargo los valores obtenidos en este último grupo de ratas fueron significativamente inferiores a lo determinado en las membranas de ratas adultas (4,50% frente a 21,50% de hormona unida respectivamente).

Con objeto de investigar si la disminuida unión de la hormona a las membranas hepáticas de los animales más jóvenes era reflejo de una menor dotación de receptores, estas membranas fueron incubadas a 20°C durante 3 horas con cantidades crecientes de HGH (desde 0,5 ng/ml a 100 ng/ml), confirmandose que en relación a los animales adultos las membranas hepáticas de fe-

Tabla Nº 1.- Unión de HGH-I¹²⁵ (0,5 ng/ml) a membranas hepáticas de fetos, ratas lactantes y adultas.

<u>Membranas hepáticas</u> <u>de</u>	<u>Porcentaje de HGH-I¹²⁵ unida</u> <u>en función de los tiempos -</u> <u>de incubación (%/mg. pro--</u> <u>teina)</u>				
	<u>15'</u>	<u>30'</u>	<u>60'</u>	<u>120'</u>	<u>180'</u>
<u>Fetos 19 días</u>	0,20	0,60	--	0,80	1,50
<u>Fetos 21 días</u>	0,86	1,40	2,00	3,00	5,30
<u>Ratas de 10 días</u> <u>vida extrauterina</u>	1,50	2,00	2,15	3,89	5,15
<u>Ratas de 30 días</u> <u>vida extrauterina</u>	1,60	2,44	2,50	3,50	4,50
<u>Ratas adultas</u>	2,70	5,40	8,80	13,50	21,50

Tabla Nº 2.- Degradación de HGH-I¹²⁵ por las -
membranas hepáticas de fetos, ratas lac-
tantes y adultas.

<u>Membranas</u> <u>hepáticas de</u>	<u>Porcentaje de HGH-I¹²⁵ degra-</u> <u>dada en función de los tiem-</u> <u>por de incubación. (%/mg --</u> <u>proteína)</u>		
	<u>1 hora</u>	<u>2 horas</u>	<u>3 horas</u>
Fetos de 21 días	15	20	19
Ratas lactantes de 10 días	20	20	25
Ratas adultas	19	25	30

-tos y ratas lactantes poseían un menor número de receptores para prolactina.

3.7.- Degradación de HGH-I¹²⁵ por las membranas hepáticas de fetos, ratas lactantes y -- adultas.

Por otra parte la degradación de HGH-I¹²⁵ por las membranas hepáticas de fetos de 21 días, y ratas lactantes fue menor (tabla nº 2) que en las membranas de los animales adultos, lo cual aún refuerza más los resultados comentados en el apartado anterior.

4.- DISCUSION

Aunque la insulina y el glucagon han sido detectados en el páncreas fetal de rata el día 11 de gestación (3) y en la circulación sanguínea de fetos de 19 días (4), los mecanismos implicados en los procesos de secreción y acción biológica de ambas hormonas difieren sensiblemente de lo observado en el animal adulto.

Durante la vida adulta, la insulina y el glucagon regulan la disponibilidad de los nutrientes en función de los principios inmediatos

ingeridos con la dieta y los requerimientos -- energéticos del individuo, y como consecuencia de ello el metabolismo cambia rápidamente de un modo anabólico a otro catabólico. Ambas hormonas pancreáticas inducen efectos diametralmente opuestos sobre el metabolismo hepático. Mientras que el glucagon estimula la producción de glucosa por una activación de la glicogenolisis y neoglucogénesis, la insulina se opone a estos efectos favoreciendo el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno. Asimismo el glucagon estimula la ruptura de los triglicéridos, - la producción de cuerpos cetónicos y el catabolismo proteico y en contraposición la insulina posee efectos opuestos. Estas acciones antagónicas de los productos hormonales liberados por las células B y A₂ de los islotes pancreáticos, indujeron a pensar que la insulina y el glucagon constituyen una unidad bihormonal que regula el almacenamiento y disponibilidad de los - nutrientes en relación a las necesidades del individuo (28). La validez de este concepto ha - sido verificada positivamente en un gran número

de situaciones fisiopatológicas, tales como -- ayuno, ejercicio, dietéticas, stress y diabetes (29).

Sin embargo la acción coordinada de estas dos hormonas pancreáticas posee características diferenciales durante los distintos - estados metabólicos implicados en el desarrollo de la rata, los cuales pueden ser mejor com-- prendidos con las evidencias experimentales que presentamos en este trabajo. Al menos tres grupos de factores, tales como el diferente aporte nutritivo, la aparición secuencial de los receptores para insulina y glucagon y las modificaciones en la secreción de estas hormonas pancreáticas, condicionan o regulan el metabolismo durante la vida intra y extrauterina.

Durante la gestación el metabolismo - de la madre se modifica sensiblemente con objeto de suministrar suficientes nutrientes para las necesidades anabólicas del feto. Esta diferencia entre los metabolismos fetal y materno - es posible gracias al hecho de que la insulina y el glucagon no pueden atravesar la barrera placentaria, lo cual contribuye a la aparición de

dos sistemas endocrinos independientes. Por otra parte la glucosa materna es transferida a los tejidos fetales constituyendo su principal fuente de energía. En relación con esto, las enzimas necesarias para el metabolismo de las hexosas aparecen a una edad temprana del período embrionario (30), la lipogénesis es activa (31) y a partir del día 17 de gestación los depósitos de glucógeno aumentan considerablemente (32). Esta situación metabólica se modifica dramáticamente después del parto, cuando el recién nacido se ve privado de la nutrición transplacentaria y está expuesto a los riesgos de la hipoglucemia neonatal. En contraste con el feto, el recién nacido utiliza poca glucosa (33,34), ya que la leche de rata (35) es pobre en hidratos de carbono (3% del aporte calórico) y rica en lípidos (69% del aporte calórico). Este cambio dietético se refleja en una disminución del cociente respiratorio de 1 a 0,7 y en un incremento de los niveles circulantes de glicerol, ácidos grasos libres y cuerpos cetónicos (36,37,38) y por una disminución en las actividades de las enzimas relacionadas con la

glicolisis y lipogénesis (31,39). Un nuevo cambio en las actividades metabólicas, ocurre -- aproximadamente el día 20 de vida extrauterina, el cual se caracteriza por un incremento de los depósitos de glucógeno y de la actividad lipogénica (31,39). Esta nueva situación que se asemeja a la de la rata adulta, coincide con el cambio a una alimentación rica en hidratos de carbono y pobre en grasas.

Otros factores además de los dietéticos pueden controlar los cambios secuenciales entre un metabolismo basado fundamentalmente - en la glucosa a otro implicado con la utilización de grandes cantidades de lípidos. Entre - estos factores debemos considerar los niveles circulantes de insulina y glucagon, los cuales y de acuerdo con los resultados presentados en este trabajo, se modifican sensiblemente a lo - largo del desarrollo de la rata. La hipersecreción de insulina por el páncreas fetal durante los últimos días de gestación junto con la existencia de un número adecuado de receptores para esta hormona en los hepatocitos, favorece la - acumulación de glucógeno y la síntesis de DNA y

proteínas (40). Estos efectos de la insulina -- son potenciados por el reducido número de receptores para glucagon y consecuentemente por una menor actividad biológica de esta hormona, lo cual sitúa al feto en una situación ventajosa -- para la utilización de los nutrientes procedentes de la madre. Estos condicionamientos fijan el metabolismo del feto en una situación eminentemente anabólica que se modifica dramáticamente después del parto. En los recién nacidos y ratas lactantes, la acelerada liberación de glucagon a la circulación sanguínea y el aumento progresivo de los receptores para esta hormona favorecen la movilización de los nutrientes almacenados previamente en forma de glucógeno y lípidos, y la producción de glucosa a partir de aminoácidos (41,42). Después del período de lactancia, la adquisición por parte de la rata de una alimentación equilibrada en los distintos principios inmediatos y el establecimiento de un diferente modelo de secreción e incremento de la dotación de receptores para ambas hormonas pancreáticas hacen que el almacenamiento y utilización de los nutrientes se realicen de una

forma semejante a las del animal adulto.

La disminuída actividad de la adenilato ciclasa hepática ante la estimulación con -- glucagon en las ratas más jóvenes, parece ser una consecuencia del menor número de receptores para esta hormona y no a una inmadurez de la -- enzima, ya que ella puede ser más activa por los efectos de la adrenalina y fluoruro sódico durante el período fetal que en la vida adulta -- (43).

Por otra parte la resistencia a la -- acción del glucagon durante la edad fetal debe ser comparada con otras situaciones que cursan con hiposensibilidad a los efectos de esta hormona. En este orden de ideas, Livingston, Cuatrecasas y Lockwood (47) han descrito una disminución en el número de receptores para glucagon y una menor actividad lipolítica en los -- adipocitos de mayor tamaño de ratas adultas. En adición, Leffert y col. (45) han encontrado en ratas parcialmente hepatectomizadas un incremento del número de receptores hepáticos para insulina y una disminución de aquéllos para glucagon, lo cual coexiste con hiperglucagonemia e

hipoinsulinemia. Esta relación inversa entre población de receptores y niveles circulantes de las hormonas pancreáticas es igualmente observable durante el desarrollo de la rata y sugiere un delicado mecanismo de control entre los procesos de secreción y acción biológica de las -- hormonas pancreáticas.

Virtualmente todos los procesos anabólicos que ocurren en los tejidos de mamíferos -- necesitan la presencia de insulina, y esto es -- especialmente decisivo durante el período em-- brionario ya que ni la hormona de crecimiento ni la prolactina, que posee efectos anabólicos en los roedores, son activas durante las últimas -- etapas de la vida fetal. Aunque las concentra-- ciones de hormona de crecimiento en el suero -- sanguíneo de fetos son muy elevadas (46) y esta hormona no puede atravesar la barrera placentaria (47) su actividad biológica no es aparente hasta ya iniciada la vida extrauterina, lo cual indica una ausencia de receptores en los órganos diana. De la misma forma la prolactina, que en roedores tiene efectos semejantes a los de la -- hormona de crecimiento, tales como activación

de la ornitina decarboxilasa (48) estimulación de la secreción de somatomedina (49) y activación de la síntesis hepática de RNA (50), de acuerdo con nuestros resultados carece de actividad biológica durante el período perinatal.

Todas estas observaciones parecen resaltar la importancia de las hormonas pancreáticas en la regulación del metabolismo durante la edad perinatal y sugieren que la aparición secuencial de los receptores hepáticos para insulina y glucagon así como el desarrollo de los mecanismos implicados en la secreción de ambas hormonas son hechos fundamentales para la viabilidad del feto y su posterior desarrollo metabólico.

5.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Goodner, C.F. y Freinkel, N. Diabetes 10: 383, 1961.
- 2.- Girad, J.R., Kervran, A., Souffet, E. y Assan, R. Diabetes 23:310, 1974.

- 3.- Pic tet, R. y Rutter W.J. En Steiner, D.F. y Freinkel, N. (edits.), Endocrine Pan-- creas, American Physiological Society, - Washington 1972, pag. 25.
- 4.- Blázquez, E., Sugase, T., Blázquez, M. y Foà P. Acta Diabetologica Latina 9:13, - 1972.
- 5.- Blázquez, E., Montoya, E. y López Quijada, C. J. Endocrinology; 48:553, 1970.
- 6.- Blázquez, E., Lipshaw, L., Blázquez, M. y Foà, P. Pediatric Research 9:17, 1975.
- 7.- Milner, R., Leach, F. y Jack, P. In Carbo- hydrate Metabolism in Pregnancy and the - Newborn, pag. 83, 1974. Churchill Livig-- stone, Edinburgh.
- 8.- Clark, C.M. Amer. J. Physiology, 220: 583- 588, 1971.
- 9.- Clark, Ch. Diabetes, 22:41, 1973.
- 10.- Manns, J. y Brockman, R. Canad. J. Physio-

- logy Pharmacology, 47:917, 1969.
- 11.- Hahn, P., Pediatric Research, 5:126, 1971.
 - 12.- Vinicor, F., Higdon, G., Clark, J.F. y --
Clark, C.M. J. Clinical Investigation 58:
571-578, 1976.
 - 13.- Clark, C.M., Beatty, B. y Allen D.O. J.
Clinical Investigation 52:1018, 1973.
 - 14.- Jost, A., Cold Spring Harbor Symp. Quant.
Biol. 19:167, 1954.
 - 15.- Everett, J. En Sex and Internal Secretions
Young W.C. editor Baltimore 1961, Williams
y Wilkins, Vol. 1, pag. 497.
 - 16.- Hales, C.N. y Randle P.J. Biochem. J. 88:
137. 1963.
 - 17.- Shima, K. y Foà P. Clin. Chim. Acta, 22:
511, 1968.
 - 18.- Neville, D.M. Biochimica Biophysica Acta
154:540, 1968.

- 19.- Oliver, I.T., Blumer, W.F.C. y Witham, I.
J. Comp. Biochem. Physiology 10:33, 1963.
- 20.- Freychet, P., Roth, J., Neville, D.M. Bio-
chem. Biophys. Res. Commun. 43:400, 1971.
- 21.- Nottey, J.J. y Rosselin, G., C.R. Acad. --
Sci. Paris 273:2118, 1971.
- 22.- Rubalcava, B. y Rodbell, M., J. Biological
Chemistry 248:3831, 1973.
- 23.- Solomon, Y., Londos, C. y Rodbell, M. Ana-
lytical Biochemistry 58: 541, 1974.
- 24.- Avruch, J. y Wallach, D.F.H. Biochimica -
Biophys. Acta 233:334, 1971.
- 25.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L.
y Randall, R.J., J. Biological Chemistry
193:265, 1951.
- 26.- Gavin, J.R., Roth, J., Neville, D.M., De
Meyts, P. y Buell, D.N. Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S.A. 71:84, 1974.
- 27.- Santos, A. y Blázquez, E. Manuscrito en

- 28.- Unger, R.H. Metabolism 23:581, 1974.
- 29.- Unger, R.H. y Orci, L. Physiological Reviews, 56:778, 1976.
- 30.- Burch, H.B., Lowry, O.H., Kuhlman, A.M., Skerjaner, J., Diamant, E.J., Lowry, S.J. y Von Dippe, P. 238:2267, 1963.
- 31.- Taylor, C.B., Bailey, E. y Bartley, W. - Biochemical Journal 105:717, 1967.
- 32.- Stotsenburg, J.M. Anatomical Record 9:667 1915.
- 33.- Baird, J.D. y Farguhar, J.W. Lancet i, 71 1962.
- 34.- Walker, D.G. y Holland, G. Biochemical - Journal, 97:845, 1965.
- 35.- Dymsha, H.A., Czajka, D.M. y Miller, S.A. J. Nutrition 84:100, 1964.
- 36.- Cross, K.W., Tizard, J.P.M. y Trythall, D. A.H. Acta Paediat., Stockh, 46:265, 1957.

- 37.- Kaye, R. y Kumagai, M. Amer. J. Dis. Child
96: 527, 1958.
- 38.- Persson, B. y Gentz, J. Acta Paediat. --
Stockh, 55:353, 1966.
- 39.- Vernon, R.G. y Walker, D.G. Biochemical
Journal 106:321, 1968.
- 40.- Leffert, H.L., J. Cell Biology 62:792, --
1974.
- 41.- Ballard, F.J. En Diabetes, R.R. Rodriguez
y J. Vallance-owen eds. Excerpta Medica,
Amsterdam, pag. 592, 1970.
- 42.- Girard, J.R., Cuendet, G.S., Marliss, E.B.
Kervran, A., Rieutort, M. y Assan, R. J.
Clinical Investigation 52:3190, 1973.
- 43.- Wicks, J. J. Biological Chemistry 244:3941
1969.
- 44.- Livingston, J.N., Cuatrecasas, P. y Lock-
wood, D.H. J. Lipid Research 15:26, 1974.
- 45.- Leffert, H., Alexander, N.M. Faloona, G.,

Rubalcava, B. y Unger, R. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:4033, 1975.

46.- Blázquez, E., Simón, F.A. Blázquez, M. y Foà, P. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 147:--780, 1974.

47.- Gitlin, D., Kumate, J. y Morales, C. J. Clin. Endocrinol. Metab. 25:1599, 1965.

48.- Richards, J.F. Biochem. Biophys. Res. - Comm. 63: 292, 1975.

49.- Francis, M.J.O. y Hill, D.J. Nature 255: 167, 1975.

50.- Chen, H.W., Hamer, D.H., Heinniger, H.J. y Meier H. Biochim. Biophys. ACTA 287:90, 1972.



FUNDACION JUAN MARCH
SERIE UNIVERSITARIA

Títulos Publicados:

1. — *Semántica del lenguaje religioso.* / A. Fierro
(Teología. España, 1973)
2. — *Calculador en una operación de rectificación discontinua.* / A. Mulet
(Química. Extranjero, 1974)
3. — *Skarns en el batolito de Santa Olalla.* / F. Velasco
(Geología. España, 1974)
4. — *Combustión de compuestos oxigenados.* / J. M. Santiuste
(Química. España, 1974)
5. — *Películas ferromagnéticas a baja temperatura.* / José Luis Vicent López
(Física. España, 1974)
6. — *Flujo inestable de los polímeros fundidos.* / José Alemán Vega
(Ingeniería. Extranjero, 1975)
7. — *Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental.* /
José Antonio Salva Lacombe (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1973)
8. — *Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos.* / José Plá Carrera
(Matemáticas. España, 1974)
9. — *El fenómeno de inercia en la renovación de la estructura urbana.* /
Francisco Fernández-Longoria Pinazo (Urbanización del Plan Europa 2.000
a través de la Fundación Europea de la Cultura)
10. — *El teatro español en Francia (1935–1973).* / F. Torres Monreal
(Literatura y Filología. Extranjero, 1971)
11. — *Simulación electrónica del aparato vestibular.* / J. M. Drake Moyano
(Métodos Físicos aplicados a la Biología. España, 1974)
12. — *Estructura de los libros españoles de caballerías en el siglo XVI.* /
Federico Francisco Curto Herrero (Literatura y Filología. España, 1972)
13. — *Estudio geomorfológico del Macizo Central de Gredos.* /
M. Paloma Fernández García (Geología. España, 1975)
14. — *La obra gramatical de Abraham Ibn c Ezra.* / Carlos del Valle Rodríguez
(Literatura y Filología. Extranjero, 1970)

15. — *Evaluación de Proyectos de Inversión en una Empresa de producción y distribución de Energía Eléctrica.* / Felipe Ruíz López (Ingeniería. Extranjero, 1974)
16. — *El significado teórico de los términos descriptivos.* / Carlos Solís Santos (Filosofía. España, 1973)
17. — *Encaje de los modelos econométricos en el enfoque objetivos-instrumentos relativos de política económica.* / Gumersindo Ruíz Bravo (Economía. España, 1971)
18. — *La imaginación natural (estudios sobre la literatura fantástica norteamericana).* / Pedro García Montalvo (Literatura y Filología. Extranjero, 1974)
19. — *Estudios sobre la hormona Natriurética.* / Andrés Purroy Unanua (Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1973)
20. — *Análisis farmacológico de las acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-adrenérgicos.* / José Salvador Serrano Molina (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1970)
21. — *El hombre y el diseño industrial.* / Miguel Durán-Lóriga (Artes Plásticas. España, 1974)
22. — *Algunos tópicos sobre teoría de la información.* / Antonio Pascual Acosta (Matemáticas. España, 1975)
23. — *Un modelo simple estático. Aplicación a Santiago de Chile.* / Manuel Bastarache Alfaro (Arquitectura y Urbanismo. Extranjero, 1973)
24. — *Moderna teoría de control: método adaptativo-predictivo. Teoría y realizaciones.* / Juan Manuel Martín Sánchez (Ingeniería. España, 1973)
25. — *Neurobiología (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
26. — *Genética (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
27. — *Genética (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
28. — *Investigación y desarrollo de un analizador diferencial digital (A.D.D.) para control en tiempo real.* / Vicente Zugasti Arbizu (Física. España, 1975)
29. — *Transferencia de carga en aleaciones binarias.* / Julio A. Alonso (Física. Extranjero, 1975)
30. — *Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas.* / José Luis Sebastián Franco (Física. Extranjero, 1974)

- 31.— *Estudio de los transistores FET de microondas en puerta común.*/ Juan Zapata Ferrer. (Ingeniería. Extranjero, 1975).
- 32.— *Estudios sobre la moral de Epicuro y el Aristóteles esotérico.*/ Eduardo Acosta Méndez. (Filosofía. España, 1973).
- 33.— *Las Bauxitas Españolas como mena de aluminio.*/ Salvador Ordóñez Delgado. (Geología. España, 1975).
- 34.— *Los grupos profesionales en la prestación de trabajo: obreros y empleados.*/Federico Durán López. (Derecho. España, 1975).
- 35.— *Obtención de Series aneuploides (monosómicas y ditelosómicas) en variedades españolas de trigo común.*/Nicolás Jouve de la Barreda. (Ciencias Agrarias. España, 1975).
- 36.— *Efectos dinámicos aleatorios en túneles y obras subterráneas.*/ Enrique Alarcón Alvarez. (Ingeniería. España, 1975).
- 37.— *Lenguaje en periodismo escrito.*/Fernando Lázaro Carreter, Luis Michelena Elissalt, Robert Escarpit, Eugenio de Bustos. Víctor de la Serna, Emilio Alarcos Llorach y Juan Luis Cebrián. (Seminario organizado por la Fundación Juan March los días 30 y 31 de mayo de 1977).
- 38.— *Factores que influyen en el espigado de la remolacha azucarera, Beta vulgaris L.*/José Manuel Lasa Dolhagaray y Antonio Silván López. (Ciencias Agrarias. España, 1974).
- 39.— *Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos. Productos finitos de espacios con topologías proyectivas de funciones reales.*/José Luis Blasco Olcina. (Matemáticas. España, 1975).
- 40.— *Estructuras de la épica latina.*/M^a. del Dulce Nombre Estefanía Alvarez. (Literatura y Filología. España, 1971).
- 41.— *Comunicación por fibras ópticas.*/Francisco Sandoval Hernández. (Ingeniería. España, 1975).
- 42.— *Representación tridimensional de texturas en chapas metálicas del sistema cúbico.*/José Antonio Pero-Sanz Elorz. (Ingeniería. España, 1974).
- 43.— *Virus de insectos: multiplicación, aislamiento y bioensayo de Baculovirus.*/Cándido Santiago-Alvarez. (Ciencias Agrarias. Extranjero, 1976).
- 44.— *Estudio de mutantes de saccharomyces cerevisiae alterados en la biosíntesis de proteínas.*/Lucas Sánchez Rodríguez. (Biología. España, 1976).

45. — *Sistema automático para la exploración del campo visual.* José Ignacio Acha Catalina. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1975).
46. — *Propiedades físicas de las variedades de tomate para recolección mecánica.* Margarita Ruiz Altisent. (Ciencias Agrarias. España 1975).
47. — *El uso del ácido salicílico para la medida del pH intracelular en las células de Ehrlich y en escherichia coli.* Francisco Javier García-Sancho Martín. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1974).
48. — *Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina en la neurona adrenérgica periférica.* Antonio García García. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1975).
49. — *Introducción a los espacios métricos generalizados.* Enrique Trillas y Claudi Alsina. (Matemáticas. España, 1974).
50. — *Síntesis de antibióticos aminoglicosídicos modificados.* Enrique Pando Ramos. (Química. España, 1975).
51. — *Utilización óptima de las diferencias genéticas entre razas en la mejora.* Fernando Orozco y Carlos López-Fanjul. (Biología Genética. España, 1973).
52. — *Mecanismos neurales de adaptación visual a nivel de la capa plexiforme externa de la retina.* Antonio Gallego Fernández. (Biología Neurobiología. España, 1975).
53. — *Compendio de la salud humana de Johannes de Ketham.* M^a. Teresa Herrera Hernández. (Literatura y Filología. España, 1976).
54. — *Breve introducción a la historia del Señorío de Buitrago.* Rafael Flaquer Montequi. (Historia. España, 1975).
55. — *Una contribución al estudio de las teorías de cohomología generalizadas.* Manuel Castellet Solanas. (Matemáticas. Extranjero, 1974).
56. — *Fructosa 1,6 Bisfosfatasa de hígado de conejo: modificación por proteasas lisosomales.* Pedro Sánchez Lazo. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1975).
57. — *Estudios sobre la expresión genética de virus animales.* Luis Carrasco Llamas. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1975).
58. — *Crecimiento, eficacia biológica y variabilidad genética en poblaciones de dípteros.* Juan M. Serradilla Manrique. (Ciencias Agrarias. Extranjero, 1974).

59. – *Efectos magneto-ópticos de simetría par en metales ferromagnéticos.* / Carmen Nieves Afonso Rodríguez. (Física. España, 1975).
60. – *El sistema de Servet.* / Angel Alcalá Galve. (Filosofía. España, 1974).
61. – *Dos estudios sobre literatura portuguesa contemporánea.* / David Mourão-Ferreira y Vergilio Ferreira. (Literatura y Filología, 1977).
62. – *Sistemas intermedios.* / María Manzano Arjona. (Filosofía. España, 1975).
63. – *A la escucha de los sonidos cerca de T_λ en el ^4He líquido.* / Félix Vidal Costa. (Física. Extranjero, 1974).
64. – *Simulación cardiovascular mediante un computador híbrido.* / José Ramón Farré Muntaner. (Ingeniería. España, 1976).
65. – *Desnaturalización de una proteína asociada a membrana y caracterización molecular de sus subunidades.* / José Manuel Andreu Morales. (Biología, España, 1976).

