

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
Departamento de Biología

**CARACTERÍSTICAS DE ACCIÓN DE LAS EXENDINAS SOBRE EL TRANSPORTE Y  
METABOLISMO HEPÁTICO Y MUSCULAR DE LA GLUCOSA, EN ESTADO  
NORMAL Y DIABÉTICO TIPO 2**

Trabajo presentado por **Luis Arnés Pérez**,  
Licenciado en Biología, para optar al grado de  
Doctor.

Director: **Maria L. Villanueva-Peñacarrillo**

Ponente: **Inmaculada Canal Beltrán**



**MARIA LUISA VILLANUEVA-PEÑACARRILLO MOLINA**, Doctora en Ciencias Químicas, y Jefe Asociado y Directora del Dpto. de Metabolismo, Nutrición y Hormonas de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid,

**INFORMA:**

La razón de este trabajo, que Don Luis Arnés Pérez presenta para optar al grado de Doctor, ha sido el conocer la acción de la exendina 4 (Ex-4) –péptido de origen no mamífero, estructuralmente homólogo del GLP-1, y mimético de éste en algunas de sus acciones–, y la de su forma truncada, exendina 9 (Ex-9), en relación a la del GLP-1, sobre parámetros relacionados con el transporte y metabolismo de la glucosa en tejidos extrapancreáticos, y mecanismos celulares implicados, en la rata normal y en un modelo experimental de diabetes tipo 2. Además, mediante tratamiento prolongado, se ha estudiado también el posible efecto regulador de la Ex-4 sobre la expresión del glucotransportador mayoritario en el hígado y músculo y sobre el transporte de glucosa y otros parámetros relacionados con la homeostasis del azúcar, también en la rata normal y en la diabética tipo 2.

Las aportaciones originales del estudio se pueden resumir en lo siguiente:

1. La Ex-4 desplaza la unión específica máxima del GLP-1 a su receptor de membrana en el músculo esquelético de la rata, con un  $ID_{50}$  similar al del propio GLP-1, mientras que la Ex-9, que también compite, lo hace, sin embargo, a concentraciones cien veces superiores.
2. La Ex-4, pero no la Ex-9, estimula, como el GLP-1, el transporte de glucosa y otros parámetros del metabolismo de la hexosa, en el músculo esquelético de la rata normal; además, esta acción está mediada por un incremento de la actividad de distintas quinasas.
3. En el músculo de la rata diabética tipo 2, el transporte basal y oxidación de la glucosa es menor que en la rata normal; pero aunque la actividad glucógeno sintasa  $\alpha$  y glucólisis es mayor, excepto la insulina, ninguno de los tres péptidos modifican los niveles iniciales de estos parámetros estudiados.
4. La Ex-4, en tratamiento sostenido, no modifica el transporte de glucosa en el músculo esquelético de la rata normal, pero sí ejerce cierto control sobre la expresión del Glut-4 a nivel de la traducción. Además, si bien no modifica la acumulación hepática de glucógeno, sí estimula la transcripción y la traducción del Glut-2.



5. En la rata diabética, el tratamiento con Ex-4 no altera, aparentemente, la expresión, inicialmente normal, de Glut 4 en el músculo, pero sí provoca una estimulación clara tanto de la proteína como del ARNm del Glut-2, que se refleja en un también claro incremento del acúmulo de glucógeno hepático, inicialmente disminuido respecto al de la rata normal.

Los resultados del trabajo de Luis Arnés Pérez a lo largo de estos años, todos relacionados y en parte incluidos en este estudio, han dado lugar a 11 participaciones activas en congresos internacionales (*Diabetologia* 47, Supl. 1: A38 96 y A55 143, 2004; *Diabetologia* 48, Supl. 1: A65 167, 2005; *Diaetología* 49, Supl.1: A0665 404, A0666 404-5, A0667 405-6, 2006; *Diabetic Medicine* 23, Suppl. 4: P758 280, A109 50, 2006; *Diabetologia* 50, Suppl. 1: 0587 ps243, 0591 ps245, 0781 ps323, 2007), 8 en españoles (*Av. Diabetol.* 20, Supl. 1: 37-38, 2004; *Av. Diabetol.* 22, Supl. 1: 46 P 026, 67-68 P 084, 2006; *Reemo.* 16 (5): 103, 34, 103, 2007; *Diabetol.* 24 (Supl. 1): P006 46-47, P009 48, 2008) y, de momento, a 3 trabajos ya publicados (*Horm. Metab. Res.* 37:275-80, 2005; *Int. J. Mol. Med.* 17: 1133-7, 2005; *Int. J. Mol. Med.* 19: 961-6, 2006), 2 en prensa (*Int. J. Mol. Med.*, en prensa, 2008; *Metab. Func. Res. Diab.*, en prensa, 2008) y otro en evaluación.

Y para que conste, firma,

Madrid, 7 de abril de 2008

## AGRADECIMIENTOS

*A la Dra. María Luisa Villanueva-Peñacarrillo, no sólo por aceptarme en la familia de MNH y dirigir mi trabajo, sino también por haberme impulsado, con broncas y gritos, a seguir trabajando, cuando iba descubriendo que el desarrollo real del método científico estaba lejos del ideal que yo había imaginado de estudiante en la Universidad. Con tu ejemplo, he madurado, y no sólo científicamente.*

*A la Dra. Isabel Valverde, porque ha sido muy tranquilizante saber que ante cualquier duda se puede recurrir a toda su experiencia.*

*A la Fundación Conchita Rábago, por la concesión de una beca que ha permitido mi dedicación a este trabajo.*

*A Inmaculada Canal, porque siempre ha estado dispuesta a ayudar, y además, con una sonrisa. Sencillamente, perfecto.*

*Al personal del animalario, Juani, Luisa y Pilar, que con rigurosa puntualidad me han facilitado los auténticos protagonistas involuntarios de esta película.*

*A mis compañeros de trabajo, Bernar, Cancel's, Jimena, Lauren, Pablopoulos, Pao, Pilar, Sandra, que dejaron de ser "simplemente compañeros" para convertirse en amigos. Con vosotros estoy llenando "la mochila" de buenos recuerdos; aun queda hueco, ¿continuamos el camino...?. También a las que se fueron del laboratorio hace tiempo, las americanas Alicia, Nieves y Vero, de las que aprendí a dar los primeros pasos. A Estrella, Beni y María, porque creo que sin vosotras no encontraría nada en el laboratorio.*

*Y al resto de compañeros, Guada, amiga indiscutible por tiempo que pase; Ana, Dan y Helena, porque caminar por los pasillos del hospital sin encontraros habría sido un poco más aburrido y, además, por darme las llaves del papeleo burocrático, sin las que tendría "las narices hinchadas a portazos". Y a los chicos de la 4ª, por los partidos semanales, con los que he descubierto que mi tiempo como promesa del fútbol ya ha pasado.*

*A Eloy, Nico y Rubén, porque con vosotros he viajado por carretera, aire o delante de una copa en cualquier bar, lejos de la rutina diaria.*

*A María, Psicóloga particular que intenta a diario hacer de mí un poco mejor persona. Y a Leticia, por apoyarme e incluso hacerme creer que soy bueno en todo lo que hago.*

*A Juan y Cristina, por darme un segundo hogar y todo vuestro cariño; os quiero. A Borja, Gonzalo, Cristiniti, Guille y David, "los de siempre", todo un grado de amistad después de tantos años.*

*A mis padres, Luis e Inma, a mi Abuela, a mi Tata, a Manolo y a Jose Luis, por quererme. Y aunque no lo digo con frecuencia, yo también os quiero, y os necesito.*

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>PROPÓSITO</b> .....	<b>19</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
<b>1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN</b> .....	<b>20</b>
<b>2. MODELO DE DIABETES EXPERIMENTAL TIPO 2 (DT2)</b> .....	<b>20</b>
2.1. Coeficiente de utilización de la glucosa.....	<b>20</b>
<b>3. MATERIAL BIOLÓGICO</b> .....	<b>21</b>
<b>4. TRATAMIENTO CON EXENDINA-4</b> .....	<b>21</b>
<b>5. PÉPTIDOS E INHIBIDORES</b> .....	<b>22</b>
<b>6. ESTUDIO DE ENZIMAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR</b> .....	<b>23</b>
<b>7. PREPARACIÓN DE MEMBRANAS</b> .....	<b>24</b>
7.1. Músculo.....	<b>24</b>
7.2. Hígado .....	<b>25</b>
<b>8. ACTIVIDAD PI3K</b> .....	<b>26</b>
8.1. Inmunoprecipitación.....	<b>26</b>
8.2. Formación de PIP <sub>3</sub> .....	<b>27</b>
8.3. Extracción de lípidos.....	<b>28</b>
8.4. Separación de lípidos.....	<b>29</b>
<b>9. PKB, p70s6k y MAPKs: TOTAL Y FOSFORILADA</b> .....	<b>30</b>
9.1. Western blot .....	<b>30</b>
i) Separación de proteínas .....	<b>30</b>
ii) Transferencia .....	<b>32</b>
iii) Inmunodetección.....	<b>32</b>
<b>10. ESTUDIO DE UNIÓN AL MÚSCULO ESQUELÉTICO</b> .....	<b>34</b>
10.1. <sup>125</sup> I-GLP-1 .....	<b>34</b>
10.2. Protocolo de unión .....	<b>34</b>

<b>11. EXPRESIÓN DEL GLUCOTRANSPORTADOR.....</b>	<b>35</b>
<b>11.1. ARNm.....</b>	<b>35</b>
i) Aislamiento del ARN .....	35
ii) Síntesis de ADNc .....	36
iii) Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.....	37
<b>11.2. Proteína.....</b>	<b>38</b>
<b>12. TRANSPORTE DE GLUCOSA.....</b>	<b>38</b>
<b>13. OXIDACIÓN Y UTILIZACIÓN DE GLUCOSA .....</b>	<b>40</b>
13.1. Producción de CO <sub>2</sub> .....	41
13.2. Medida de piruvato .....	42
<b>14. MEDIDA DE CONTENIDO EN GLUCÓGENO .....</b>	<b>43</b>
<b>15. MEDIDA DE INSULINA PLASMÁTICA.....</b>	<b>43</b>
<b>16. ACTIVIDAD GLUCÓGENO SINTASA <i>a</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>17. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
1. EFECTOS DE LAS EXENDINAS SOBRE EL TRANSPORTE DE GLUCOSA, EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LA RATA NORMAL.....	46
2. EFECTOS DE LAS EXENDINAS SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR .....	46
3. SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR EN EL EFECTO DE LA EXENDINA-4 SOBRE EL TRANSPORTE DE GLUCOSA, EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LA RATA NORMAL .....	49
4. CARACTERÍSTICAS DE ACCIÓN DE LA EXENDINA-4, RESPECTO A LAS DEL GLP-1, EN EL MÚSCULO DE LA RATA NORMAL: <i>estudio de unión a membrana</i> .....	51
5. EFECTO DE LA EXENDINA-4 SOBRE EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA, EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LA RATA NORMAL.....	51
6. ACCIÓN DE LAS EXENDINAS, RESPECTO A LA DEL GLP-1, SOBRE EL TRANSPORTE Y METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LA RATA DIABÉTICA TIPO 2 .....	53

7. EFECTO DE LAS EXENDINAS, RESPECTO AL DEL GLP-1, SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR, EN EL MUSCULO ESQUELÉTICO DE LA RATA DIABÉTICA TIPO 2 .....	55
8. CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DE LA RATA NORMAL Y DIABÉTICA TIPO 2, TRAS TRATAMIENTO CON EXENDINA-4 .....	58
9. EFECTO DEL TRATAMIENTO PROLONGADO CON EXENDINA-4 SOBRE EL TRANSPORTE DE GLUCOSA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LA RATA NORMAL Y DIABÉTICA TIPO 2 .....	59
10. EFECTO DEL TRATAMIENTO PROLONGADO CON EXENDINA-4 SOBRE LA EXPRESIÓN DE GLUT-4, EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LA RATA NORMAL Y DIABÉTICA TIPO 2.....	59
11. EFECTO DEL TRATAMIENTO PROLONGADO CON EXENDINA-4 SOBRE LA EXPRESIÓN DE GLUT-2, EN EL HÍGADO DE LA RATA NORMAL Y DIABÉTICA TIPO 2 .....	61
12. EFECTO DEL TRATAMIENTO PROLONGADO CON EXENDINA-4 SOBRE LA ACUMULACIÓN DE GLUCÓGENO HEPÁTICO, EN LA RATA NORMAL Y DIABÉTICA TIPO 2 .....	61
DISCUSIÓN .....	65
CONCLUSIONES .....	74
BIBLIOGRAFÍA .....	76
ABREVIATURAS.....	92

# INTRODUCCIÓN

Los cambios ocurridos en los seres vivos a lo largo de la evolución, que han dado lugar a *complejos* organismos pluricelulares desde formas *sencillas* –unicelulares–, han ido acompañados del desarrollo de una intrincada red de comunicación celular, de tal manera que siempre mantuvieran asegurados los procesos vitales de nutrición, crecimiento, evolución y reproducción.

Posiblemente, en un hipotético hábitat, donde las condiciones hubieran sido constantes, y por ello, sin competencia, es decir, presión evolutiva, *la vida* habría cambiado poco desde su origen. Evidentemente, esto no ha sido así, y el ser vivo ha tenido que, bien especializarse en conquistar nuevos hábitats –como es el caso de los organismos extremófilos–, o generar mecanismos que le confieran superioridad frente a competidores. Muchos son los pasos que ha dado *la vida* hasta ahora, como es la aparición de la célula eucariótica, la organización en colonias, o el desarrollo de organismos pluricelulares, con células especializadas formando parte de un ser superior. Todos estos avances han ido acompañados de la co-evolución de sistemas de comunicación entre células, necesarios para la regulación de su desarrollo –crecimiento y división– y organización en tejidos que, en su conjunto, permiten la viabilidad del individuo. La importancia y complejidad de la comunicación intercelular en los organismos superiores sugiere que una gran proporción de sus genes está destinada a estos procesos. Muchos de ellos se encuentran extraordinariamente conservados a lo largo de la evolución, como es el del receptor tirosina quinasa, ubicuo en el hombre, pero también encontrado en organismos tan alejados de éste como son los coanoflagelados [King and Carrol, 2001].

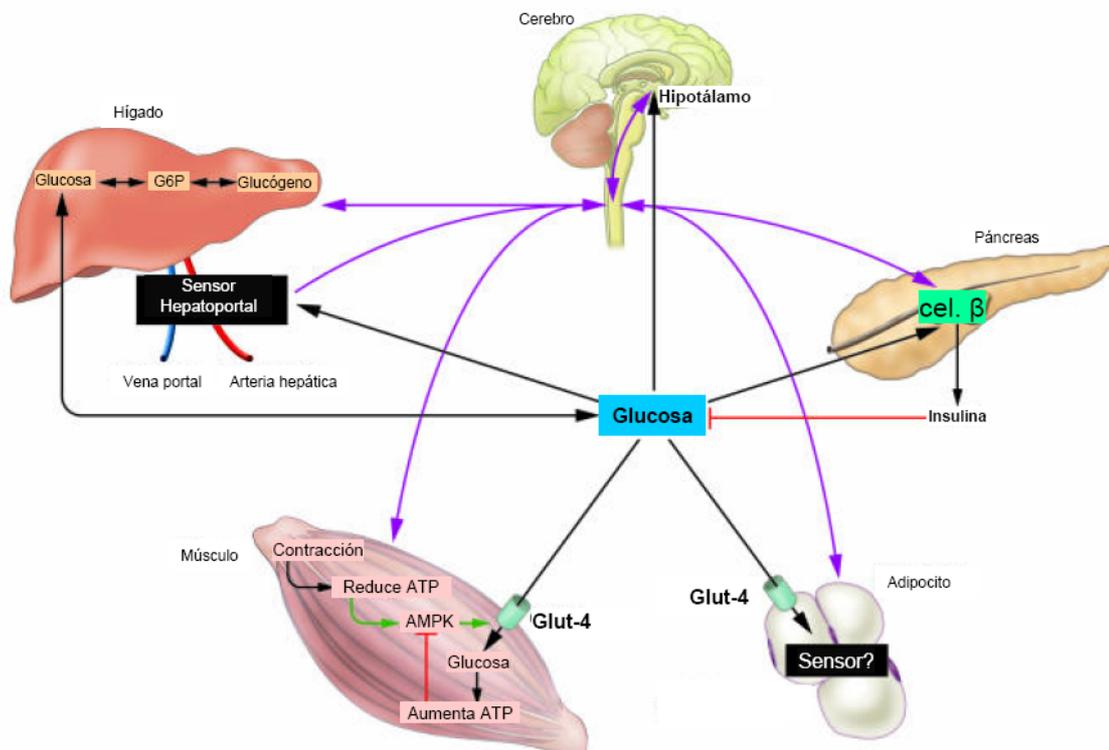
Mediante la cooperación entre células, y a diferencia de un sistema abierto en equilibrio termodinámico con el entorno, los organismos pluricelulares son capaces de mantener condiciones internas estables. Esta propiedad, y su importancia, ya fue comprendida por Claude Bernard [1865], el cual afirmó que “*todos los mecanismos vitales, por muy variados que sean, tienen un fin, y es el de mantener la constancia del medio interno,... lo que es condición de la vida libre*”. Esto originó que Walter B. Cannon [1928], fisiólogo norteamericano, acuñase el término *homeostasis*, para

describir y/o definir la regulación de este medio interno, cuyo proceso de mantenimiento constante es tan complejo, que nos habla de fragilidad y, por tanto, vulnerabilidad del individuo.

En los mamíferos –aunque no sólo en ellos–, la homeostasis es vital; el sistema circulatorio, constituido por venas, arterias y sangre, es el encargado del transporte de metabolitos a los tejidos, y de recoger y eliminar los productos de desecho, así como de participar en la regulación de la temperatura y en la respuesta inmune. Sin embargo, los niveles circulantes de sustancias están sujetos al control de otros órganos. Por ejemplo, el aparato respiratorio (pulmones) y el sistema nervioso regulan la cantidad de dióxido de carbono, no sólo en la sangre sino también en el líquido extracelular; el hígado y el páncreas controlan los niveles plasmáticos de glucosa; los riñones son responsables de la concentración de iones, y las glándulas endocrinas controlan las concentraciones hormonales. El hipotálamo desempeña un papel decisivo en la homeostasis: recibe información del cerebro, del sistema nervioso y del endocrino, y la integración de todos ellos no sólo hace posible su función termorreguladora, sino también el que sea capaz de controlar el balance de energía y el de los fluidos corporales, al margen de influir sobre la conducta (por ejemplo, el hipotálamo es responsable de la sensación de hambre), exteriorizando su respuesta a través de los sistemas endocrino y nervioso.

Para el buen estado de salud del individuo, el mantenimiento constante de la concentración de glucosa circulante, es esencial. A pesar de que, durante mucho tiempo, la presencia de azúcar en la sangre había sido considerada como un factor patológico, o accidental, Claude Bernard, en 1877, ya afirmó, en su famosa *Leçons sur le diabète*, que la glucemia -azúcar en la sangre- es independiente de la alimentación, que está presente en el hombre y en otros animales tanto saciados como en ayunas, y que constituye en sí misma una característica normal, siendo la verdadera anomalía, en contra de lo hasta entonces establecido, tanto su exceso como su ausencia.

La glucosa es utilizada como combustible por todas las células del organismo (**fig. 1**), pero la proporción empleada por cada una depende de su actividad; pero si bien la mayor parte de ellas también se nutre de derivados grasos, el cerebro sólo metaboliza



**Figura 1. Comunicación neural (—) y hormonal (—), entre tejidos sensibles a glucosa**

glucosa. El azúcar pasa al torrente sanguíneo procedente del intestino, que la ha absorbido durante la digestión, o proviene de las reservas de glucógeno que se localizan mayoritariamente en el hígado. El sistema homeostático conocido, más complejo, es el del control de los niveles de glucosa sanguínea (**fig. 1**).

Todas las transformaciones químicas que se producen en el cuerpo de un individuo, para el mantenimiento constante de la homeostasis, es lo que llamamos metabolismo que, literalmente, significa cambio. En relación a la glucosa, su destino es la formación de glucógeno –glucogenogénesis–, que es su forma de almacenamiento, o el ser catabolizada a ácido pirúvico –glucólisis–. El glucógeno está presente en la mayor parte de los tejidos, pero son el hígado y el músculo los tejidos mayoritariamente encargados de su depósito.

Un trastorno, con consecuencias fatales, es aquel relacionado con el metabolismo de la glucosa, y tres son las condiciones fundamentales que conducen a su acumulación

deficiente en la célula: el ayuno prolongado, la diabetes *mellitus*, y una dieta rica en grasas y pobre en hidratos de carbono. En la diabetes –disminución parcial o absoluta de insulina o acción defectuosa de ésta–, el mecanismo de acceso de la hexosa a la célula está alterado. Pero en los casos en que la mayor parte del aporte calórico deviene de grasa, se desarrolla una deficiencia de carbohidratos; además, la grasa se instala en el hepatocito, desplazando al glucógeno acumulado.

Los síntomas de la **diabetes** están muy identificados desde antiguo; de hecho, por ejemplo, en un texto de medicina hindú –el Yoga Ratnekére (ca. 1800)–, basado en una vieja traducción (ca. 1500) del Sánscrito, se describen las características de la orina del paciente diabético, con una sola palabra, extraordinariamente compleja –*svetasitamurtapicchilacchasnigdthaguruprasadamadhurasandramandaih*–, formada por una combinación de observaciones organolépticas parciales como brillo, claridad, dulzura, transparencia, pegajosidad, etc. [Reinhold y col., 1932]. Sin embargo, no es hasta finales del siglo XIX cuando se produce un cambio de orientación y un avance determinante en el conocimiento de la enfermedad. En concreto, Claude Bernard [1849], describe la conexión entre el sistema nervioso central y la diabetes; y Minkowski y von Mering, en 1890, consiguen generar una diabetes artificial, en el perro, por extirpación del páncreas [Mering y Minkowski, 1890]; además, Paul Langerhans muestra, en 1869, la anatomía e histología de las células del islote pancreático, si bien él mismo afirmaba desconocer su función. Por fin, en 1922, se proporciona la prueba definitiva e indiscutible de la existencia de una molécula en el páncreas, la **insulina** [Banting y Best, 1922], que es el verdadero principio estrechamente relacionado con la diabetes.

La insulina es secretada desde la célula  $\beta$  pancreática, bajo el estímulo de la glucosa sanguínea -fundamentalmente-, y regula el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y aminoácidos en numerosos tejidos; su concentración en sangre está en función de la de glucosa, y constituye el mensajero hormonal de la disponibilidad del azúcar. Con ello, la insulina, que estimula el transporte de glucosa en el músculo y en el adipocito [Cushman y Warzala., 1980; Suzuki y Kono, 1993], se convierte en el elemento principal del mecanismo controlador del nivel de azúcar en la sangre, conduciendo su efecto metabólico, en conjunto, a la regulación de la utilización y almacenamiento de glucosa por parte de los tejidos. Su importancia fisiológica es tal, que ha sido una de las proteínas más estudiadas; de hecho, fue la primera en ser secuenciada [Sanger,

1959], la primera en ser sintetizada químicamente [Katsoyannis y col., 1963], y también la primera proteína recombinante para uso clínico [Goeddel y col., 1979].

El primer paso en la acción de la insulina, una vez secretada, es la unión, en el tejido diana, a su receptor de membrana, cuya estructura se conoce desde 1985 [Ebina y col., 1985; Ullrich y col., 1985], y que es una glucoproteína integrada en la membrana celular, constituida por dos subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$ , unidas entre sí por enlaces covalentes de tipo disulfuro. En esta unión se forman heterodímeros  $\alpha$ - $\beta$  que, a su vez, están asociados por el mismo tipo de puentes disulfuro, construyendo un tetrámero  $\alpha_2$ - $\beta_2$  [Czech, 1985]. El receptor de insulina se expresa en casi todos los tejidos de mamíferos, si bien lo hace mayoritariamente en el músculo, tejido adiposo e hígado [Cheatham y Kahn, 1995]. Cuando la insulina se une a la subunidad  $\alpha$  del receptor, se produce un cambio conformacional que resulta en la activación de la quinasa de la subunidad  $\beta$  [Herrera y Rosen, 1986; Baron y col., 1992]; ello conduce a la transferencia de grupos fosfato desde el ATP a múltiples residuos de tirosina del propio receptor, y a la fosforilación de proteínas sustrato intracelulares del receptor (IRS) que, en general, se relacionan con proteínas que contienen dominios SH<sub>2</sub> [Taha y Klip, 1999], y cuya asociación inicia las principales vías de señalización celular. La existencia de varias proteínas IRS distintas, así como la de otras intermediarias, ofrece un sin fin de posibles mecanismos por los que la insulina puede ejercer su acción, y que resulta en una compleja ramificación de las vías de señalización de la hormona en células sensibles a ésta.

Pero la respuesta rápida de la célula  $\beta$  a cambios en la concentración extracelular de glucosa, implica el acceso, necesariamente fluido, del azúcar al interior de la célula a través de su membrana plasmática [Hellman y col., 1971; Matschisky y Elerman, 1968], en la que la presencia de una isoforma de los transportadores de glucosa, el Glut-2 [Thorens y col., 1988] -de baja afinidad para la glucosa-, y la fosforilación del azúcar a través de la glucoquinasa -isoenzima de la hexoquinasa con una alta Km para la glucosa [Malaisse y col., 1976; Sener y col., 1986]-, son esenciales en su función secretora.

El proceso de captación de glucosa por parte de los distintos tejidos, inducida por insulina, también está mediado por distintos glucotransportadores –proteínas de membrana de 45-55 kDa–. Estos pertenecen a una familia de proteínas transportadoras de azúcares y de otros compuestos orgánicos [Marger y Saier, 1993; Brown, 2000], que

tienen una amplia distribución filogenética. Existen varias isoformas de transportadores de glucosa (GLUTs), las cuales difieren entre sí en sus características cinéticas y especificidad de tejido.

En el músculo, y también en el tejido adiposo, se expresa específicamente el **Glut-4** [Fukumoto y col., 1989], donde representa el 90% del total de glucotransportadores presentes [Kandror y Pilch, 1996; Kahn, 1996]; ambos tejidos son denominados sensibles a insulina, porque la hormona induce en ellos un aumento del transporte del azúcar, el cual, sin embargo, y en estado basal, corre a cargo del Glut-1. El aumento en la captación de la hexosa se produce tras la translocación de vesículas membranosas con alto contenido en Glut-4, desde el interior celular a la membrana plasmática [Zorzano y col., 1989], deteniéndose el proceso cuando el transportador se interna de nuevo [Cushman y Wardzala, 1980]. La insulina [Guma y col., 1991], la contracción muscular por ejercicio [Lund y col., 1995] o por estimulación eléctrica [Roy y col., 1997], la glucosa [Goodyear y col., 1996], y agentes hipoglucemiantes como las sulfonilureas [Pulido y col., 1996], inducen la translocación del glucotransportador. En este efecto de la insulina, inductor de captación de glucosa por células sensibles a la hormona, parece ser clave un incremento en la actividad PI3K [Shepherd y col., 1998]; pero aunque suficiente para su inicio, no se consigue con ello una activación completa del transporte [Frevet y Kahn, 1997], por lo que algunos autores creen en la necesaria participación de una segunda ruta de señalización [Isakoff y col., 1995]. Así, aunque el mecanismo de translocación del Glut-4 es aún desconocido, sí se ha demostrado que la PI3K puede estimular otras enzimas como la PKB o la PKC [Litherland y col., 2001]; además, moléculas como la fosfolipasa C, la isoforma 1 de la fosfolipasa D o la Rab4 [Imamura y col., 2003], parecen también estar involucradas en el proceso.

El **Glut-2** es la isoforma mayoritaria de los glucotransportadores en el hígado, en la célula  $\beta$  pancreática, en el epitelio luminal del riñón y en el intestino [Thorens, 1992a; Thorens y col., 1988]. La homología del Glut-2 humano con el de la rata es de un 82%, valor aceptable para la distancia filogenética que separa las dos especies [Kayano y col., 1988]; su  $K_m$  (42 mM) es la mayor de todos los transportadores de glucosa [Gould y col., 1991], lo que unido a la presencia de glucoquinasa -con una  $K_m$  también suprafisiológica- en el hígado y en la célula  $\beta$ , convierte estos tejidos en altamente sensibles a glucosa [Unger, 1991]; por ello, se piensa que, posiblemente, el Glut-2 está involucrado en la

patogénesis de ciertas formas de diabetes [Johnson y col., 1990; Orci y col., 1990a; Orci y col., 1990b; Thorens y col., 1990]. Algunos resultados de estudios realizados en la rata, indican que el ARNm del Glut-2 de la célula  $\beta$  aumenta directamente con la concentración de glucosa en sangre [Chen y col., 1990], mientras que otros sostienen lo contrario [Koranyi y col., 1992]. También es contradictoria la información obtenida en el hígado del modelo de diabetes tipo 1 inducido por tratamiento con estreptozotocina en la rata, en el que se ha detectado desde una disminución de la proteína [Dombrowski y col., 1996] hasta una independencia [Thorens y col., 1990a; Tal y col., 1991], o incluso un aumento [Burcelin y col., 1992; Brichard y col.; 1993a; Brichard y col., 1993b], tanto de los niveles del glucotransportador como de su expresión génica; en el caso de aumento, el tratamiento con florizina [Brichard y col.; 1993b], vanadato [Brichard y col., 1993a] o insulina [Burcelin y col., 1992] normalizaban las alteraciones.

En cuanto a la diabetes, no obstante, su manifestación procede de muchas más razones que la de mera ausencia de insulina –tipo 1–. De hecho, la **diabetes tipo 2**, en la que una carencia absoluta de insulina no es el problema, se caracteriza, en general, por el fracaso de la célula  $\beta$  para responder y compensar la resistencia a la acción de la hormona en tejidos participantes en el metabolismo de la glucosa. La diabetes tipo 2 es la enfermedad metabólica más frecuente, además de la primera causa de ceguera, insuficiencia renal y enfermedad vascular periférica en el adulto; la resistencia a insulina predice su futuro desarrollo, y hay factores genéticos que determinan el riesgo de padecerla. Sobre ello, además, se ha puesto de manifiesto la responsabilidad de alteraciones en lo que se conoce de su vía de señalización celular. De todas formas, su complejidad en células sensibles a insulina está por determinar y, por tanto, no se conocen del todo los factores origen de los defectos en su acción o secreción, que abocan al individuo a un estado diabético. Sí está demostrado, sin embargo, que una dieta rica en carbohidratos y grasas, en combinación con falta de ejercicio físico, es causa de obesidad que, con frecuencia, y en un periodo variable en función del individuo, conduce a la aparición de resistencia a la insulina, y diabetes.

Varios son los componentes de la dieta, cuya presencia se ha prescrito como beneficiosa en situaciones diabéticas tipo 2. Por ejemplo, el enriquecimiento moderado de la dieta con ácidos grasos monoinsaturados –aceite de oliva– [Cancelas y col., 2006], caseína y goma de guar [Prieto, 2006], son elementos que parecen mejorar la

sensibilidad a la insulina y favorecer un descenso post-*pandrium* de la glucemia, sin modificar el incremento del peso. También, últimamente se ha demostrado que el inhibidor de la  $\alpha$ -amilasa pancreática, presente en la alubia blanca –*Phaseolus vulgaris*–, administrada oralmente, reduce la glucemia y la cantidad de alimento y agua ingerida, en ratas normales y diabéticas tipo 2, y que en estas últimas, también normaliza los niveles de disacáridos [Tormo y col., 2006].

El síndrome de resistencia a la insulina está caracterizado por un deterioro en la capacidad de respuesta de la célula a la hormona que, por tanto, provoca una captación de glucosa deficiente, manifiestada por altas concentraciones de azúcar en la sangre y posterior aparición de diabetes tipo 2. Pero la célula  $\beta$  no puede sostener indefinidamente una hiperproducción de insulina con el fin de compensar la resistencia a la hormona, por lo que, con el tiempo, ello aboca a una disfunción, primero, y ulterior muerte –diabetes tipo 1– de la célula [Beck-Nielsen y Groop, 1994; Turner y Clapham, 1998]. La resistencia a la insulina, con un estado de hiperinsulinemia sostenida, están ya presentes en personas, generalmente obesas, décadas antes de que se manifieste una diabetes tipo 2 [Lillioja y col., 1993; Despres y col., 1996; Smith, 1996]. Además, se ha postulado que la resistencia a la insulina se inicia en el tejido adiposo, el cual tendría un papel señero en la inducción y desarrollo del problema en el hígado y músculo [Smith, 2002].

Hoy día, dos son las teorías que, mayoritariamente, tienden a explicar la aparición de resistencia a insulina y diabetes tipo 2. Una está basada en su posible origen inmune, que adjudica a la aparición o incremento de mediadores inflamatorios la responsabilidad e influencia perniciosa sobre el equilibrio entre el proceso de metabolización del azúcar –regulado por insulina y otras hormonas– y el de la propia función de la célula  $\beta$ . La segunda teoría es conceptualmente metabólica, y toma en consideración que la función del tejido se ve directamente afectada por la acción tóxica de un exceso de glucosa, ácidos grasos no esterificados (AGNE) y triglicéridos, probablemente mediado por un incremento en el estrés oxidativo [Jansson y col., 1995; Evans y col., 2003].

Muchos son los trabajos que en los últimos años han mostrado una estrecha relación entre valores altos de insulina y diabetes tipo 2, con enfermedad coronaria, obesidad, dislipemia o hipertensión arterial, así como con otros trastornos metabólicos y de

coagulación [Rolla, 1994; Davidson, 1995]. Reaven [1994] describió el Síndrome X, caracterizado por hipertensión arterial, dislipemia –TG altos, HDL altas, LDL altas con patrón tipo B–, hipeuricemia, y aumento del inhibidor del activador tisular de plasminógeno.

Si tomamos como premisa que el tejido adiposo sea en realidad un órgano endocrino más [Kershaw y Flier, 2004], que en determinadas circunstancias puede liberar un exceso de ácidos grasos libres (AGL), angiotensina II y adipocinas, estamos frente a factores potencialmente desestabilizantes del metabolismo. Por ejemplo, la concentración desproporcionada de AGL en sangre inhibe la captación de glucosa por el músculo [Shipp y col., 1961; Belfort y col., 2005], lo que unido a la de angiotensina II, provoca daños en el páncreas; y a pesar de que la célula  $\beta$  conserva actividad, ésta no es suficiente para contrarrestar la hiperglucemia originada –insulinorresistencia–. A ello hay que añadir el hecho de que la angiotensina II es, *per se*, un vasoconstrictor, que aumenta la presión arterial; además, el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y otras citoquinas (interleuquinas), en exceso, no sólo promueven procesos inflamatorios que reducen, aún más, la eficacia de la insulina, sino que, también, generan hipertensión. El exceso de glucosa y AGL circulantes son la señal para que el hígado sintetice triglicéridos que, finalmente, resultan en un aumento en la relación LDL/HDL [Jandeleit-Dahm y col., 2005; Syvanne y Taskine, 1997]. Esto, en su conjunto, se conoce actualmente como *síndrome metabólico* [Opie, 2007], y su diagnóstico clínico se basa en valores aumentados de grasa abdominal, glucemia en ayunas, presión arterial, relación HDL/LDL y triglicéridos.

En la diabetes tipo 2, el efecto **incretina**, que corre fundamentalmente a cargo de dos hormonas gastrointestinales con propiedades insulínótropas, el GLP-1 (glucagon like peptide 1) y el GIP (glucose-dependent insulínotropic peptide o gastric inhibitory polipeptide), está reducido, o ausente [Nauck y col., 1986]. Si bien la secreción del GLP-1 es ligeramente menor [Toft-Nielsen y col., 2001; Vilsboll y col., 2001], es sobre todo más baja la actividad insulínótropa del GIP [Nauck y col., 1993a; Krarup y col., 1998; Meier y col., 2001]. De hecho, mientras que el efecto insulínótropo del GLP-1 está bien conservado en estos pacientes [Nauck y col., 1993b; Kjems y col., 2003], el GIP es prácticamente inactivo [Nauck y col., 1993b; Meier y col., 2001; Vilsboll y col., 2001]. En sujetos normales, el GLP-1 es, probablemente, la incretina más importante [Nauck y col., 1993a]; como en el diabético tipo 2 el efecto

incretina global está disminuido –debido probablemente a la incapacidad del páncreas endocrino para responder al GIP–, ello ha servido como una de las bases para la propuesta de utilización del GLP-1 como terapia de reposición.

El **GLP-1** no sólo estimula la secreción de insulina dependiente de glucosa [Kreymann y col., 1987; Nauck y col., 1993a], sino que también suprime la de glucagón [Orskov y col., 1988; Nauck y col., 1993a], desacelera el vaciamiento gástrico [Wettergren y col., 1993; Willms y col., 1996; Nauck y col., 1997] y reduce el apetito induciendo saciedad [Flint y col., 1998; Gutzwiller y col., 1999; Zander y col., 2002], efecto que a la larga propicia una pérdida de peso [Zander y col., 2002]; además, también tiene influencia sobre la sensibilidad a la insulina [Gutniak y col., 1992; Zander y col., 2002]. Por otro lado, a través de estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha sugerido que el GLP-1 induce la diferenciación de precursores de células  $\beta$  endocrinas, que estimula la multiplicación de las mismas y también la formación de nuevos islotes pancreáticos tras pancreatectomía parcial [Wang y col., 1995; Stoffers y col., 2000; Hui y col., 2001; Abraham y col., 2002], al margen de inhibir la apoptosis de la célula  $\beta$  en respuesta a distintos tóxicos [Hui y col., 2003]. Esto último puede resultar en un incremento neto de la masa de células  $\beta$  tras una administración sostenida de GLP-1 [Brubaker y Drucker, 2004]. Prácticamente todas estas acciones descritas en modelos experimentales o en sujetos sanos, han podido ser demostradas en pacientes diabéticos tipo 2, excepto la relacionada con el aumento de la masa de células  $\beta$ , debido a la falta de disponibilidad de un método que permita medir el total de las mismas *in vivo*. Por otro lado, se ha documentado que el GLP-1 incrementa la utilización de glucosa por el hígado, y que su efecto es aditivo al de la insulina, independientemente de la vía de administración [Dardevet y col., 2004].

Pero el hecho probado de que el GLP-1 no sólo es una incretina [Creutzfeldt, 1979], –su liberación aumenta tras la absorción de nutrientes, y luego estimula la secreción de insulina–, sino que también su efecto antidiabético es independiente de insulina, hizo pensar que este péptido, derivado de la molécula de proglucagón en su procesamiento post-traducciona l en las células L del intestino [Mojsov y col., 1986], debía necesariamente tener efectos directos en tejidos extrapancreáticos participantes en la homeostasis de la glucosa.

A lo largo de los años (**fig.2**), se ha sabido que el GLP-1 tiene receptores específicos en el tejido adiposo de la rata [Valverde y col., 1993] y del hombre –normal [Mérida y col., 1993] y diabético [Villanueva-Peñacarrillo y col., 1994b]–, y en el hígado [Wheeler y col., 1993; Campos y col., 1994; Egan y col., 1994; Villanueva-Peñacarrillo y col., 1995] y músculo esquelético [Wheeler y col., 1993; Egan y col., 1994; Delgado y col., 1995] de la rata. El receptor en estos tejidos parece

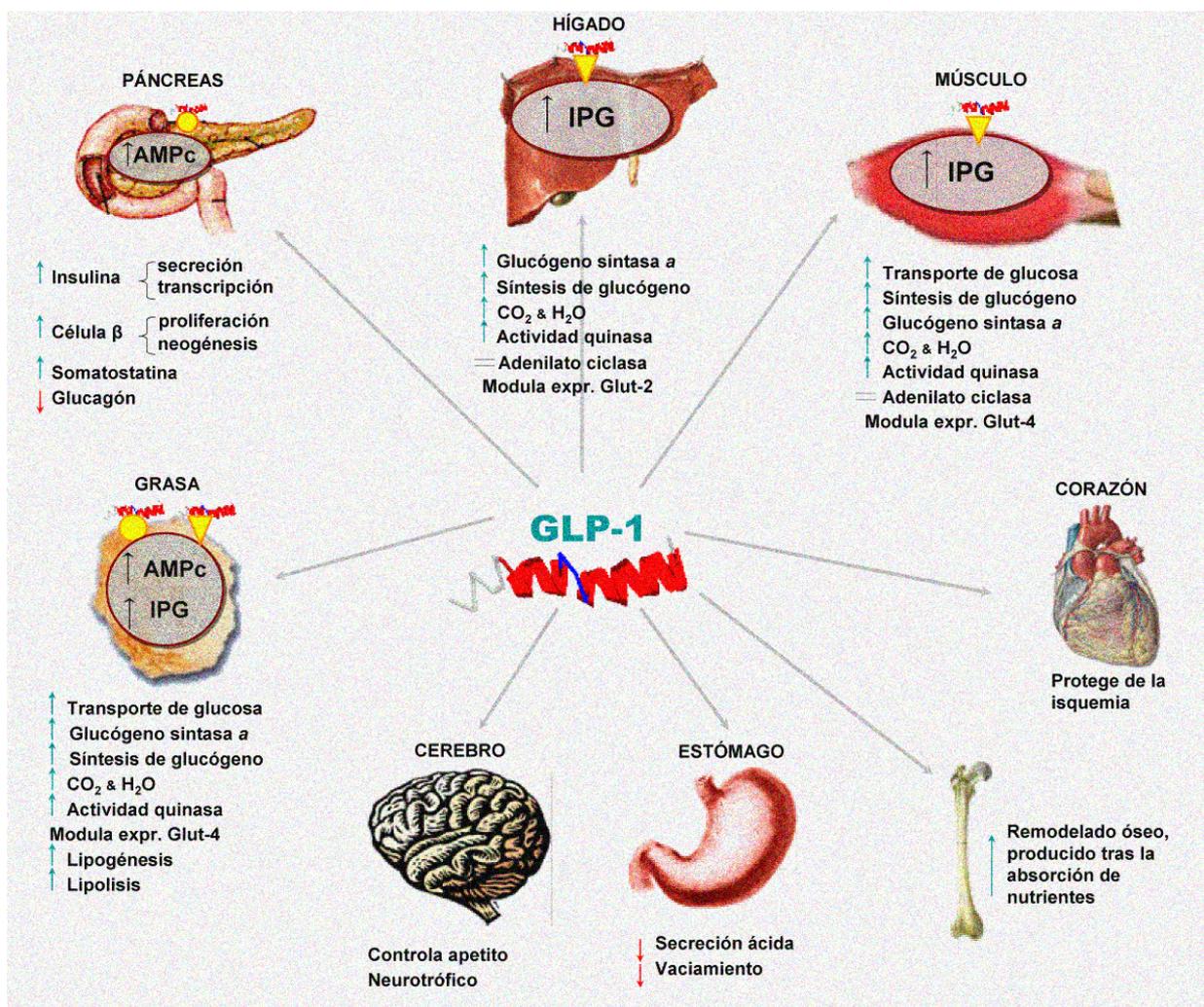


Figura 2. Acciones pancreáticas y extrapancreáticas del GLP-1

estructural y/o funcionalmente distinto al descrito en el páncreas –463 aminoácidos, y perteneciente a la familia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G [Thorens, 1992b]–, asociado al sistema adenilato ciclasa-AMPC [Drucker y col.,

1987; Göke y Conlon, 1988]. De hecho, tanto en el hígado como en el músculo, el GLP-1, a diferencia de su acción en el páncreas, no propicia la formación de AMPc [Valverde y col., 1994; Villanueva-Peñacarrillo y col., 1994a; Morales y col., 1997; Yang y col., 1998]. Pero no sólo en estos tejidos hay receptores para GLP-1, sino también en las glándulas oxínticas del estómago [Uttenhal y Blázquez, 1990], en el pulmón [Lankat-Buttgereit y col., 1994], y también en el cerebro [Uttenhal y col., 1992; Calvo y col., 1995; Álvarez y col., 1996, 2005; Navarro y col., 1996], en el que se ha sugerido, además, un efecto estimulador de la leptina sobre la expresión del receptor que podría favorecer la acción anoréxica del péptido [Sanz y col., 2008].

En el hígado y músculo, cuyo receptor para GLP-1 es una glicoproteína de aproximadamente 63 KDa [Delgado y col., 1995; Villanueva-Peñacarrillo y col., 1995], al menos uno de sus segundos mensajeros podría ser un IP3 (inositoltrifosfato). De hecho, se ha documentado que el GLP-1 induce la hidrólisis inmediata de GPIs (glicosilfosfatidilinositoles) –al igual que la insulina– en una línea celular de miocitos en cultivo, la BC3H-1 [Galera y col., 1996], en otra de hepatoma humano, la HepG2 [Trapote y col., 1996] y en el adipocito y hepatocito aislado de rata [Márquez y col., 1998].

Tanto en el hígado como en el músculo esquelético, el GLP-1 estimula el metabolismo de la glucosa (**fig. 2**), que se manifiesta por el incremento en la incorporación de D-glucosa a glucógeno documentado en hepatocitos aislados y en el músculo esquelético de la rata normal [Valverde y col., 1994; Villanueva-Peñacarrillo y col., 1994a] y también diabética [Morales y col., 1997], y en el músculo y miocitos humanos en cultivo primario [Luque y col., 2002]; además, su efecto glucogénico está asociado a un aumento de la actividad glucógeno sintasa  $\alpha$ , y a una estimulación de la oxidación y utilización de glucosa [Villanueva-Peñacarrillo y col., 1994a]. Estos efectos en el músculo esquelético son dependientes de diversas quinasas –PI3K/PKB, p70s6k, MAPKs y PKC y –, también participantes en la acción de la insulina [Acitores y col., 2005; González y col., 2005a]. Por otro lado, el GLP-1 modula la expresión del respectivo glucotransportador mayoritario en el hígado y músculo, a nivel de la traducción y/o postraducción, tanto en la rata normal como diabética tipo 1 y tipo 2, aunque se ha sugerido que la participación de la insulina sea, posiblemente, necesaria, para que el GLP-1 induzca una estimulación del proceso transcripcional [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001].

En el tejido adiposo, el GLP-1 influye tanto en el metabolismo de la glucosa como en el de los lípidos (**fig. 2**). En el adipocito de la rata [Valverde y col., 1993] y del hombre –normal [Mérida y col., 1993] y diabético [Villanueva-Peñacarrillo y col., 1994b]–, se ha descrito la presencia de una unión específica para el GLP-1. En un estudio de identificación de las características de esta unión, indicativa de la existencia de un receptor, se detectó que el GLP-1 no sólo estimula la producción de IPGs [Márquez y col., 1998], como en el caso de células musculares [Galera y col., 1996] y hepáticas [Trapote y col., 1996], sino también la producción de AMPc [Ruiz-Grande y col., 1992]. El aumento de estos dos propuestos segundos mensajeros, sugiere la existencia de dos receptores para el GLP-1, lo que viene reforzado por el hecho de que el GLP-1 no sólo estimula la síntesis de glucógeno y el transporte, oxidación y utilización de glucosa en el tejido adiposo [Perea y col., 1997; Sancho y col., 2005, Sancho y col., 2006], además de modular los niveles del glucotransportador en adipocitos 3T3-L1 [Wang y col., 1997] y en la rata normal y diabética [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001], sino que tiene también una doble acción sobre el metabolismo lipídico: como la insulina, es lipogénico, y el efecto de ambos –que es, por otro lado, aditivo– no se manifiesta en presencia de glucagón; pero, como el glucagón, también es lipolítico, y tanto el efecto del uno como el del otro se anula en presencia de insulina [Ruiz-Grande y col., 1992; Perea y col., 1997]. Como en el caso del hígado y músculo, estos efectos del GLP-1 también son visibles en el adipocito del hombre [Sancho y col., 2007a], y parecen estar mediados por un incremento en la actividad de distintas quinasas [Sancho y col., 2005, Sancho y col., 2007a]. El efecto del GLP-1, al menos el relacionado con el transporte de la glucosa y metabolismo lipídico, se mantienen en estado diabético tipo 2, incluso con mayor e igual potencia, respectivamente, que la de la insulina y el glucagón [Sancho y col., 2005]. Además, es posible que el GLP-1 contribuya a la normalización de las condiciones metabólicas del obeso mórbido tras cirugía restrictiva [Valverde y col., 2005], y que también pueda contrarrestar la acción defectuosa de la insulina sobre el transporte de glucosa del adipocito en la diabetes, además de amortiguar la hiperactividad de la insulina sobre la lipogénesis en el obeso, también mediante su potenciado efecto sobre la lipólisis [Sancho y col., 2007a].

Todo lo anterior refuerza la propuesta de utilización del GLP-1 como agente terapéutico en la diabetes tipo 2 [Gutniak y col., 1992], y también lo hace el hecho de que el efecto antidiabético del GLP-1 sea evidente tras su inyección subcutánea en estos

pacientes [Gutniak y col., 1994] –en los que también el GLP-1, sea o no amidado, tiene efecto insulínico [Elahi y col., 1994]–. No obstante, las sucesivas investigaciones están sacando a la luz otros efectos, que no están directamente relacionados con el metabolismo de la glucosa o el de los lípidos. De hecho, se ha propuesto al GLP-1, y a análogos con capacidad de unión a su receptor cerebral [Goke y col., 1995], y de acción más prolongada, como posibles agentes terapéuticos en la enfermedad de Alzheimer y en otros procesos neurodegenerativos del sistema nervioso central y periférico [Larsen y Holst, 2005]. Esta última propiedad de péptido está basada en su demostrada acción neurotrófica en células neuronales en cultivo –a las que protege contra la apoptosis inducida por glutamato, y contra el daño oxidativo– [Perry y col., 2002]; y en su capacidad para modificar el proceso del precursor de la proteína  $\beta$  amiloide, y en la de reducir, en neuronas del hipocampo, *in vitro*, y en función de la dosis, los niveles de la propia proteína [Perry y col., 2003]. En relación a esto, se ha documentado, en ratones, que el GLP-1 es un potente neuroprotector, y su receptor cerebral ha sido relacionado con el aprendizaje, puesto que aquellos animales con sobreexpresión del mismo en el hipocampo muestran una mayor capacidad de memorización [During y col., 2003].

Últimamente, se ha propuesto que las incretinas, es decir el GLP-1 y el GIP, podrían intervenir, directa o indirectamente, en el proceso de remodelado óseo que se produce tras la absorción de nutrientes [Clowes y col., 2005]. En relación a ello, nuestro laboratorio ha observado que, en un modelo de diabetes tipo 2 inducida con streptozotocina, y también en otro de resistencia a insulina, obtenido por sobrealimentación con fructosa, el tratamiento sostenido con GLP-1 parece tanto estimular la formación del hueso como incrementar su resistencia, parámetros inicialmente deteriorados en ambos estados [Nuche-Berenguer y col., 2007, Nuche-Berenguer y col., 2008].

Pero una vez en el torrente sanguíneo, el GLP-1 es degradado por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), lo que hace que su vida media sea inferior a 2 minutos [Kieffer y col., 1995; Deacon y col., 1995; Holst y Deacon, 1998]; luego, si bien se han puesto grandes expectativas en él como futuro agente terapéutico en la diabetes tipo 2, ese inconveniente obliga a que su administración sea casi continua o muy frecuente. Aunque la eliminación de este obstáculo está siendo estudiada de forma constante en distintos laboratorios –una propuesta fue su administración como tableta inserta en la mucosa bucal [Gutniak y col., 1997]–, también se están investigando las propiedades de

otros posibles agentes antidiabéticos como es el caso de la exendina 1-39amida, o exendina-4 (Ex-4), que posee muchos de los beneficios fisiológicos y farmacológicos del GLP-1, sin mostrar, en principio, esa desventaja antes mencionada.

La **Ex-4** es la forma natural de la Exenatide<sup>®</sup> –exendina-4 sintética–, utilizada hoy día en la terapia de la diabetes, sola o en combinación con otros hipoglucemiantes orales [Iltz y col., 2006]. Fue originariamente aislada de la saliva del lagarto *Heloderma Suspectum*, comúnmente llamado Monstruo de Gila [Eng y col., 1992]; su liberación se produce tras morder a su presa –ingestión



**Figura 3. Homología entre GLP-1 y Ex-4**

de alimentos–, y representa el primer ejemplo de una hormona endocrina secretada por una glándula salival [Young, 2002]. Se desconoce si la Ex-4 tiene un papel en la homeostasis calórica de este lagarto, pero sí parece que participa en la regulación de su motilidad intestinal [Christel y col., 2007]. Su secuencia de aminoácidos tiene un 53% de homología con la del GLP-1 (**fig. 3**), pero procede de la transcripción de un gen distinto y no de un homólogo del gen del proglucagón del mamífero [Chen y Drucker, 1997]. En los mamíferos, este péptido es resistente a la degradación por DPP-IV y, quizás por ello, tiene una vida media mayor que la del GLP-1. Pero la Ex-4 no es un análogo del GLP-1, es decir, la estructura de la molécula sintética, Exenatide<sup>®</sup>, no ha sido obtenida por modificación de la secuencia del GLP-1. Sin embargo, la Ex-4 y el GLP-1 comparten muchos de sus efectos glucoreguladores, los cuales pueden estar mediados, entre otros, por el receptor pancreático del GLP-1 [Göke y col., 1993a]. Las acciones glucorreguladoras de la Ex-4 incluyen la insulínótropa dependiente de glucosa [Young y col., 1999; Parkes y col., 2001; Egan y col., 2002; Kolterman y col., 2003], que incluso propicia la reaparición de la primera fase de secreción en diabéticos tipo 2 –inicialmente disminuida en estos pacientes [Fehse y col., 2004]–, la supresión de la de glucagón [Kolterman y col., 2003], la deceleración del vaciamiento gástrico [Kolterman y col., 2003; Young y col., 1999], que puede estar paradójicamente acelerada en sujetos diabéticos [Rayner y col., 2001], y su efecto reductor sobre la cantidad de alimentos a ingerir [Bhavsar y col., 1998; Szayna y col., 2000]. Además, la Ex-4 promueve la proliferación de la célula  $\beta$  y

neogénesis del islote pancreático desde células precursoras (**fig. 4**), tanto *in vitro* como *in vivo* [Xu y col., 1999; Tourrel y col., 2001, Tourrel y col., 2002]. Estas acciones glucorreguladoras de la Ex-4, combinadas con sus ventajas farmacocinéticas, le confieren como resultado un mayor potencial *in vivo* respecto al GLP-1 nativo [Young y col., 1999; Greig y col., 1999]

Si bien esas propiedades farmacocinéticas ventajosas han impulsado la pronta comercialización y utilización de la Ex-4 como fármaco en estados de homeostasis de glucosa alterados, hasta la fecha no son muchos los trabajos de investigación dirigidos hacia el conocimiento de sus acciones, y características, en los distintos tejidos mayoritariamente participantes en la metabolización del azúcar y lípidos.

No obstante, hasta la fecha se sabe que (**fig. 4**), en el tejido adiposo, la Ex-4 y su forma truncada, la **Ex-9** (exendina 9-39amida), mimetizan al GLP-1 y a la insulina en su acción estimuladora sobre el transporte de glucosa y sobre la lipogénesis en el adipocito de la rata normal [Sancho y col., 2005]. Sin embargo, sólo la Ex-4 es, como el GLP-1, lipolítica, y estos efectos de las exendinas están mediados por distintas quinasas [Sancho y col., 2005]; además la acción estimuladora de la Ex-4 sobre el transporte de glucosa en el adipocito, se mantiene en un modelo de diabetes tipo 2 inducida con streptozotocina al nacer [Sancho y col., 2005]. En el tejido adiposo del hombre, la Ex-4, como el GLP-1, pero no la Ex-9, estimula la captación de glucosa con la misma eficiencia que la insulina. En el obeso mórbido [Sancho y col., 2007a], la Ex-4, como el GLP-1, no modifica el transporte de glucosa basal, y su efecto sobre la lipólisis, como el del GLP-1, es menor que en situación normal; sin embargo, la acción sobre la lipogénesis tanto de la Ex-4 como de la Ex-9, y la de la insulina, está realmente aumentada, incluso por encima, sobre todo en el caso de la insulina, respecto al sujeto normal. Además, la Ex-4, pero no su forma truncada, mimetiza al GLP-1 en sus efectos sobre el metabolismo de la glucosa en el hígado y músculo esquelético de la rata, a través de un incremento en la actividad glucógeno sintasa  $\alpha$ , síntesis de glucógeno y oxidación y utilización de la glucosa [Alcántara y col., 1997]. Por otro lado, y sin embargo, en el músculo del hombre, ambas, la Ex-4 y la Ex-9 estimulan el metabolismo del azúcar [Luque y col., 2002], y también, como el GLP-1, la actividad de diversas quinasas, participantes, algunas de ellas, en esta acción [González y col., 2005a].

Resultados muy recientes muestran que la Ex-4 podría mejorar las alteraciones en el remodelado óseo en situación de diabetes y de resistencia a insulina, a través de su posible acción osteogénica [Sancho y col., 2007b; Moreno y col., 2008].

La Ex-9 deriva de la Ex-4 por pérdida de ocho de sus aminoácidos del extremo amino terminal (**Fig. 3**), y es antagonista tanto del receptor del GLP-1 en varios sistemas celulares [Göke y col. 1993b] como de alguna de sus acciones *in vivo* [Kolligs y col. 1995; Cancelas y col., 2001a]. La Ex-9 ha sido utilizada, junto con la Ex-4, en la caracterización tanto del receptor como de los efectos del GLP-1 en diversos tejidos diana. La Ex-9 se une al receptor pancreático del GLP-1 [Göke y col. 1993a], y no sólo bloquea la secreción de insulina estimulada por éste [Kolligs y col., 1995] –con lo que, en consecuencia,

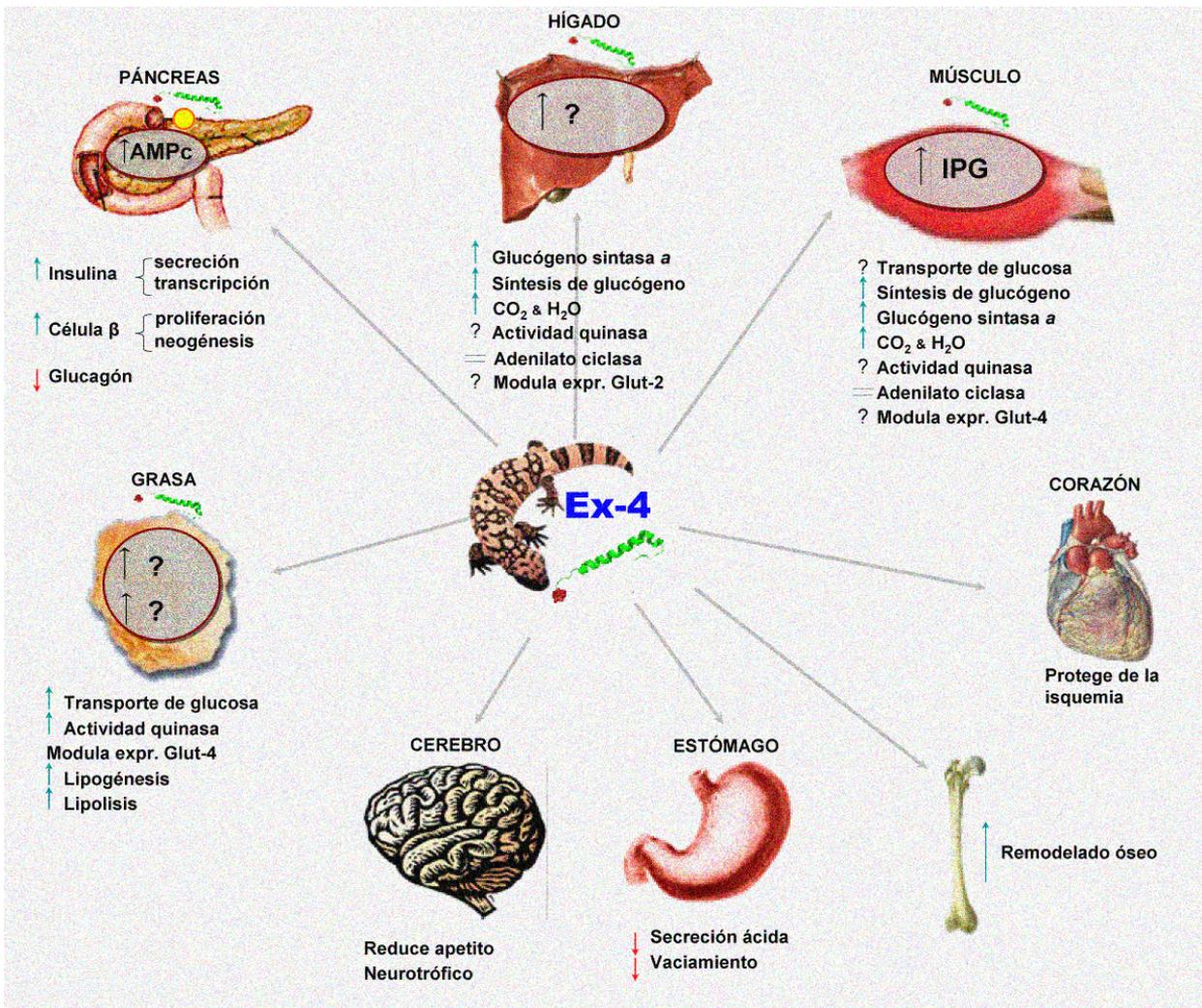


Figura 4. Acciones pancreáticas y extrapancreáticas de la exendina-4

aumentan los niveles de glucosa en plasma—, sino que también incrementa la glucemia *post-prandium* en respuesta a glucosa intragástrica o intraduodenal [Edwards y col., 1999; Kolligs y col. 1995], e inhibe, en la célula  $\beta$  pancreática, la formación de AMPc inducida por GLP-1 [Perfetti y Merkel, 2000].

Pero aunque, en general, la Ex-4 y la Ex-9 son agonista y antagonista, respectivamente, no sólo del receptor pancreático para GLP-1, sino también de su efecto estimulador sobre el metabolismo de la glucosa en hepatocitos y músculo esquelético de rata [Alcántara y col., 1997], y también de la acción insulínica del péptido [Cancelas y col., 2001a, Cancelas y col., 2001b], se ha demostrado que, en la línea de mioblastos L6 [Yang y col., 1998], en otra de adipocitos, la 3T3-L1 [Montrose-Rafizadeh y col., 1997], y en el músculo esquelético y miocitos humanos [Luque y col., 2002], ambas, Ex-9 y Ex-4, mimetizan la acción del GLP-1 sobre algunos parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa.

En definitiva, las propiedades terapéuticas de la Ex-4, a aplicar en casos que cursan con secreción alterada de insulina, o acción defectuosa de ésta, hacen acreedor a este péptido del interés en su estudio, dirigido al conocimiento de sus mecanismos de acción.

## PROPÓSITO

La exendina (1-39)amida (Ex-4) es un péptido de origen natural, no mamífero; que tienen una alta homología de secuencia con el GLP-1, y es agonista de su receptor en muchos sistemas celulares y de algunos de sus efectos sobre el metabolismo de la glucosa y lípidos en tejidos extrapancreáticos; además, este péptido es, como el GLP-1, insulínico, y también tiene un fuerte carácter antidiabético, incluso más potente y prolongado. Esto último, que quizás es debido a que la Ex-4 carece de puntos sensibles a degradación por dipeptidil peptidasa IV, focaliza el interés en el estudio de sus mecanismos de acción, hacia su utilización como agente terapéutico. La exendina (9-39)amida (Ex-9), forma troncada de la Ex-4, y antagonista del receptor para GLP-1 y también de algunos de sus efectos en la rata, es, sin embargo, como la exendina-4, agonista de su acción en el músculo esquelético del hombre.

A través de este estudio, se ha pretendido conocer, en relación a la Ex-4 y Ex-9:

- Su efecto sobre el transporte y metabolismo de la glucosa, y la relación de sus mecanismos de acción con los del GLP-1, en el músculo esquelético de la rata normal.
- Las características de su acción sobre el transporte y metabolismo de la glucosa, en el músculo esquelético en estado diabético tipo 2
- El efecto de su acción prolongada, en tratamiento sostenido, sobre el transporte de glucosa y expresión de glucotransportadores, en el músculo e hígado, y sobre la acumulación hepática de glucógeno, en la rata diabética tipo 2, respecto a la normal.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

En este trabajo se han utilizado ratas Wistar macho del bioterio de la Fundación Jiménez Díaz, alimentadas *ad libitum* con dieta estándar (UAR Panlab, Barcelona, España) y agua.

## 2. MODELO DE DIABETES EXPERIMENTAL TIPO 2 (DT2)

Se generó por inyección, en la rata neonata, de estreptozotocina (STZ), agente de conocida acción citotóxica, altamente específico para la célula  $\beta$  pancreática [Junod y col., 1967, Portha y col., 1979].

### **Materiales**

Estreptozotocina, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU*

Citrato sódico, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU*

### **Procedimiento**

Se preparó una disolución de STZ en citrato sódico 0,05 M, a una concentración de 20 mg/ml, pH 4,5, que se inyectó al animal, intraperitonealmente, en una única dosis (100 mg/Kg de peso), el día del nacimiento. Transcurridas 6-7 semanas, se midió en cada rata el grado de tolerancia al azúcar (coeficiente de utilización de glucosa).

### **2.1. Coeficiente de utilización de la glucosa**

Se determinó por observación del perfil de glucemia tras una sobrecarga intravenosa de glucosa [Portha y col., 1979].

### **Materiales**

NaCl 0,9%, *B. Braun Surgical S.A., Barcelona, España*

Heparina 1%, *Rovi S.A., Barcelona, España*

Pentobarbital sódico (Pentothal<sup>®</sup>), *Abbott Laboratories S.A., Madrid, España*

D-Glucosa anhidra, *Merck, Darmstadt, Alemania*

Analizador de glucemia, tiras reactivas (Acutrend<sup>®</sup>), *Böhringer Mannheim, Mannheim, Alemania*

Seda quirúrgica 2/0 B, *Braun Surgical S.A., Barcelona, España*

### **Procedimiento**

A la rata en ayuno y anestesiada, se le practicó un corte en el extremo de la cola para la obtención de muestras de sangre; se tomó una muestra (una gota) para la determinación de la glucemia basal, y seguidamente se inyectó glucosa (20% en suero salino), en unos 5 segundos, a través de la vena femoral, a razón de 500 mg/Kg de peso, volviéndose a tomar muestras de sangre 2, 5, 10, 20 y 30 minutos después. Al finalizar, se suturó la herida con seda quirúrgica.

Los valores de glucemia, medida mediante tiras reactivas Acutrend<sup>®</sup>, se utilizaron para la estimación del coeficiente de utilización de glucosa ( $K$ ), que se calculó según la relación  $[\ln 2 / (T_{1/2} - T_0)] \times 100$ , donde  $T_0$  es el minuto en que la glucemia alcanza el valor máximo, y  $T_{1/2}$  es en el que el valor máximo ha descendido, o descendería, a la mitad. Aquellos animales que presentaban un valor de  $K$  inferior a  $2,5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ , fueron considerados diabéticos tipo 2, y se utilizaron para el estudio correspondiente no más tarde de una semana después de esta prueba.

### **3. MATERIAL BIOLÓGICO**

Los resultados de este estudio se obtuvieron del músculo soleo y gastrocnemio, y del hígado y plasma de la rata. El músculo sóleo se utilizó en fresco, atado por los tendones a un alambre de acero inoxidable. El *gastrocnemio* y el hígado, limpios de tejido conectivo, grasa y restos de sangre, se conservaron a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su utilización. La sangre se recogió en tubos que contenían 25  $\mu\text{l}$  de ácido etilendinitrilotetraacético (EDTA) y 500 UIC (unidades inhibidoras de calicreína) de Trasylol; el plasma se separó de la fracción celular por centrifugación (15 minutos, 2.500 rpm,  $4^\circ\text{C}$ ), y se conservó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su estudio.

### **4. TRATAMIENTO CON EXENDINA-4**

Con el fin de estudiar el efecto de la acción prolongada de exendina-4 (Ex-4), sobre distintos parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa en la diabetes, se utilizó, como vía de administración, una bomba osmótica implantada subcutáneamente en la rata. Como control del tratamiento, en otro grupo de ratas de la misma edad y sexo, se implantó una bomba cargada con suero salino

### **Materiales**

Exendina 1-39amida [Ex-4], *Bachem AG, Bubendorf, Suiza.*

Bomba osmótica mod. ALZET 1003D, *Alza Corp., Palo Alto, EE.UU.*

Seda quirúrgica 2/0, *B. Braun Surgical S.A., Barcelona, España.*

NaCl al 0,9% (Salino), *B. Braun Medical S.A., Barcelona, España.*

### **Procedimiento**

A ambos grupos de ratas –normales y diabéticas tipo 2 (DT2)–, que habían sido sometidos una semana antes a una sobrecarga intravenosa de glucosa (M&M, 2.1), se les implantó subcutáneamente, en la región interescapular, la bomba osmótica cargada con Ex-4 a la concentración de  $2,40 \times 10^{-5}$  M en salino, que se iría liberando a un ritmo de 1  $\mu$ l/h (según la información del fabricante), para el mantenimiento de los niveles circulantes del péptido a  $\approx 10^{-9}$  M. A las 72 horas de implantación de la bomba, se sacrificó al animal; el hígado y los músculos gastrocnemios fueron recogidos y conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta su utilización para el aislamiento de membranas (M&M, 7), expresión del glucotransportador mayoritario de cada uno de los tejidos (M&M, 11) y valoración del contenido de glucógeno en el hígado (M&M, 14). Los músculos sóleo de cada animal se utilizaron en la determinación del transporte basal de glucosa (M&M, 12).

De todas las ratas, se tomó una muestra de sangre de aproximadamente 1 ml (M&M, 3) antes y después del tratamiento, que se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis del contenido en insulina y glucosa plasmática.

La concentración plasmática de glucosa se determinó por un sistema automatizado del método de la glucosa oxidasa, y la de insulina, por radioinmunoanálisis (M&M, 15).

## **5. PÉPTIDOS E INHIBIDORES**

En este trabajo se utilizó insulina, GLP-1, Ex-4 y su forma truncada Ex-9 –para el análisis de su acción respectiva sobre los diferentes parámetros a determinar en este estudio–, así como varios inhibidores de enzimas participantes en procesos de señalización intracelular.

### **Péptidos**

Insulina de cerdo, *Novo Biolabs, Bagsvaerd, Dinamarca.*

GLP-1(7-36)amida [GLP-1], *Bachem AG, Bubendorf, Suiza.*

Glucagón porcino, *Lilly Co., Indianapolis, IN, EE.UU.*

Exendina 1-39amida [Ex-4], *Bachem AG, Bubendorf, Suiza.*

Exendina 9-39amida [Ex-9], *Bachem AG, Bubendorf, Suiza.*

### **Inhibidores**

Wortmanina [W] –inhibidor de PI3K–, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU*

Rapamicina [Rap]–inhibidor de p70s6K–, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU*

PD98059 [PD] –inhibidor de p44/42 MAP quinasas–, *Calbiochem-Novabiochem Corporation, Darmstadt, Alemania.*

H-7 –inhibidor de PKC–, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU*

## **6. ESTUDIO DE ENZIMAS DE SEÑALIZACIÓN**

Para la determinación de la actividad respectiva PI3K, PKB, p70s6k y MAPKs, el músculo se trató como se describe a continuación:

### **Material**

Centrifuga Beckman GS-15R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

### **Reactivos**

Albúmina bovina, Fracción V (BSA), *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU*

CaCl<sub>2</sub>, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

D-glucosa anhidra, *E. Merck, Darmstadt, Alemania*

KCl, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU*

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

NaCl al 0,9% (Salino), *B. Braun Medical S.A., Barcelona, España.*

NaCl, *Panreac Química S.A., Barcelona, España.*

NaHCO<sub>3</sub>, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

### **Medio**

KRB: NaCl 118 mM, KCl 4,75 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,18 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM y CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, pH 7,4.

### **Procedimiento**

Los músculos sóleo de cada rata, ya preparados (M&M, 3), se mantuvieron durante 60 minutos a 30°C, en 3 ml de KRB con 5 mM de D-glucosa y 1% de BSA, y atmósfera de CO<sub>2</sub> /O<sub>2</sub> (5/95%); después, se sometieron a una incubación de 3 minutos, en 3 ml

del mismo medio fresco, con y sin los agentes de estudio. Tras ello, se retiró la muestra del vial, se adsorbió su exceso de humedad con una gasa, y libre del tendón, por eliminación del mismo, se introdujo en N<sub>2</sub> líquido y se conservó a -70°C hasta el momento de la preparación de sus membranas.

## 7. PREPARACIÓN DE MEMBRANAS

El propósito fue la obtención de membranas de: **1)** músculo sóleo, previamente incubado con y sin los péptidos de estudio (M&M, 6) para la determinación de la actividad PI3K, PKB, p70s6k y p44/42 MAPKs, y **2)** músculo *gastrocnemio* e hígado (M&M, 4), que se utilizaron para la determinación de la proteína Glut-4 y Glut-2, respectivamente.

### 7.1. Músculo

Se aplicó el método de Arnold y col [1993], con algunas modificaciones.

#### **Material**

Centrifuga Beckman GS-15R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

#### **Reactivos**

Bacitracina, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU*

EGTA, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU*

Fluoruro de fenilsulfonil metano (PMSF), *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU*

Leupeptina, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU*

β-mercaptoetanol, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU*

MgCl<sub>2</sub>, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU*

Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU*

Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

NaF, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU*

Pepstatina, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU*

2-propanol *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Sacarosa, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU*

Tris HCl, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU*

Triton X-100, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU*

**Medios**

Homogeneización: Sacarosa 250 mM, Tris/HCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, β-mercaptoetanol 50 mM, EGTA 1,2 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 5 mM, NaF 50 mM, bacitracina 30 U/ml, leupeptina 2 μM, pepstatina 2 μM, PMSF 2 mM.

PMSF 20 mM: PMSF 20 mM, 2-propanol 100 ml.

Solubilización: Triton X-100 al 1,25%, en medio de homogeneización.

**Procedimiento**

Las muestras de tejido se homogeneizaron manualmente en 1 ml de medio de solubilización, a 4°C, en un tubo con vástago de teflón. Tras ello, fueron transferidas a tubos Eppendorf, y centrifugadas durante 15 minutos a 15.000 g, a 4°C, recuperando después el sobrenadante. Se separó un pequeño volumen (10 μl) para la determinación de proteínas [Bradford, 1976], y el resto se congeló a -70°C hasta, **1**) la determinación de las distintas actividades enzimáticas por Western blot (PKB, p70s6k, p44/42 MAPKs) o cromatografía en capa fina (PI3K) y **2**) la determinación de la proteína Glut-4, también por Western blot.

**7.2. Hígado**

Se utilizó el método descrito por Weinstein y col [1994], con algunas modificaciones.

**Material**

Centrífuga BECKMAN J-6B, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

Centrífuga BECKMAN XL-80, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

**Reactivos**

Sacarosa, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU*

Tris HCl, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

EGTA, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Fluoruro de fenilsulfonil metano (PMSF), *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Aprotinina (Trasylo<sup>®</sup>) 100.000 UIC/ml, *Bayer, Leverkusen, Alemania.*

Triton X-100, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

**Medios**

PMSF 20 mM: PMSF 20 mM en 2-propanol.

Homogeneización: Sacarosa 250 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), EGTA 1,25 mM, PMSF 1mM y Trasylo<sup>®</sup> 29 UIC.

Solubilización: Triton X-100 al 0,5% (v/v), en medio de homogeneización.

### **Procedimiento**

Todo el proceso se realizó a 4°C. Se trituró 500 mg de tejido (M&M, 4) en 5 ml de medio de homogeneización, en un tubo con vástago de teflón; a continuación, las células intactas, núcleos y mitocondrias se sedimentaron a 9.000 g, durante 10 min. El sobrenadante se decantó y sometió a 100.000 g durante 60 minutos. El nuevo sedimento (crudo de membranas plasmáticas) se resuspendió en medio de solubilización, y se mantuvo durante 15 minutos a 4°C; tras esto, se separó la fracción solubilizada (membranas plasmáticas) a 1.000 g, durante 5 minutos. Un pequeño volumen (10 µl) fue utilizado para la determinación del contenido en proteínas totales [Bradford, 1976], y el resto se conservó a -70°C, hasta la determinación de la proteína Glut-4, por Western blot.

## **8. ACTIVIDAD PI3K**

Se estimó como la fosforilación de PIP<sub>2</sub> a PIP<sub>3</sub>, en inmunoprecipitados de p85 obtenidos por tratamiento de cada preparación de membranas con anti-PI3-quinasa p85 y posterior acoplamiento a Proteína-A-agarosa, y en presencia de ATP y fosfatidilinositol/fosfatidilserina como sustrato. El procedimiento, aparte de la inicial inmunoprecipitación de la fracción p85 de la muestra, incluyó la reacción de ésta con [<sup>32</sup>P] ATP en presencia del sustrato, la extracción de los lípidos formados, la separación de éstos por cromatografía, y la identificación y cuantificación del PIP<sub>3</sub>.

### **8.1. Inmunoprecipitación**

Se realizó en cada muestra de membranas de músculo ya preparada (M&M, 7.1), por reacción de un anticuerpo contra la subunidad reguladora del enzima PI3K –la p85–, y aislamiento posterior del complejo formado, por acoplamiento a Proteína A-agarosa.

#### **Material**

Centrífuga BECKMAN GS-15R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

#### **Reactivos**

Triton X-100, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Tris(hidroximetil) aminometano (Tris-base), *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

NaCl, *Panreac Química S.A., Barcelona, España.*

KCl, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Ácido etilén-diaminotetraacético (EDTA), *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

$\text{LiCl}$ , *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Anti-PI3-Kinase p85 (antisuero de conejo), *Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, EE.UU.*

Proteína A-agarosa, *Boehringer Mannheim, Barcelona, España.*

### **Medios**

Solubilización: descrito en el punto 7.1 de este capítulo.

PBS 1X descrito en el punto 7.1 de este capítulo.

Disolución I: Triton X-100 1%, PBS 1x.

Disolución II: Tris-base 0,1 M, EDTA 1 mM,  $\text{LiCl}$  0,5 mM.

Disolución III: Tris-base 5 mM,  $\text{NaCl}$  100 mM, EDTA 1 mM.

### **Procedimiento**

- 50-100  $\mu\text{g}$  de proteína del preparado de las membranas (M&M, 7.1), ajustada su concentración a 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  con medio de solubilización, en tubo Eppendorf.
- Adición de 10  $\mu\text{l}$  de suero anti-p85, diluido 1:10, por cada ml de disolución de proteína, e incubación a 4°C durante 16 horas.
- Adición de 50  $\mu\text{l}$  de Proteína A-agarosa por ml, e incubación a 4°C durante 2 horas.
- Centrifugación a 15.000 g, a 4°C, 10 segundos, y eliminación del sobrenadante.
- Lavado de los inmunoprecipitados, y en el siguiente orden, con:
  - 1 ml de disolución I. Centrifugación a 15.000 g, a 4°C, 10 segundos. Desechar el sobrenadante.
  - 1 ml de disolución II. Centrifugación a 15.000 g, a 4°C, 10 segundos. Desechar el sobrenadante.
  - 1 ml de disolución III. Centrifugación a 15.000 g, a 4°C, 10 segundos. Desechar el sobrenadante.
- Determinación de la actividad PI3K (formación de  $\text{PIP}_3$ ).

### **8.2. Formación de $\text{PIP}_3$**

Se induce en el inmunoprecipitado p85 de cada muestra (M&M, 8.1), a partir del sustrato fosfatidilinositol/fosfatidilserina añadido, y en presencia de ATP.

#### **Reactivos**

HEPES, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

EDTA, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Fosfatidilinositol, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Fosfatidilserina, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

EGTA, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

ATP, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

[<sup>32</sup>P] ATP (10 μCi/μl), *Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra.*

### **Medios**

Solvente del sustrato (SS): HEPES 25 mM con EDTA 1 mM, en agua.

Sustrato (preparación): 1 mg de fosfatidilinositol/1 ml SS y 1,2 mg fosfatidilserina/1,2 ml SS. Combinar ambas disoluciones a partes iguales (v/v), y sonicar la mezcla hasta que la disolución pase de turbia a translúcida. Proteger de la luz y conservar a 4°C.

Mezcla de reacción: HEPES 12,5 mM, MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O 10 mM, EGTA 0,5 mM, ATP 40 μM, [<sup>32</sup>P] ATP (5 μCi/nmol).

### **Procedimiento**

A cada inmunoprecipitado (M&M, 8.1), se añade 25 μl de sustrato y, tras incorporar un mismo volumen de mezcla de reacción, el conjunto se mantiene a temperatura ambiente durante 20 minutos con agitación periódica. A continuación, se procede a la extracción de los lípidos formados.

### **8.3. Extracción de lípidos**

El fin último es el de la recuperación del PIP<sub>3</sub>, que se consigue por tratamiento de la muestra con un medio orgánico.

#### **Material**

Centrífuga BECKMAN GS-15R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

Sistema evaporador-concentrador Speed Vac Concentrator, *Savant Instrument Inc., Hicksville, NY, EE.UU.*

#### **Reactivos**

Cloroformo, *Scharlau S.A., Barcelona, España.*

Metanol, *Scharlau S.A., Barcelona, España.*

HCl, *Panreac Química S.A., Barcelona, España.*

EDTA, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

#### **Medios**

Cloroformo/metanol/HCl (1/2/1, v/v).

100 mM HCl en metanol.

100 mM en metanol/EDTA 2,5 mM (1/1, v/v).

### **Procedimiento**

- Adición, por el siguiente orden, de:
  - 400 µl de cloroformo/metanol/HCl (1/2/1, v/v)
  - 150 µl de cloroformo
  - 150 µl de HCl 10mM
- Agitación en el vórtex, y centrifugación a 15.000 g, 4°C, durante 30 segundos.
- Recogida de la fase inferior y transferencia a nuevo tubo Eppendorf.
- Adición de 500 µl de metanol-100 mM HCl/EDTA 2,5 mM (1/1, v/v).
- Mezcla y centrifugación a 15.000 g, 4°C, 30 segundos.
- Recogida de la fase inferior, distribución en dos porciones de igual volumen en sendos tubos Eppendorf, y evaporar a sequedad, en un Speed-Vac (aproximadamente 20 minutos).

El extracto obtenido se somete a la separación de sus lípidos.

### **8.4. Separación de lípidos**

Se realizó por cromatografía en capa fina en placa de silicagel, con el fin de aislar, del total de lípidos extraídos (M&M, 8.3), el PIP<sub>3</sub> producido en cada muestra.

#### **Material**

Placa de TLC (20 x 20 cm<sup>2</sup>), *Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra.*

Película fotográfica, Hyperfilm ECL, *Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra.*

Estándar fosfatidilinositol 4 fosfato (PIP<sub>4</sub>), *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Cubeta de cromatografía (24 x 24 x 8 cm<sup>3</sup>), *Teknokroma S. Coop. C. Ltda., Barcelona, España.*

Escáner hp scanjet 7400, *Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA, EE.UU.*

Programa para densitometría. Software Image Quant<sup>®</sup> 3,3, *Molecular Dynamics, EE.UU.*

#### **Reactivos**

Cloroformo, *Scharlau S.A., Barcelona, España.*

1-Propanol, *Scharlau S.A., Barcelona, España.*

Ácido acético, *Scharlau S.A., Barcelona, España.*

Revelador y fijador fotográfico Lx24 y AL4, *Kodak Eastman, Rochester, EE.UU.*

#### **Medios**

De revelado: Lx24, al 20% en agua.

De fijación: AL4, al 20% en agua.

TLC: 1-propanol 66%, ácido acético glacial 2%, agua bidestilada 32% v/v.

### **Procedimiento**

Se prepara el sistema para cromatografía, mediante la colocación, en la cubeta, de una tira de papel de filtro que forra el fondo y dos de las paredes, y su humidificación con 100 ml de medio TLC. A continuación, y a 3 cm del borde de la placa de silicagel, se aplican los extractos de lípidos (30  $\mu$ l) disueltos en cloroformo, y el estándar PIP<sub>4</sub> de referencia de posición, con una separación de 1,5-2 cm entre ellos. La placa se introduce con el extremo de las muestras hacia la base de la cubeta, y así se mantiene mientras que el frente avanza hasta, aproximadamente, 3 cm del extremo superior –4 horas–. Finalizado esto, la placa se deja secar al aire, y se autorradiografía a -70°C (Hyperfilm ECL, Amersham) durante el tiempo que se estime necesario (horas o días). Tras el revelado de la película, se cuantifica la densidad de las bandas mediante densitometría de transmisión, que se expresa en unidades arbitrarias de densidad óptica.

## **9. PKB, p70s6k y p44/42 MAPK: TOTAL Y FOSFORILADA**

La actividad de enzimas incluidas en distintas vías de señalización intracelular (MAPK, PI3K/PKB y PI3K/p70s6k), se estimó, en el músculo esquelético, tratado previamente con los agentes en estudio (M&M, 5 y 6), mediante la determinación de la proporción de la forma activa del enzima –fosforilada– sobre la total, por la técnica de Western blot, en preparados de membranas plasmáticas solubilizadas (M&M, 7.1).

### **9.1. Western blot**

El estudio de la forma total y fosforilada de las distintas enzimas de nuestro interés – en cada muestra de membranas solubilizadas (M&M, 7.1)–, pasó por la previa separación electroforética de proteínas, una posterior transferencia de éstas a membrana de nitrocelulosa, y el tratamiento de la misma con un anticuerpo específico para cada enzima, seguido con el de una antiglobulina acoplada a una enzima que posibilita la generación posterior de quimioluminiscencia, necesaria en el proceso de su detección por autorradiografía.

#### **i) Separación de proteínas**

Se realizó por electroforesis en gel de poliacrilamida [Laemli, 1970].

**Material**

Cubeta Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis System, *Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.*

Fuente de alimentación Mini-PROTEAN 3 Cell PowerPac 300 System, *Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.*

Spacer plates (0,75 mm) Mini PROTEAN 3 System, *Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.*

Short plates, Mini PROTEAN 3 System, *Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.*

**Reactivos**

Glicerol, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Acrilamida, bisacrilamida, N,N,N',N'-Tetra metil-etilendiamida (TEMED) y persulfato de amonio, *Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.*

Tris(hidroximetil) aminometano (Tris-base), *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Ácido etilen-diaminotetraacético (EDTA), *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Dodecil sulfato sódico (SDS), *Ferosa, Barcelona, España.*

$\beta$ -mercaptoetanol, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Glicina, *Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.*

Azul de bromofenol, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

**Medios**

De concentración: Tris-base 0,05 M, SDS 0,1%, EDTA 2 mM, pH 6,7.

De resolución: Tris-base 0,375 M, SDS 0,1%, EDTA 2 mM, pH 8,9.

Tampón de electroforesis: Tris-base 50 mM, glicina 375 mM, SDS 0,1%, EDTA 2 mM.

Tampón de muestra: Tris-base 125 mM, glicerol 20%, SDS 4%, azul bromofenol 0,005%.

$\beta$ -mercaptoetanol 10%.

**Procedimiento**

Una cantidad comprendida entre 15 y 25  $\mu$ g de proteína de membrana (M&M, 7.1), ajustada su concentración con H<sub>2</sub>O a 1 mg/ml, se diluyó 3/1 (v/v) con tampón de muestra, y se mantuvo a 65°C durante 3 minutos antes de ser aplicada al gel de electroforesis. Tras su aplicación (25  $\mu$ l), y durante los primeros 60 minutos, la electroforesis se desarrolló en su tampón a 40 V, que correspondió al paso de la muestra a través del gel de concentración (4% de acrilamida en medio de concentración); a continuación, la intensidad se aumentó a 100 V, y así se sostuvo durante unas dos horas, que fue el tiempo necesario para que la muestra hiciera el recorrido del gel de resolución (8% de acrilamida en medio de resolución). El proceso

se interrumpe cuando el frente de azul de bromofenol, utilizado como marcador de posición, alcanza el extremo opuesto del gel.

## ii) Transferencia

El paso de las proteínas, separadas por electroforesis en gel de acrilamida, a una membrana de nitrocelulosa –para la posterior inmunodetección de los enzimas en estudio–, se realizó eléctricamente.

### **Material**

Fuente de alimentación eléctrica, Mini-PROTEAN 3 Cell PowerPac 300 System, *Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.*

Sistema de transferencia Trans-blot SD, *Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.*

Membrana de nitrocelulosa, *Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.*

Papel de filtro Extra Thick Filter Paper, *Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.*

### **Reactivos**

Tris(hidroximetil) aminometano (Tris-base), *Sigma-Aldrich Corp., MO, St. Louis, EE.UU.*

Glicina, *Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.*

Dodecil sulfato sódico (SDS), *Ferosa, Barcelona, España.*

Metanol, *Scharlau, Barcelona, España.*

### **Medios**

Medio de transferencia: Tris-base 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20%, SDS 0,0375%.

## **Procedimiento**

Por un lado, el gel de poliacrilamida procedente de la separación de proteínas, se mantiene durante 30 minutos en medio de transferencia; por otro, la membrana de nitrocelulosa, y dos papeles de filtro de igual tamaño que el gel, se empapan en el mismo medio. Después, sobre el electrodo positivo del sistema, se sitúa uno de los papeles de filtro, encima, la membrana de nitrocelulosa, sobre ésta, el gel y, por último, el segundo papel de filtro. La transferencia se desarrolla a 10 V durante 1 hora (la duración y el voltaje adecuados han de ser determinados previamente), y una vez finalizada, la membrana de nitrocelulosa se somete a inmunodetección y cuantificación de los enzimas a estudiar en cada caso.

## iii) Inmunodetección

Este proceso se realizó según las indicaciones que acompañan los reactivos para Western blot, proporcionados por Amersham Life Science.

### **Material**

Película fotográfica, Hyperfilm ECL, *Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra.*

Escáner hp scanjet 7400, *Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA, EE.UU.*

Programa para determinación de densidades ópticas, Software Image Quant<sup>®</sup> 3,3, *Molecular Dynamics, EE.UU.*

### **Reactivos**

Tris (hidroximetil) aminometano (Tris-base), *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

NaCl, *Panreac Química S.A., Barcelona, España.*

Tween-20, *Difco Laboratories, West Molesey, Surrey, Inglaterra.*

Leche desnatada en polvo, *Molico Sveltesse, Sociedad Nestlé, Barcelona, España.*

Sueros específicos anti-Akt/PKB total y fosforilada, anti-p42/44 MAPK total y fosforilada, anti-p70s6k total y fosforilada, *Cell Signalling Technology, New England Biolabs, EE.UU.*

Suero anti-IgG de conejo, unido a peroxidasa de rábano picante, *Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra.*

ECL Western Blotting Reagents, reactivos quimioluminiscentes, *Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra.*

Revelador y fijador fotográfico, Lx24 y AL4, *Kodak Eastman, Rochester, EE.UU.*

### **Medios**

De revelado: Lx24, al 20% en agua.

De fijación: AL4, al 20% en agua.

T-TBS: Tween-20 0,1%, Tris-base 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5.

TBS-LD: Tris-base 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5, 5% de leche desnatada.

### **Procedimiento**

La membrana de nitrocelulosa, con las proteínas transferidas, se mantuvo en TBS-LD durante 1 hora, a temperatura ambiente; tras lavado con T-TBS, la membrana se incubó a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo específico, a la dilución de 1:1.000 en T-TBS en todos los casos. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBS-LD, y se procedió a su tratamiento con anti-IgG de conejo, 1:1.000 en T-TBS, durante 1 hora. Una vez concluido el tiempo de incubación con este segundo anticuerpo, la membrana se lavó de nuevo con T-TBS (no menos de 45 minutos); finalmente, se trató durante 1 minuto con los reactivos quimioluminiscentes, procediendo después a su autorradiografía, por exposición de entre 5 y 60 minutos a una película fotográfica. Tras el revelado de la película, se cuantificó la densidad de

las bandas por densitometría de transmisión, que se expresa en unidades arbitrarias de densidad óptica.

## 10. ESTUDIO DE UNIÓN AL MÚSCULO ESQUELÉTICO

Si bien se han realizado esfuerzos por localizar receptores específicos para Ex-4 en distintos tejidos del hombre y otros mamíferos, no se ha podido confirmar su existencia hasta la fecha. En este trabajo, se ha hecho competir Ex-4 con la máxima unión de [mono-<sup>125</sup>I]GLP-1 a su receptor de membrana en el músculo esquelético, siguiendo básicamente un protocolo estandarizado y descrito en nuestro laboratorio [Delgado y col., 1995] para la localización y caracterización de receptores para GLP-1 en el músculo de rata.

### 10.1. <sup>125</sup>I-GLP-1

Se preparó [mono-<sup>125</sup>I]GLP-1 por el método de la cloramina T, haciendo reaccionar, a 25°C, 5 µg de GLP-1 junto con 29,6 MBq, con 4-8 µg de cloramina T, en un volumen total de 48 µl de 0,3 M fosfato, a pH 4,7, durante 10-20 segundos. La purificación del producto y separación de la fracción mono yodada, se realizó por HPLC en fase reversa, en una columna µBondapack C18, con un gradiente lineal de 28-49% acetonitrilo en 0,1% ácido trifluoroacético.

### 10.2. Protocolo de unión

Se realizó en 60 µg de proteína de membrana plasmática solubilizadas de músculo esquelético (M&M, 3 y 7), que se hicieron reaccionar con  $3 \times 10^{-11}$  M <sup>125</sup>I-GLP-1, durante 40 minutos a 37°C, en ausencia y presencia de  $10^{-10}$  –  $10^{-6}$  M de Ex-4, o GLP-1 como control, en 100 µl de HEPES 50 mM, pH 7,4, con 10 mM de sulfato de magnesio, 2 % BSA, 0,1 % de bacitracina y 500 UIC/ml de Trasylol. La reacción se interrumpió por adición de gamma-globulina humana al 0,1 % y 500 µl de polietilenglicol a la concentración final del 12,5 %. El péptido unido a membrana se separó por sedimentación a 12.000 g, y su contenido en radioactividad se estimó en un contador gamma.

## 11. EXPRESIÓN DE GLUCOTRANSPORTADORES

Se analizó la del Glut-2 y Glut-4 (proteína y ARNm), en el hígado y músculo, respectivamente. El análisis de ARNm se realizó, finalmente, mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RCP-TR), y el de la proteína, por Western blot.

### 11.1. ARNm

El protocolo fue común para las muestras de hígado y músculo (M&M, 4), e incluyó, por este orden, el aislamiento del ARN total y su cuantificación, la síntesis de ADN complementario (ADNc), y la determinación, con sondas específicas marcadas con un fluorocromo, de la cantidad relativa de ARNm del Glut-2 y Glut-4.

#### i) Aislamiento de ARN

Se extrajo con TRI REAGENT™, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

##### **Material**

Centrífuga BECKMAN GS-15R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

Centrífuga BECKMAN J-6B, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

##### **Reactivos**

TRI REAGENT™, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Cloroformo, *Scharlau S.A., Barcelona, España.*

Isopropanol. *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Etanol, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Dietil pirocarbonato (DEPC), *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

##### **Medios**

Etanol al 75% en agua destilada.

Agua-DEPC, DEPC 0,1% en agua destilada. El DEPC se deja agitando durante toda la noche a temperatura ambiente.

##### **Procedimiento**

Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad, con el fin de evitar contaminaciones con ARNasas. De los tejidos de estudio (M&M, 4), se homogeneizaron 500 µg en 5 ml de TRI REAGENT™, y a continuación se sedimentó el material extracelular a 12.000 g, durante 10 minutos a 4°C, para su deshecho. El sobrenadante, que se distribuyó en fracciones de 1 ml, y se dejó reposar 5 minutos a

temperatura ambiente, para asegurar la disociación de los complejos núcleo-proteicos. Tras ello, y a cada fracción, se añadieron 0,2 ml de cloroformo, se mezcló con ayuda de vórtex durante 15 segundos, y se dejó reposar a temperatura ambiente entre 2-15 minutos. A continuación, se centrifugó a 12.000 g, 15 minutos, con lo que se produce el fraccionamiento de la mezcla en tres fases, de las cuales, se recogió la acuosa (superior), que contiene el ARN. Ésta se pasó a otro tubo, en el que se añadió 0,5 ml de isopropanol; tras mezclar suavemente, se dejó reposar durante 5-10 minutos, y se sometió a 12.000 g, durante 10 minutos a 4°C. El sedimento (ARN), tras lavado con etanol al 75% y centrifugación (7.500 g, 5 minutos a 4°C), se dejó secar a temperatura ambiente. Por último, el ARN obtenido se disolvió en agua-DEPC –50 µl en el caso del músculo y en 100 µl en el del hígado–. Una porción de 10 µl se utilizó para la valoración de la concentración en ARN, que se cuantificó espectrofotométricamente a 260/280 nm. El grado de pureza de la muestra, se estimó por la relación de lecturas  $DO_{260}/DO_{280}$ , considerándose óptimo un resultado comprendido entre 1,7 y 2.

## ii) Síntesis de ADNc

A partir del ARN extraído (1µg), se sintetizó una copia de ADNc por transcripción reversa. Para ello, se utilizó un preparado comercial (*High-Capacity cDNA Archive Kit*), y se siguieron las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

### **Material**

Termociclador, *PTC-100*, MJ Research

### **Reactivos**

High-Capacity cDNA Archive Kit: 10X RT Buffer, 25X dNTPs, 10X RP, Enzima Multiscribe™ Reverse Transcriptasa, *Applied Biosystems 94404 USA*

### **Medios**

RT: 2 µl de 10X RT Buffer, 0,8 µl de 25X dNTPs, 2 µl de 10X RP, 1 µl de Enzima Multiscribe™ Reverse Transcriptasa y 3,2 µl de agua-DEPC

### **Procedimiento**

Se mezcla, suavemente, 1µg de ARN disuelto en 25 µl de agua-DEPC, con 25µl de medio RT, y se somete a tres incubaciones en el termociclador, en el siguiente orden: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C y 2 minutos a 95°C. El ADNc obtenido (1µg/50µl) se conserva a -20°C hasta continuar con el proceso de RCP-TR.

### iii) Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

Con esta técnica, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea. Además, la fluorescencia emitida durante la amplificación indica la cantidad de ADN sintetizado en cada momento e, indirectamente, la de ARNm de la muestra.

Las sondas utilizadas, específicas de los glucotransportadores, están marcadas con un fluorocromo donador en el extremo 5' y con otro aceptor en el 3', de tal manera que, mientras permanezcan próximos, el fluorocromo en 3' absorbe la emisión del primero. Sin embargo, tras la hibridación de las sondas con la cadena de ADNc, durante la amplificación, la actividad 5' exonucleasa de Taq (polimerasa de *Thermus aquaticus*) hidroliza el extremo 5' de la sonda, y se produce la fluorescencia que es detectada por el lector.

#### **Material**

Micro Amp™, placa óptica 96 pocillos, *Applied Biosystems 94404 USA*

Sequence Detection System, Abi Prism 7000, *Applied Biosystems 94404 USA*

#### **Reactivos**

TaqMan Universal PCR Master Mix, *Applied Biosystems 94404 USA*

TaqMan® Gene Expression Assays: Sonda GLUT -4 y GLUT-2, de rata, marcados con fluorocromo FAM y 18s eucariota, marcado con fluorocromo VIC, *Applied Biosystems 94404 USA*

#### **Procedimiento**

La reacción de amplificación se realizó en 2 µl de ADNc (M&M, 11.1) y en un volumen final de 20 µl con los cebadores del sistema *Assays on Demand* y los reactivos *TaqMan Universal PCR Master Mix*, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Cada muestra fue analizada por triplicado, y la media se utilizó para el cálculo de la expresión de ARNm. La cantidad de ARNm del gen de interés se normalizó con la de ARN ribosómico 18s (por el método de comparación del valor de  $2^{-\Delta CT}$ ), que fue considerado como el control endógeno. Además, para evitar errores de manipulación, ambas sondas, la del glucotransportador y la del control endógeno, se hibridaron en el mismo pocillo.

## 11.2. Proteína

El procedimiento fue básicamente el descrito por nuestro laboratorio [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001]. Aquí también, el análisis del contenido en proteína Glut-2 y Glut-4 de las membranas celulares aisladas de hígado y músculo esquelético (M&M, 4 y 7), se llevó a cabo por la técnica de Western blot, ya descrita en detalle en el apartado 9.1 de este capítulo. En este caso, se utilizó un anticuerpo específico para cada transportador (*E. Merck, Alemania*); además, para la normalización los resultados, se midió, en paralelo, el contenido en tubulina por inmunodetección de los geles con un suero anti- $\alpha$ -tubulina, basándonos en la premisa de que su valor permanece constante en la membrana, en cualquier condición.

## 12. TRANSPORTE DE GLUCOSA

Se midió como incorporación de 2-deoxi-D-[1,2  $^3\text{H}$  (N)] glucosa al interior de la célula. Como marcador de acumulación de glucosa extracelular, se utilizó sorbitol uniformemente marcado con  $^{14}\text{C}$ , según el método descrito por Dohm y col. [1988], con algunas modificaciones.

### **Material**

Contador de radiación beta BECKMAN LS 6000TA, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

### **Reactivos**

$\text{CaCl}_2$ , *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

$\text{CH}_3\text{COCOONa}$ , *ICN Biomedicals Inc. Aurora, Ohio, EEUU.*

2-deoxi-D- glucosa, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

2-deoxi-D-[1,2  $^3\text{H}$  (N)] glucosa, *Moravek Biochemicals, Brea, California, EE.UU.*

HEPES, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

KCl, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Líquido de centelleo ULTIMA GOLD, *Groninger, Holanda.*

$\text{MgSO}_4$ , *Panreac Química S.A., Barcelona, España.*

$\text{NaCl}$ , *Panreac Química S.A., Barcelona, España.*

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

$\text{NaOH}$ , *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Sorbitol [ $^{14}\text{C}$  (U)], *American Radiolabeled Chemicals, Inc., St Louis, MO, EE.UU.*

Sorbitol, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

**Medios**

KRB-HEPES (KH): HEPES 20 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, NaCl 120 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, KCl 2,5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, CH<sub>3</sub>COCOONa 1 mM, pH 7,45.

NaOH 0,5 N.

Mezcla radioactiva: 30 µl medio KH, con 2-deoxi-D-glucosa 0,5 M, sorbitol 2 M, 2-deoxi-D-[1,2 <sup>3</sup>H (N)] glucosa 0,6 µCi, sorbitol [<sup>14</sup>C (U)] 0,3 µCi, para una muestra.

**Procedimiento**

El músculo *sóleo* aislado (M&M, 3 y 4) se mantuvo, inicialmente, y para su estabilización, en 3 ml de medio KH a 37°C durante 25 minutos, con atmósfera de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> (5/95%). Transcurrido este tiempo, las muestras se incubaron durante 30 minutos sin o con los péptidos de estudio (10<sup>-9</sup>–10<sup>-8</sup> M); tras ello, se añadió 30 µl de mezcla radioactiva (150 nmoles [3H] 2DOG –Ac esp. 40 nCi/µ– y 600 nmoles [<sup>14</sup>C] sorbitol –Ac esp. 5 nCi/µ–), y se mantuvo la incubación durante otros 60 minutos. Al finalizar, se recuperó el músculo del vial, se adsorbió su humedad externa con una gasa, y se lavó dos veces en medio KH a 4°C, a intervalos de 5 minutos, para eliminar el total de radioactividad extratisular. Tras los lavados, la muestra se introdujo en 1 ml de NaOH 0,5 N, y se mantuvo a 70°C hasta la disolución completa del tejido; de ello, se recogió un pequeño volumen (10 µl) para la determinación de su contenido en proteínas [Bradford, 1976]; al resto, se añadió 5 ml de líquido de centelleo, para la medida, a doble canal (<sup>14</sup>C y <sup>3</sup>H), de su contenido en radioactividad en un contador de radiación beta. Como referencia del total radioactivo de cada isótopo, se preparó e incluyó en el contaje (CTS) 30 µl de mezcla radioactiva 1:100, que contenía 6 nCi [<sup>3</sup>H] 2DOG + 3 nCi [<sup>14</sup>C] sorbitol. Cuando el propósito fue el estudiar la acción del bloqueo de la actividad de algunos enzimas intracelulares sobre el efecto de la Ex-4, los distintos agentes inhibidores se añadieron a los 10 minutos de iniciar la estabilización de la muestra, continuándose el resto del proceso de la forma anteriormente descrita.

**Cálculo**

Se basó en la premisa de que la cantidad de glucosa extracelular no está en función del estímulo, sino tan sólo de la cantidad –proteína– de tejido.

Al finalizar cada experimento, se dispone de la siguiente información:

—————  
 .....  
 ———

**CTS<sub>dpm</sub> 2DOG=6 nCi [<sup>3</sup>H] 2DOG=150 nmoles 2DOG**

**CTS<sub>dpm</sub> sorbitol=3 nCi [<sup>14</sup>C] sorbitol=600 nmoles sorbitol**

**Ad<sub>dpm</sub> MP (Muestra Problema):** [<sup>14</sup>C] dpm, que es el contenido extracelular de sorbitol, y que proporcionará el contenido equivalente de [<sup>3</sup>H] 2DOG extracelular.

**Bd<sub>dpm</sub> MP (Muestra Problema):** [<sup>3</sup>H] dpm totales, que es el contenido intra + extra celular de 2DOG.

**P<sub>mg</sub>:** media del contenido en proteínas (mg) de todas las muestras del experimento.

—————  
 .....  
 ———

Inicialmente, se calcula la cantidad absoluta de 2DOG total (extra + intracelular) y la de sorbitol –que será siempre extracelular–, en cada muestra:

$$A \text{ MP}_{nmol} = \frac{A \text{ MP}_{dpm} \times 600 \text{ nmol}}{\text{CTS sorbitol}_{dpm}} \quad B \text{ MP}_{nmol/Pmg} = \frac{B_{dpm}/P_{mg} \times 150 \text{ nmoles}}{\text{CTS 2DOG}_{dpm}}$$

Y teniendo en cuenta que por cada 600 nmoles de sorbitol en la mezcla, hay 150 nmoles de 2DOG:  $B \text{ MP}_{nmol} = 0,25 \times A \text{ MP}_{nmol}$

Como los nmoles de 2DOG intracelular/mg proteína hay que expresarlos finalmente por minuto (60 minutos en este protocolo), la fórmula a aplicar, para cada muestra, fue la siguiente:

$$2\text{DOG}_{intracelular} \text{ (nmol/mg/min)} = \frac{\frac{B_{dpm}/P_{mg} \times 150 \text{ nmol}}{\text{CTS 2DOG}_{dpm}} - 0,25 \times \frac{A_{dpm} \times 600 \text{ nmol}}{\text{CTS Sorbitol}_{dpm} \times P_{mg}}}{60 \text{ minutos}}$$

### 13. OXIDACIÓN Y UTILIZACIÓN DE GLUCOSA

Se midió, en cada muestra, y simultáneamente, la producción de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> y, la formación de piruvato marcado con <sup>14</sup>C, en músculo *sóleo* (M&M, 3) incubado con Ex-4, en presencia de D-[U<sup>14</sup>C]glucosa.

### 13.1. Producción de $^{14}\text{CO}_2$

Se analizó el  $^{14}\text{CO}_2$  liberado durante el catabolismo de la D-[U $^{14}\text{C}$ ] glucosa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Para su determinación, se utilizó el método descrito por Giroix y col. [1984].

#### **Material**

Contador de radiación beta BECKMAN LS 6000TA, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

#### **Reactivos**

Albúmina bovina, Fracción V (BSA), *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

$\text{CaCl}_2$ , *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

D-glucosa anhidra, *E. Merck, Darmstadt, Alemania*

D-[U $^{14}\text{C}$ ] glucosa, *Moravek Biochemicals, Brea, California, EE.UU.*

HCl, *Panreac Química S.A., Barcelona, España.*

KCl, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Líquido de centelleo ULTIMA GOLD, *Groninger, Holanda.*

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

NaCl al 0,9% (Salino), *B. Braun Medical S.A., Barcelona, España.*

NaCl, *Panreac Química S.A., Barcelona, España.*

$\text{NaHCO}_3$ , *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

NaOH, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

#### **Medios**

Medio de incubación (MI): D-glucosa 10mM, D-[U $^{14}\text{C}$ ] glucosa (1 $\mu\text{Ci/ml}$ ), NaCl 118 mM, KCl 4,75 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,18 mM,  $\text{MgSO}_4$  1,18 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM y  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM, pH 7,4.

NaOH 2M.

#### **Procedimiento**

El músculo *sóleo*, aislado (M&M, 3) y pesado, se introdujo en un vial con 3 ml de MI. De cada rata, uno de los músculos se utilizó como control, incubado sólo con MI, y al otro se le añadió Ex-4. El vial contenía, además, un tubo fuera de contacto con el MI. Los viales, sellados con tapones de silicona, se incubaron durante 90 minutos [los 5 primeros con atmósfera de  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  (5/95%)] a 37°C. A continuación, sin abrir el vial, se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de HCl 1M al MI para la interrupción de la reacción, y 500  $\mu\text{l}$  de NaOH 2M al tubo en el interior del vial, para la recogida del  $^{14}\text{CO}_2$  producido durante

la incubación. Los viales se mantuvieron a temperatura ambiente con agitación durante 60 minutos; pasado este tiempo, se recuperó el tubo del vial, con precaución para evitar contaminación con el MI, y se llevó a un vial de contaje, al que se añadió 5ml de líquido de centelleo, para la medida, en el contador de radiación beta, de la cantidad de  $^{14}\text{CO}_2$ . Del MI, se tomó 1ml, que se conservó a  $-20^\circ\text{C}$ , hasta el análisis de su contenido en piruvato.

### 13.2. Medida de piruvato

El piruvato es un producto intermedio del catabolismo de la glucosa, que atraviesa la membrana mitocondrial y se transforma en acetil-CoA, en un proceso altamente regulado por la piruvato deshidrogenasa, cuya actividad se modula por la situación energética de la célula. Para la determinación del piruvato marcado, se empleó el método descrito por Giroix y col., [1984].

#### **Material**

Columnas de cromatografía de vidrio (4 mm de diámetro x 150 mm de alto)

Fibra de vidrio siliconizada

Contador de radiación beta BECKMAN LS 6000TA, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

#### **Reactivos**

Resina DOWEX 1X8-400, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU*

NaCl, *Panreac Química S.A., Barcelona, España*

Líquido de centelleo ULTIMA GOLD, *Groninger, Holanda*

#### **Medios**

Suspensión AG1x8: 250 gr Resina DOWEX 1X8-400 en 500 ml HCl 2,4 M, en agitación durante 60 minutos y después lavada 5 veces con agua destilada. Se conserva a  $4^\circ\text{C}$ , y durante 20 minutos antes de ser utilizada, se agita a temperatura ambiente.

NaCl 150 mM

#### **Procedimiento**

Se prepararon las columnas, selladas por el extremo inferior con fibra de vidrio, con 1 ml de la suspensión AG1x8 –una por muestra–. A continuación, se hizo pasar por la columna 0,8 ml del MI de cada muestra (M&M, 13.1); tras ello, la columna se lavó 5 veces con 1 ml de agua destilada para la eliminación de moléculas no deseadas. El piruvato se eluyó con 3 ml de NaCl 150 mM, que se recogieron en un vial con 5 ml de líquido de centelleo, para la medida de su contenido en radiación  $\beta$ .

## 14. MEDIDA DE CONTENIDO EN GLUCÓGENO

Se analizó mediante el método de detección con antrona, según Hassid y Abraham [1957], con algunas modificaciones.

### **Material**

Centrífuga BECKMAN GS-6R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

Espectrofotómetro SPECTRONIC 1201, *Milton Roy, NY, EE.UU.*

### **Reactivos**

Etanol, *Scharlau, Ferosa, Barcelona, España.*

KOH, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Ácido sulfúrico, *Panreac Quimica S.A., Barcelona, España.*

Antrona (C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>O), *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Ácido benzoico, *Merck, Darmstadt, Alemania.*

Kit de determinación de proteínas, *Bio-Rad Laboratories, Munich, Alemania.*

Glucógeno, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

### **Medios**

Disolución de antrona: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12 M, antrona 7 mM.

### **Procedimiento**

Una porción del hígado de la rata –100 mg– (M&M, 4) se disgregó en 1 ml de KOH al 30%, y se mantuvo, a 70°C, con agitación, durante 10 minutos, en un baño; tras su disolución, se recogió una fracción (10 µl) para la determinación de proteínas totales [Bradford, 1976]. El glucógeno contenido en el resto, se precipitó con etanol al 66% durante 15 minutos a 4°C, y se separó por centrifugación –2.500 rpm, 10 minutos–. El sobrenadante se descartó, y en el sedimento, disuelto en 1 ml de agua, se midió, frente a una curva patrón, la concentración de glucógeno a 620 nm.

## 15. MEDIDA DE INSULINA PLASMÁTICA

Se determinó por radio inmunoanálisis, utilizando <sup>125</sup>I-Insulina como trazador radiactivo, un suero anti-insulina porcina producido en cobaya (ambos desarrollados en nuestro laboratorio), e insulina de rata como estándar de referencia. La separación del complejo antígeno-anticuerpo del antígeno libre se realizó por tratamiento con una mezcla de carbón-dextrano [Herbert y col 1965]. El procedimiento de análisis fue exactamente el previamente descrito por nuestro laboratorio [Valverde y col., 1988].

## 16. ACTIVIDAD GLUCÓGENO SINTASA *a*

Se estudió en el músculo sóleo (M&M, 3), en presencia de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> –activador de la glucógeno sintasa *a* (activa) e inhibidor de la forma *b* [De Wulf y Hers, 1968]– y de NaF – inhibidor de la glucógeno sintasa fosfatasa [De Wulf y Hers, 1968]–. La actividad glucógeno sintasa *a* (GSa) se midió como incorporación de UDP-[<sup>14</sup>C] D-glucosa en glucógeno, según el método descrito por Hue y col. [Hue y col, 1975], con algunas modificaciones.

### **Material**

Centrífuga BECKMAN GS-6R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

Contador de radiación beta BECKMAN LS 6000TA, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

### **Reactivos**

Albúmina bovina, Fracción V (BSA), *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

CaCl<sub>2</sub>, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

D-glucosa anhidra, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

EDTA, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Etanol, *Normasolv, Ferosa, Barcelona, España.*

FNa, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Glicilglicina, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Glucógeno, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

KCl, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

KOH, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Líquido de centelleo ULTIMA GOLD, *Groninger, Holanda.*

MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub> O, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

NaCl, *Panreac Química S.A., Barcelona, España.*

NaHCO<sub>3</sub>, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

UDP-[U-<sup>14</sup>C]D-glucosa, *American Radiolabeled Chemicals, Inc., St Louis, MO, EE.UU.*

UDP-D-glucosa, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

### **Medios**

KRB: NaCl 118 mM, KCl 4,75 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,18 mM NaHCO<sub>3</sub> 25 mM y CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, pH 7,4.

Homogeneización (MH): FNa 100 mM, glucógeno al 0,5 %, glicilglicina 50 mM, EDTA 35 mM, pH 7,4.

Incubación (MI): UDP-D-glucosa 0,3 mM, glucógeno 1,2%, glicilglicina 72 mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12 mM, UDP-[<sup>14</sup>C]-D-glucosa 0,3 μM, pH 7,4.

### **Procedimiento**

Los músculos sóleos aislados (M&M, 3) se incubaron en 3 ml de KRB con 5 mM de glucosa y 1% de BSA, a 37°C durante una hora. A continuación, las muestras de músculo se incubaron durante 10 minutos a 37°C en ausencia (control) o presencia adicional de Ex-4; tras ello, se sacaron del vial, se adsorbió su exceso de humedad con una gasa, y se recuperó el músculo sin tendón, que se conservó en N<sub>2</sub> líquido hasta su utilización. El músculo se homogeneizó en 500 μl de MH, en un tubo con vástago de teflón, a 4°C; a continuación, la muestra se centrifugó a 228 g durante 15 minutos, y del sobrenadante se recogió un pequeño volumen (10 μl) para la determinación de su contenido en proteínas [Bradford, 1976]; el resto se conservó a -70 °C hasta su utilización.

Para la determinación de la actividad GSa, la cual se analizó al menos por duplicado en cada músculo, se tomaron 20 μl del sobrenadante anterior, que se añadieron a 100 μl de MI. Tras 15 minutos a 20°C, se añadió, para interrumpir la reacción y disolución total de proteínas celulares, 200 μl de KOH 0,5 N. El glucógeno formado se extrajo del solubilizado anterior, según describe Fleig y col., [Fleig y col., 1984], con etanol al 66%; el contenido en radiactividad de cada extracto se midió en 5 ml de líquido de centelleo, en un contador de radiación beta.

## **17. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

Los resultados se han expresado como media ± el error estándar de la media (EEM), junto con el número de observaciones (n). La significación estadística ( $p < 0,05$ ) de los incrementos fue valorada por el test de la *t* de Student, o por análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del *Least Significant Differences* (LSD) test para comparación múltiple *post-hoc*, mediante el programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS).

# RESULTADOS

## 1. EFECTOS DE LAS EXENDINAS SOBRE EL TRANSPORTE DE GLUCOSA, EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LA RATA NORMAL

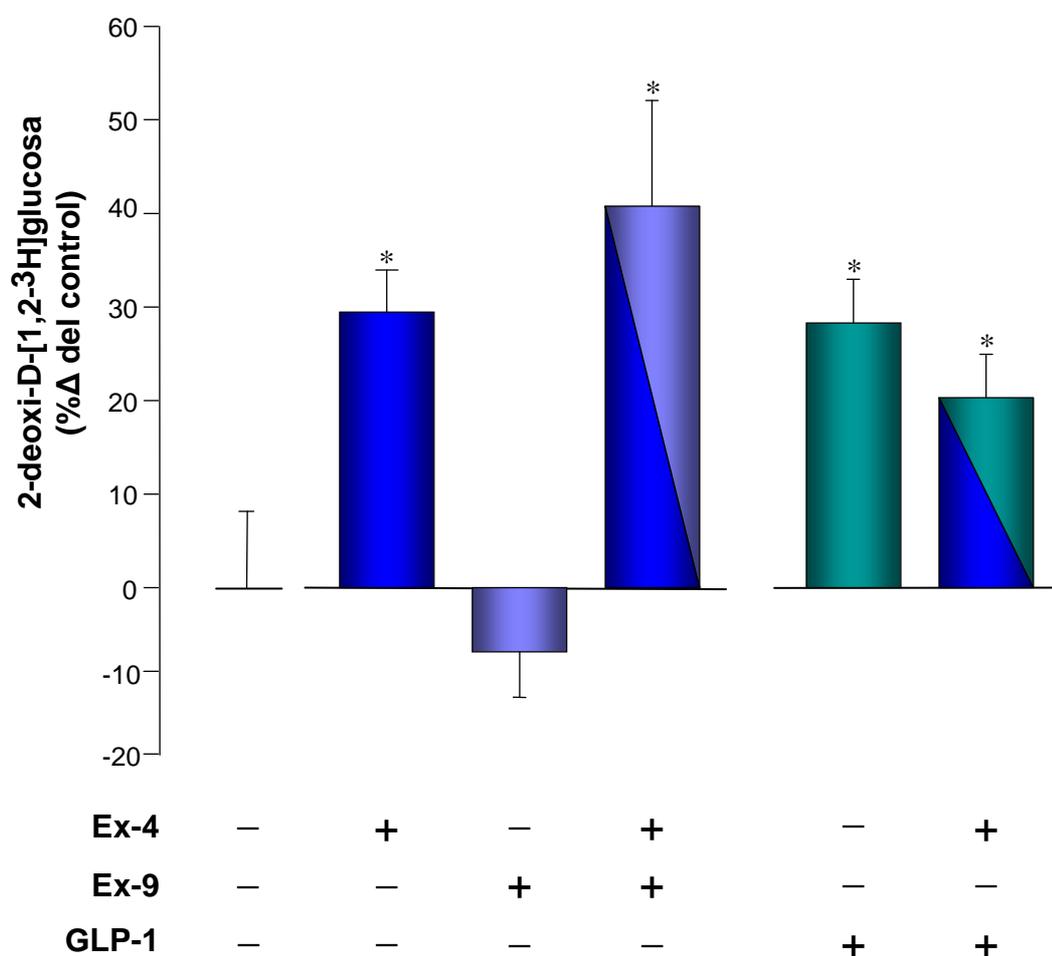
En la **figura 5** está representado el efecto de la Ex-4 y Ex-9, a  $10^{-9}$  M, en relación al del GLP-1  $10^{-8}$  M, sobre la captación de glucosa por el músculo esquelético de la rata normal. Los resultados están expresados en porcentaje de incremento sobre el valor medio control ( $0,425 \pm 0,025$  nmoles de glucosa/mg por min,  $n=73$ ), obtenido en un músculo del animal, incubado en ausencia de péptido.

La Ex-4 estimuló el transporte de glucosa, proporcionando un incremento ( $29 \pm 5\% \Delta$  del control,  $p < 0,05$ ,  $n=13$ ) similar al obtenido previamente con GLP-1 [Acitores y col., 2005]; cuando el músculo de un grupo de ratas se incubó simultáneamente con Ex-4 y GLP-1, el incremento sobre el control ( $20 \pm 3\% \Delta$  del control,  $n=7$ ) no fue distinto del obtenido por cada uno de los dos péptidos individualmente. La Ex-9 no tuvo efecto ( $-8 \pm 5\% \Delta$  del control,  $n=14$ ) ni tampoco modificó el de la Ex-4, cuando ambas, combinadas, estaban presentes en el medio de incubación (Ex-4 + Ex-9:  $41 \pm 11\% \Delta$  del control,  $n=6$ ,  $p < 0,05$ ).

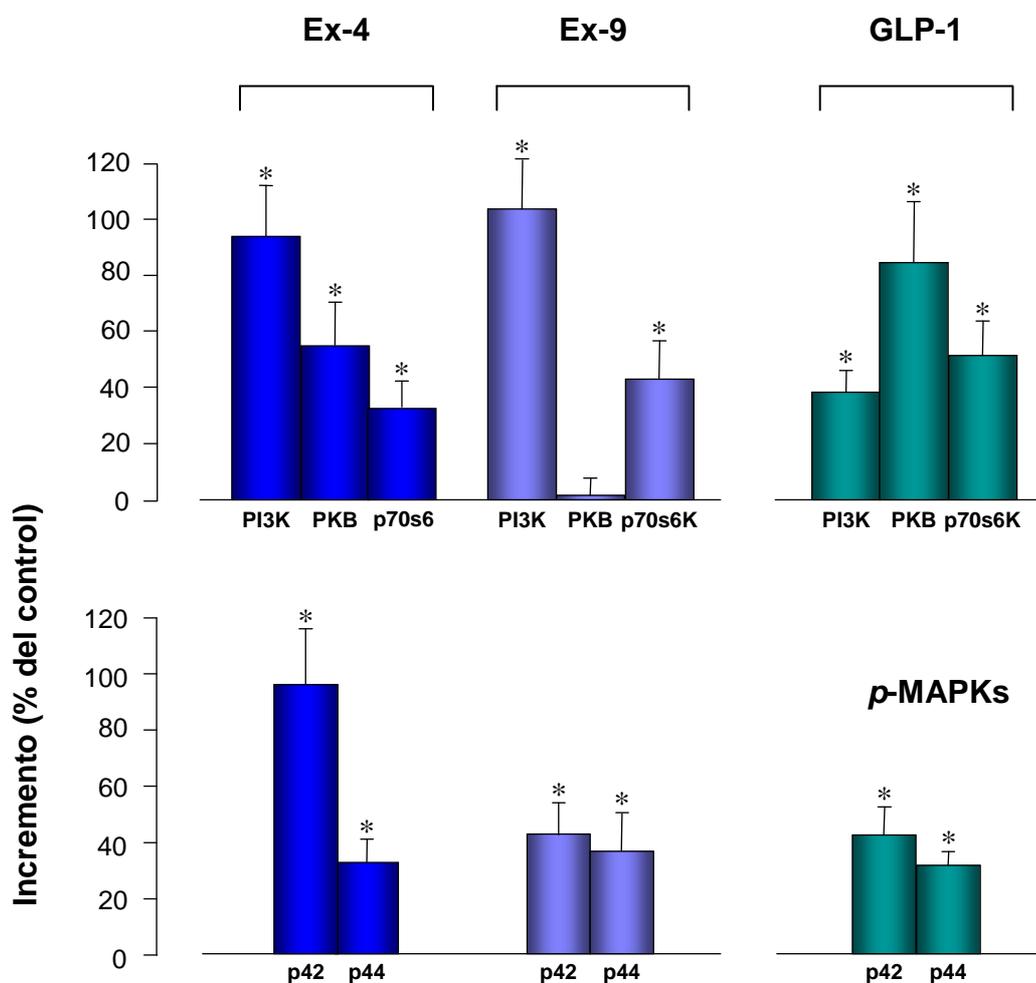
## 2. EFECTOS DE LAS EXENDINAS SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR

Con el fin de identificar posibles alteraciones que pudieran justificar la falta de efecto de la Ex-9 sobre el transporte de glucosa en el músculo de la rata, analizamos la acción de ésta, en relación a la de la Ex-4, sobre enzimas implicados en los mecanismos de señalización de la insulina y del GLP-1.

La Ex-4 (**Fig. 6**) estimuló la actividad PI3K ( $92 \pm 18\% \Delta$  control,  $n=5$ ,  $p < 0,02$ ), PKB ( $53 \pm 15\% \Delta$  control,  $n=4$ ,  $p < 0,05$ ), p70s6k ( $32 \pm 9\% \Delta$  control,  $n=4$ ,  $p < 0,05$ ), p42 MAPKs ( $94 \pm 30\% \Delta$  control,  $n=3$ ,  $p < 0,05$ ) y p44 MAPKs ( $42 \pm 30\% \Delta$  control,  $n=4$ ,  $p < 0,05$ ), en magnitud similar, cada una de ellas, a lo observado previamente con GLP-1 [Acitores y col., 2004]. La Ex-9 también incrementó la formación de PIP<sub>3</sub> ( $103 \pm 22\% \Delta$  control,  $n=3$ ,  $p < 0,05$ ) y la actividad p70s6k ( $42 \pm 13\% \Delta$  control,  $n=4$ ,  $p < 0,05$ ), p42 MAPK



**Figura 5.** Efecto de la Ex-4 ■ y Ex-9 ■  $10^{-9}$  M, en relación al del GLP-1 ■  $10^{-8}$  M, sobre el transporte de glucosa en el músculo esquelético de la rata normal, durante 60 minutos. Los resultados (media  $\pm$  EEM), correspondientes a 6-14 experimentos individuales, están expresados en porcentaje de incremento del valor control (n=73), obtenido en uno de los músculos de cada animal, incubado en ausencia de hormona/péptido.\*  $p < 0,05$  vs control.



**Figura 6.** Efecto de las exendinas, en relación con el del GLP-1 como referencia, sobre la actividad PI3K –formación de  $PIP_3$ –, PKB, p70s6k y p42/44 MAPK –proporción fosforilada de la total–, en el músculo esquelético de la rata normal, durante 3 minutos. Los resultados (media $\pm$ EEM), correspondientes a cuatro experimentos individuales, están expresados en porcentaje de incremento del valor control, obtenido en uno de los músculos de cada animal, incubado en ausencia de hormona/péptido. \*  $p < 0,05$  vs control.

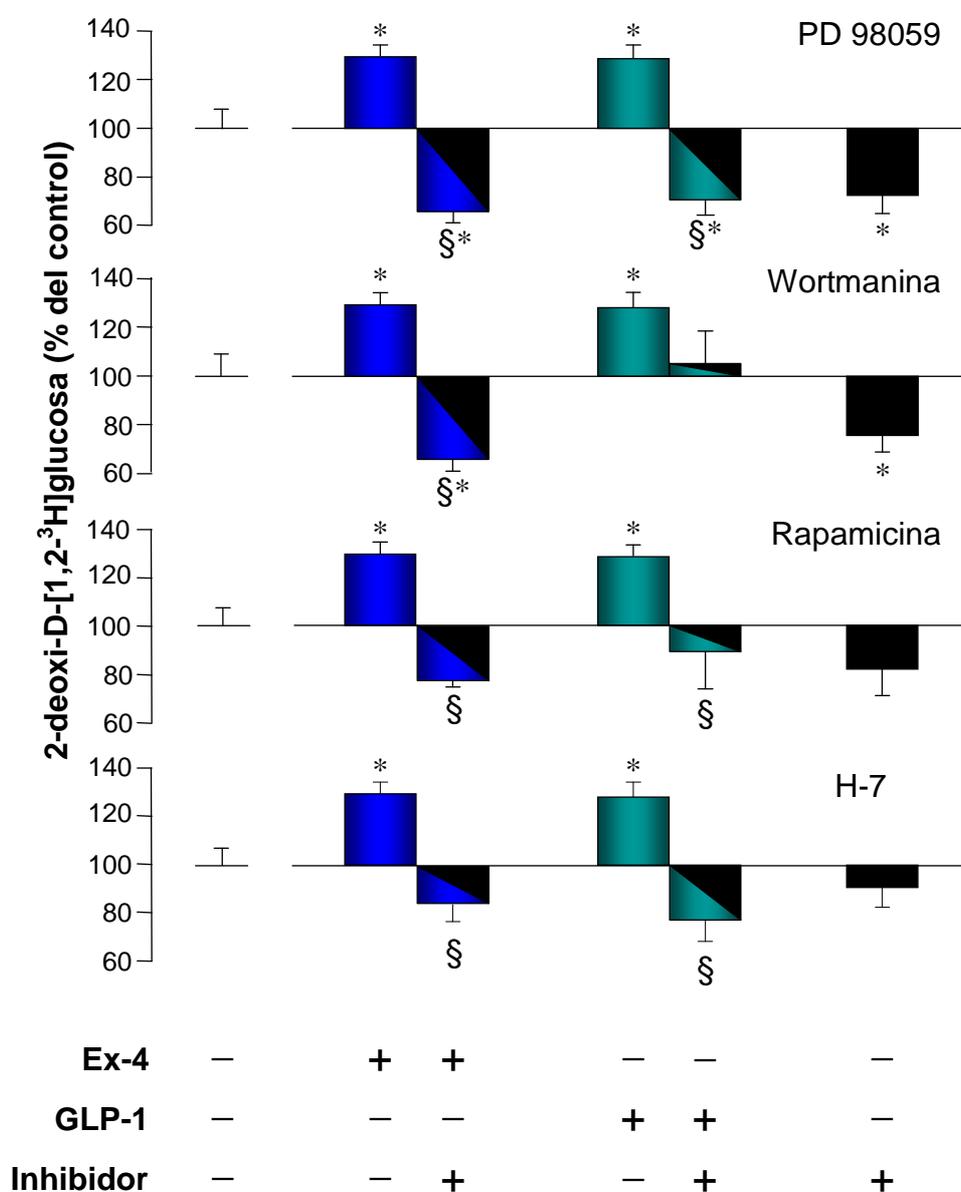
( $42 \pm 11\%$   $\Delta$  control,  $n=4$ ,  $p < 0,05$ ) y p44 MAPK ( $36 \pm 13\%$   $\Delta$  control,  $n=4$ ,  $p < 0,05$ ); sin embargo, no modificó la de PKB ( $3 \pm 7\%$   $\Delta$  control,  $n=4$ ).

### **3. SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR EN EL EFECTO DE LA EXENDINA-4 SOBRE EL TRANSPORTE DE GLUCOSA, EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LA RATA NORMAL**

En esta parte del estudio, quisimos examinar la posible participación de enzimas, previamente propuestos en la acción de la insulina y del GLP-1, en el efecto estimulador de la Ex-4 sobre la captación de glucosa por el músculo esquelético de la rata normal. La **figura 7** muestra la acción del PD98059 –inhibidor de p44/42 MAPKs–, wortmanina –inhibidor de PI3K/PKB–, rapamicina –inhibidor de P70s6k– y H-7 –inhibidor propuesto para PKC–, en el incremento del transporte de la hexosa inducido por Ex-4. Para el cálculo de la glucosa captada, entendida como incorporación de 2-deoxi-D-glucosa, y poder ser ésta expresada en porcentaje de incremento del valor control, fue necesaria la normalización de los resultados, al ser varias las condiciones de estudio y disponer sólo de dos muestras por animal. De hecho, en cada experimento se estudiaron, por parejas, las condiciones siguientes: control (sin péptido) y péptido, control e inhibidor, péptido y péptido + inhibidor. Cuando el medio en el que se disolvió el inhibidor contenía DMSO, éste se incluyó en la misma proporción.

Los resultados están expresados, y normalizados, en porcentaje del valor medio control ( $0,425 \pm 0,025$  nmol/mg per min,  $n=73$ ), obtenido en músculo incubado en ausencia de péptido.

El estímulo del transporte de glucosa inducido por Ex-4 ( $129 \pm 5\%$  control,  $n=13$ ,  $p < 0,05$ ) se redujo en presencia de PD98059 ( $66 \pm 9\%$  control,  $n=10$ ,  $p < 0,05$ ) por debajo del control, y hasta un valor similar al obtenido en presencia única del inhibidor ( $74 \pm 8\%$  control,  $n=4$ ,  $p < 0,05$ ), efecto similar al detectado previamente sobre la acción estimuladora del GLP-1 a  $10^{-8}$ M [Acitores y col., 2005]. La wortmanina también redujo el incremento inducido por Ex-4 ( $67 \pm 5\%$  control,  $n=10$ ,  $p < 0,05$ ), proporcionando un decremento similar al detectado en presencia única del inhibidor ( $76 \pm 7\%$  control,  $n=6$ ,  $p < 0,05$ ); en este caso, sin embargo, habíamos observado que este inhibidor, si bien reduce la acción del GLP-1, no la bloquea absolutamente [Acitores y col., 2005].



**Figura 7.** Efecto de inhibidores de quinasas –p42/44 MAPK, PI3K, p70s6k y PKC– en la acción estimuladora de la Ex-4, o GLP-1 como referencia, sobre el transporte de glucosa en el músculo esquelético de la rata normal. Los resultados (media±EEM), correspondientes a 4-13 experimentos individuales, están expresados en porcentaje del valor control, obtenido en uno de los músculos de cada animal (n=73), incubado en ausencia de péptidos e inhibidor. \*  $p < 0,05$  vs basal, §  $p < 0,05$  vs hormona/péptido.

La inhibición de la actividad p70s6k por rapamicina, también anuló la acción estimuladora de la Ex-4 ( $78\pm 3\%$  control,  $n=11$ ,  $p<0,05$ ), con un efecto de magnitud similar al detectado en presencia única del inhibidor ( $81\pm 13\%$  control,  $n=6$ ); en este caso, el patrón de respuesta fue el mismo que el proporcionado previamente por este inhibidor sobre la acción del GLP-1 [Acitores y col., 2005].

El H-7 también redujo ( $83\pm 7\%$  control,  $n=7$ ) el incremento inducido por Ex-4, como previamente habíamos observado sobre el GLP-1 [Acitores y col., 2005]; sin embargo, aparentemente, no se produjo modificación del valor control en presencia única del inhibidor.

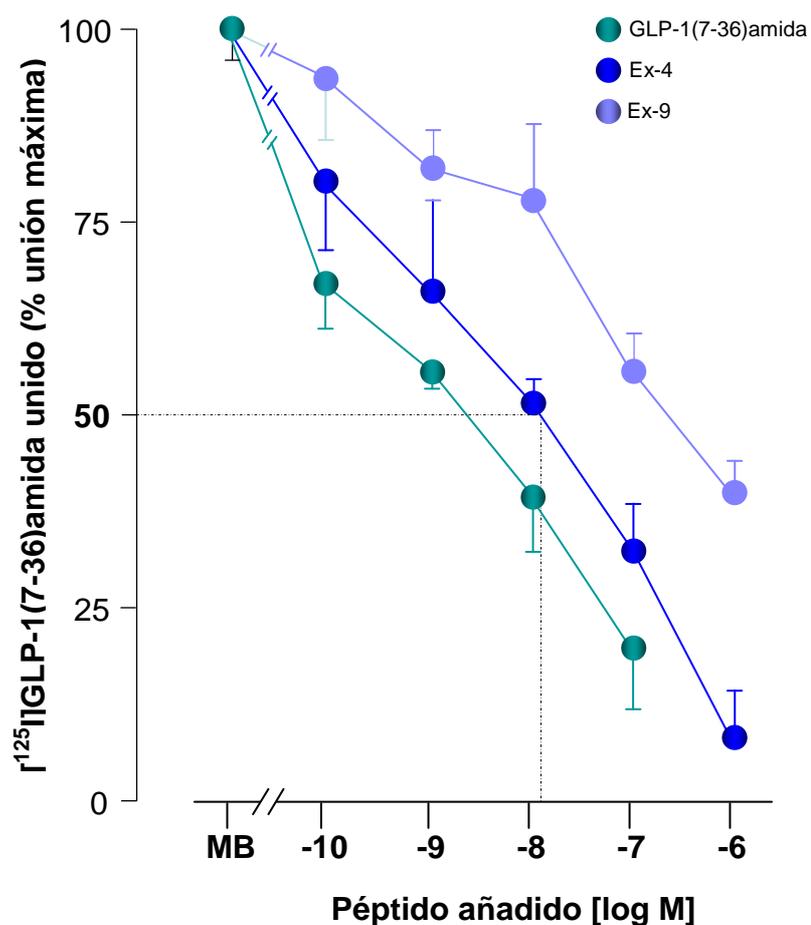
#### **4. CARACTERÍSTICAS DE LA EXENDINA-4, RESPECTO A LAS DEL GLP-1, EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LA RATA NORMAL: *estudio de unión a membrana***

La **figura 8** muestra la máxima unión específica de 3 fmol de [mono-<sup>125</sup>I]GLP-1 a 30  $\mu$ g de proteína de membrana, durante 40 minutos, a 25°C, y el efecto sobre la misma de concentraciones crecientes de GLP-1 no radiactivo, utilizado como control, y de Ex-4 y Ex-9.

La unión específica máxima de <sup>125</sup>I-GLP-1 radiactivo ( $4,8\pm 0,3\%$ ,  $n=12$ ) fue desplazada por GLP-1 no radiactivo, con un 50% de desplazamiento ( $ID_{50}$ ) a una concentración aproximada a  $3\times 10^{-9}$  M, confirmándose con ello observaciones previas de nuestro laboratorio [Delgado y col., 1995]. La Ex-4 también desplazó la unión de GLP-1, con un  $ID_{50}$  próximo al del GLP-1 ( $\approx 10^{-8}$  M); sin embargo, la Ex-9, si bien pudimos detectar una cierta competencia de la unión del GLP-1 a su receptor de membrana, el  $ID_{50}$  de esta exendina ( $\approx 10^{-6}$  M) fue mucho mayor que el de la Ex-4.

#### **5. EFECTO DE LA EXENDINA-4 SOBRE EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA, EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LA RATA NORMAL**

En un estudio previo de nuestro laboratorio, se detectó que la Ex-4, como el GLP-1, pero no la Ex-9, estimula, en el músculo esquelético de la rata normal, la síntesis de glucógeno, a través de un incremento en la actividad glicógeno sintasa  $\alpha$  (GS $\alpha$ ) [Alcántara y col., 1997]. En este trabajo se ha analizado el posible efecto de la Ex-4  $10^{-9}$  M



**Figura 8.** Unión específica máxima (MB) del  $[^{125}\text{I}]\text{GLP-1(7-36)amida}$  a su receptor de membrana en el músculo esquelético de 12 ratas, y su desplazamiento por GLP-1 (control), y por Ex-4 y Ex-9.

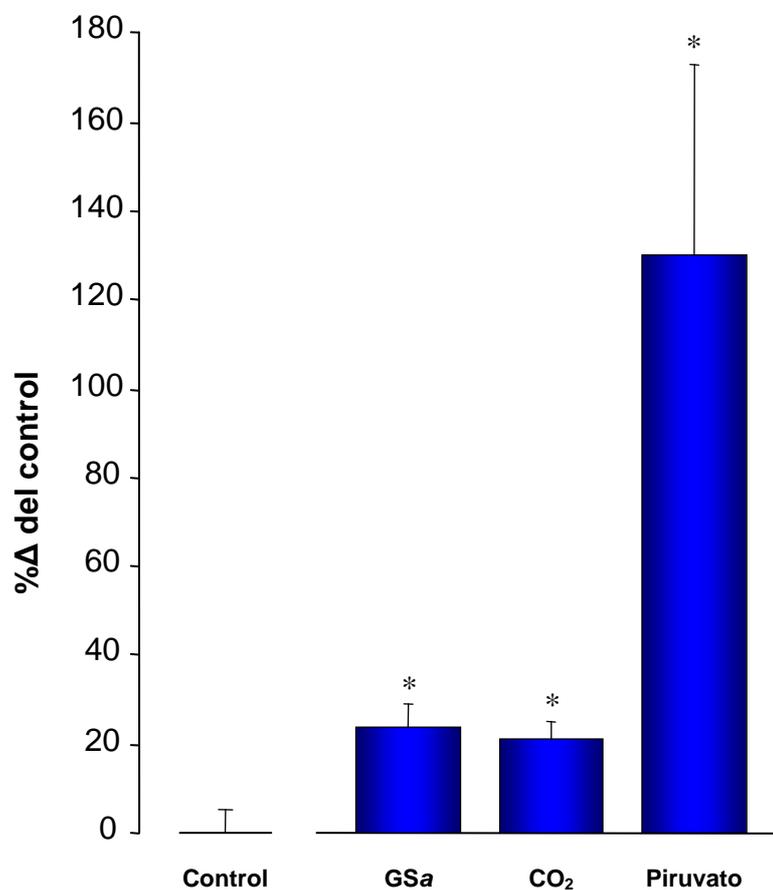
sobre la glucólisis (liberación de piruvato) y oxidación de piruvato ( $\text{CO}_2$ ); pero, además, y como control de su efecto sobre la actividad GSa en el modelo de rata diabética tipo 2, hemos incluido aquí, de nuevo, un grupo de ratas normales.

La Ex-4 (**Fig. 9**) indujo un claro aumento en la producción de piruvato ( $130 \pm 43\% \Delta$  control,  $n=10$ ,  $p=0,02$ ) sobre el valor control ( $1,05 \pm 0,21$  nmol/mg/min,  $n=10$ ), obtenido en uno de los músculos de cada animal, incubado en ausencia de péptido. Además, también estimuló la producción control de  $\text{CO}_2$  ( $6,40 \pm 0,43$  nmol/mg/min,  $n=10$ ), proporcionando un incremento ( $21 \pm 4\% \Delta$  control,  $n=14$ ) significativo de la misma ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, en este nuevo grupo de ratas normales, la Ex-4 de nuevo incrementó ( $p < 0,05$ ), en magnitud similar a lo previamente observado [Alcántara y col., 1997], la actividad GSa [ $24 \pm 2\% \Delta$  del control ( $3,27 \pm 0,30$  U/g proteína,  $n=19$ )].

## **6. ACCIÓN DE LAS EXENDINAS, RESPECTO A LA DEL GLP-1, SOBRE EL TRANSPORTE Y METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LA RATA DIABÉTICA TIPO 2**

Puesto que la Ex-4, al igual que el GLP-1, estimula el transporte de glucosa en el músculo esquelético de la rata normal, quisimos conocer su acción en un modelo de diabetes experimental tipo 2, inducido en la rata por tratamiento con estreptozotocina al nacer (DT2). En la rata DT2, el valor neto control de captación de glucosa ( $0,345 \pm 0,016$  nmol/mg/min,  $n=47$ ) fue menor ( $p=0,027$ ) que el proporcionado por el músculo esquelético de la rata normal ( $0,425 \pm 0,025$  nmol/mg/min,  $n=73$ ). Por otro lado, el músculo del grupo DT2 sólo mantuvo su capacidad de respuesta a la insulina  $10^{-9}\text{M}$  ( $142 \pm 5\%$  basal,  $n=11$ ,  $p < 0,05$ ) utilizada como control, mientras que con GLP-1 no se detectaron cambios, ni a  $10^{-9}$  M ( $100 \pm 8\%$  control,  $n=16$ ) ni a  $10^{-8}$  M ( $87 \pm 8\%$  control,  $n=8$ ); tampoco con Ex-4 ( $99 \pm 13\%$  basal,  $n=8$ ) o Ex-9 ( $104 \pm 7\%$  basal,  $n=10$ ), ambas a  $10^{-9}\text{M}$ , se produjo modificación alguna del valor control de glucosa captada.

A pesar de que la Ex-4 no estimuló el transporte de la glucosa a través de la membrana, cabía la posibilidad de que el músculo de la rata diabética mantuviese su capacidad de respuesta hacia un incremento del metabolismo de la hexosa por formación de glucógeno u oxidación del azúcar. Por ello, analizamos en el modelo DT2, como habíamos hecho en la rata normal, la actividad glucógeno sintasa  $\alpha$  y la formación de piruvato y  $\text{CO}_2$ .



**Figura 9.** Efecto de la Ex-4 sobre el metabolismo de la glucosa, medido como actividad glucógeno sintasa *a* (formación de glucógeno), y glucolisis (liberación de piruvato), y oxidación de piruvato ( $^{14}\text{CO}_2$ ), a partir de UDP- $^{14}\text{C}$  D-glucosa. Los resultados (media $\pm$ EEM), correspondientes a 10-19 experimentos, están expresados en porcentaje del valor control (media ponderada de los tres parámetros), obtenido en uno de los músculos de cada animal, incubado en ausencia de péptido. \*  $p < 0,05$  vs control.

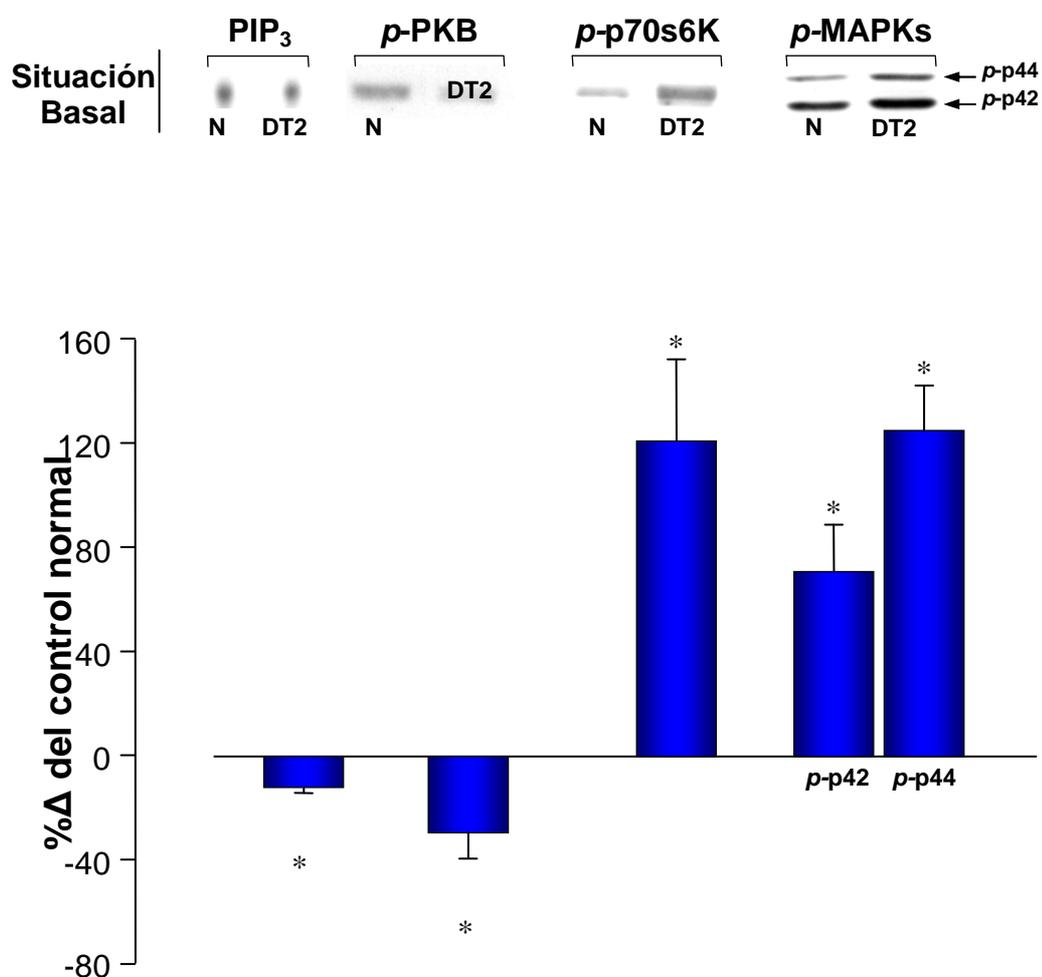
El valor control –ausencia de péptido– de actividad GSa, en, en el músculo de los animales DT2 ( $4,45 \pm 0,45$  U/gr,  $n=10$ ) fue mayor ( $p=0,032$ ) que el del grupo normal ( $3,27 \pm 0,30$  U/gr,  $n=19$ ); la formación de piruvato también fue significativamente mayor ( $3,364 \pm 0,717$  nmol/mg/min,  $n=9$ ,  $p<0,02$  vs control normal) que en la rata normal ( $1,050 \pm 0,211$  nmol/mg/min,  $n=10$ ); sin embargo la producción de CO<sub>2</sub> control, si bien fue ligeramente menor en el modelo DT2 ( $5,32 \pm 0,53$  nmol/mg/min,  $n=10$ ) que en normal ( $6,40 \pm 0,43$  nmol/mg/min,  $n=14$ ), la diferencia no alcanzó significación estadística. La Ex-4 no modificó ninguno de los parámetros medidos en el músculo esquelético de la rata DT2, a diferencia de lo previamente observado en nuestro laboratorio relativo al GLP-1 [Morales y col., 1997].

## 7. EFECTO DE LAS EXENDINAS, RESPECTO AL DEL GLP-1, SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR, EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LA RATA DIABÉTICA TIPO 2

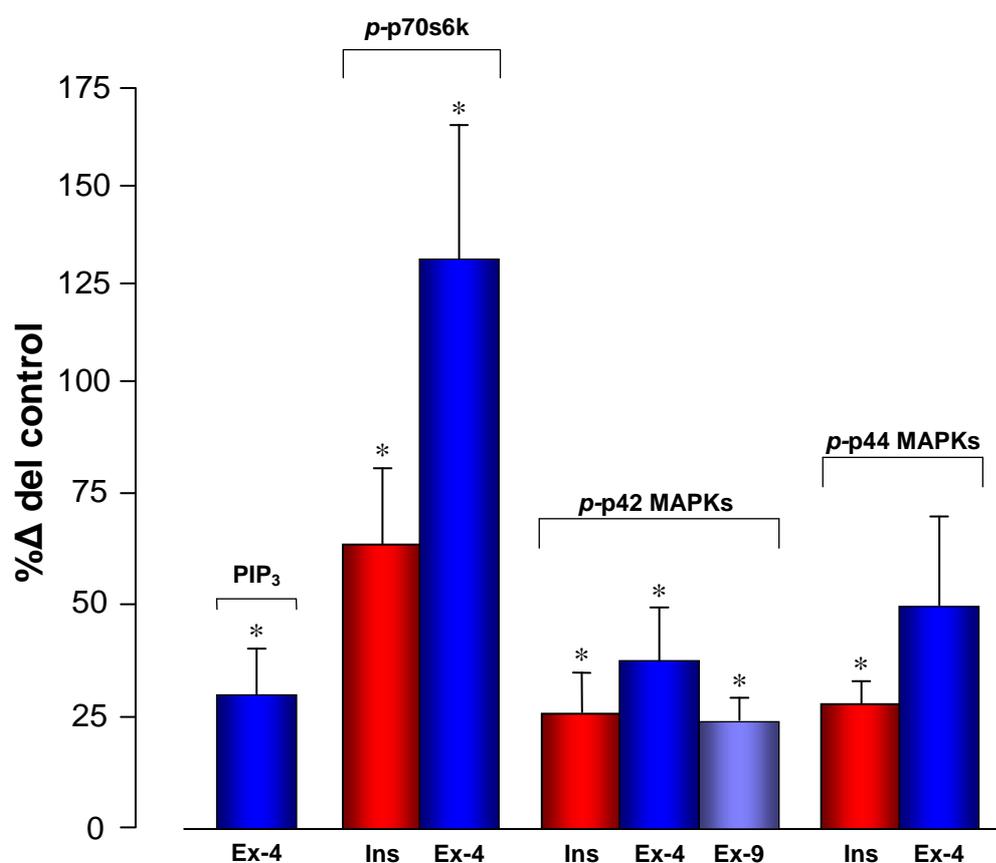
Puesto que ni el GLP-1 ni las exendinas parecen incrementar el valor neto de captación de glucosa en el músculo esquelético de la rata DT2, hemos analizamos su efecto sobre la actividad de las mismas quinasas estudiadas en la rata normal, y que están relacionadas con el transporte de glucosa al interior de la célula.

Los resultados (**Fig. 10**) están expresados en porcentaje de incremento del valor control, obtenido en músculos incubados en ausencia de péptido/hormona. El valor control, tanto de actividad PI3K como de PKB, fue menor en el grupo de ratas DT2 que en las normales, representando, en el caso de la PI3K, el  $-12 \pm 2\% \Delta$  del control normal ( $n=4$ ,  $p<0,02$ ), y  $-29 \pm 10\% \Delta$  ( $n=4$ ,  $p<0,05$ ), en el caso de la PKB. La actividad control del resto de enzimas estudiadas fue superior en el grupo DT2 que en el normal; así, la actividad p70s6k en el músculo de la rata diabética supuso un  $121 \pm 30\% \Delta$  de la normal ( $n=4$ ,  $p<0,05$ ), y lo mismo ocurrió con la p42 MAPK ( $71 \pm 18\% \Delta$  normal,  $n=4$ ,  $p<0,05$ ) y la p44 MAPK ( $125 \pm 32\% \Delta$  normal,  $n=4$ ,  $p<0,05$ ).

Al incubar uno de los músculos de la rata (**Fig. 11**) con cada uno de los péptidos de estudio, todos a  $10^{-9}$  M, observamos que: **1**) la actividad PI3K se incrementó sólo en presencia de Ex-4 ( $30 \pm 10\% \Delta$  control,  $n=5$ ,  $p<0,05$ ), **2**) la fosforilación de p70s6k aumentó únicamente en presencia de insulina ( $64 \pm 17\% \Delta$  control,  $n=5$ ,  $p<0,05$ )



**Figura 10.** Actividad PI3K, PKB, p70s6k y MAPKs, en el músculo esquelético de la rata diabética tipo 2 (DT2) en relación a la normal (N). Western blot representativo de la actividad de los enzimas en la rata N y DT2, y media±EEM (ambos grupos, n=4) del porcentaje de incremento en el grupo DT2, respecto a la rata N. \* $p < 0,05$  vs normal.



**Figura 11.** Efecto de las exendinas, en relación al de la insulina, sobre la actividad de enzimas de señalización celular. Los resultados (media  $\pm$  EEM), correspondientes a 5-6 ratas, están expresados en porcentaje de incremento del valor control, obtenido en uno de los músculos de cada animal incubado en ausencia de péptido. \*  $p < 0,05$  vs control.

y Ex-4 ( $128 \pm 30\% \Delta$  control,  $n=5$ ,  $p < 0,02$ ), **3**) la actividad p42 MAPK aumentó, moderadamente, con insulina ( $26 \pm 9\% \Delta$  control,  $n=6$ ,  $p < 0,05$ ), Ex-4 ( $38 \pm 12\% \Delta$  control,  $n=5$ ,  $p < 0,05$ ) y Ex-9 ( $24 \pm 5\% \Delta$  control,  $n=5$ ,  $p < 0,05$ ), y **4**) la de p44 MAPK sufrió un incremento en presencia de insulina ( $29 \pm 5\% \Delta$  control,  $n=6$ ,  $p < 0,01$ ) y Ex-4 ( $50 \pm 20\% \Delta$  control,  $n=5$ ), si bien, en este último caso, no alcanzó significación estadística. El GLP-1 no modificó la actividad de ninguna de las enzimas estudiadas (media global:  $99 \pm 5\% \Delta$  control,  $n=39$ ), y ninguno de los péptidos/hormonas estudiados modificó significativamente la actividad PKB en el músculo esquelético de la rata diabética tipo 2.

## 8. CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DE LA RATA NORMAL Y DIABÉTICA TIPO 2, TRAS TRATAMIENTO CON EXENDINA-4

El valor inicial de glucosa en plasma en la rata normal ( $137,1 \pm 3,9$  mg/dl,  $n=19$ ) fue ligeramente menor que el de la diabética ( $180,7 \pm 19,3$  mg/dl,  $n=7$ ), sin que la diferencia entre ambos alcanzara, no obstante, significación estadística. El peso inicial de ambos grupos tampoco fue distinto entre sí (media conjunta:  $278,6 \pm 5,7$  g,  $n=31$ ). Tras el tratamiento (**Tabla 1**) con salino, no se detectaron, en ninguno de los dos grupos, modificaciones aparentes en el peso, ni tampoco en la glucemia (Normal:  $137 \pm 4$  mg/dl y  $144 \pm 5$  mg/dl, pre- y post- tratamiento, respectivamente; DT2:  $181 \pm 19$  mg/dl y  $161 \pm 19$  mg/dl) o insulina plasmática (Normal:  $0,69 \pm 0,08$  y  $0,71 \pm 0,09$  ng/ml; DT2:  $0,52 \pm 0,09$  y  $0,57 \pm 0,09$ ). La Ex-4, en la rata diabética, produjo un ligero aumento de la insulina en plasma, respecto a su basal antes del tratamiento ( $0,63 \pm 0,06$  ng/ml,  $n=11$ ); sin embargo, en el grupo normal, no se detectó modificación alguna del valor basal ( $0,84 \pm 0,20$  ng/ml,  $n=11$ ) tras Ex-4.

**Tabla 1.** Modificación de las características metabólicas de ratas normales y diabéticas, tras tratamiento (72 h) con salino o Ex-4 [media de  $\Delta \pm$ EEM, (n)= número de observaciones].

	Salino			Ex-4		
Grupo	$\Delta$ Peso gramos	$\Delta$ Glucemia mg/dl	$\Delta$ Insulina ng/ml	$\Delta$ Peso gramos	$\Delta$ Glucemia mg/dl	$\Delta$ Insulina ng/ml
<b>Normal</b>	(19) $5,0 \pm 2,7$	(9) $7,1 \pm 4,7$	(15) $0,013 \pm 0,091$	(14) $-3,0 \pm 2,7$	(13) $-4,5 \pm 8,0$	(11) $-0,083 \pm 0,154$
<b>DT2</b>	(12) $10,9 \pm 4,2$	(7) $-20,1 \pm 3,9$	(12) $0,049 \pm 0,127$	(12) $-4,3 \pm 2,0$	(10) $12,1 \pm 7,1$	(11) $0,227 \pm 0,195$

## 9. EFECTO DEL TRATAMIENTO PROLONGADO CON EXENDINA-4 SOBRE EL TRANSPORTE DE GLUCOSA, EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LA RATA NORMAL Y DIABÉTICA TIPO 2

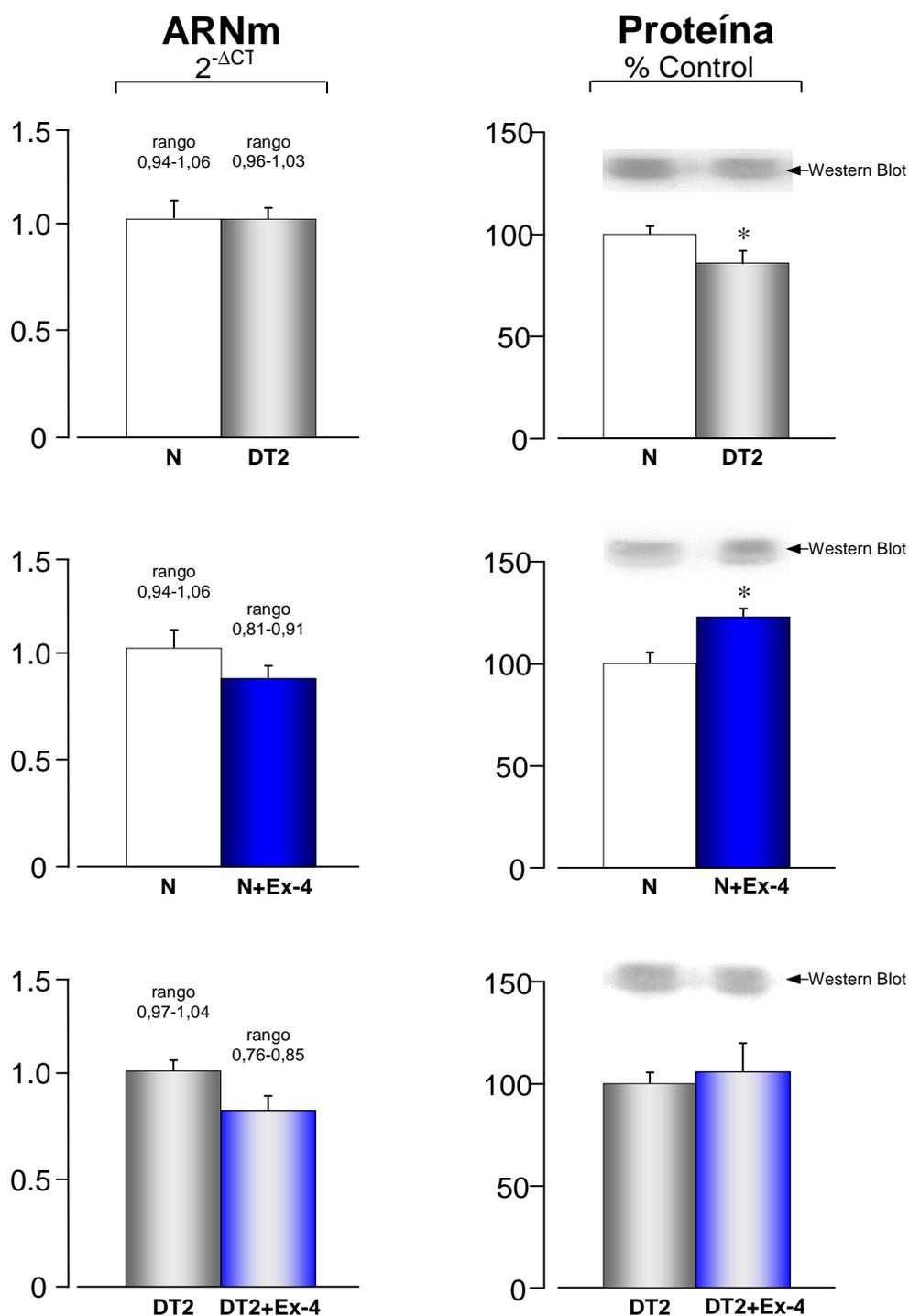
El valor neto de captación de glucosa por el músculo esquelético del grupo normal tras tratamiento control con suero salino ( $0,435 \pm 0,046$  nmol/mg por min,  $n=5$ ), aunque mayor que el del grupo DT2 en la misma condición ( $0,348 \pm 0,008$  nmol/mg por min,  $n=5$ ), la diferencia entre ambos no alcanzó significación estadística. Tampoco se detectaron cambios en el transporte de la hexosa en el grupo normal tratado con Ex-4 ( $0,347 \pm 0,039$  nmol/mg por min,  $n=8$ ) respecto su propio grupo control, pero el valor neto de glucosa captada por el músculo del grupo DT2, tras Ex-4 ( $0,578 \pm 0,063$  nmol/mg por min,  $n=6$ ), sí fue significativamente mayor ( $p=0,03$ ) que el del músculo del grupo paralelo tratado con salino, y también mayor ( $p=0,01$ ) que el de las ratas normales tras Ex-4.

## 10. EFECTO DEL TRATAMIENTO PROLONGADO CON EXENDINA-4 SOBRE LA EXPRESIÓN DE GLUT-4, EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LA RATA NORMAL Y DIABÉTICA TIPO 2

La **figura 12** muestra el efecto sobre la transcripción (ARNm) y traducción (proteína) del gen de Glut-4, en la rata normal y diabética tipo 2 (DT2). Los resultados están expresados bien en porcentaje de su propio grupo –proteína– o cantidad relativa –ARNm–, o respecto al grupo normal, ambos tratados con salino.

En la rata normal, una vez tratada con Ex-4, la cantidad relativa de ARNm fue ligeramente menor que la detectada en su grupo control con salino ( $0,88 \pm 0,06$  veces el control; ambos,  $n=7$ ). La magnitud de transcripción del glucotransportador en la rata DT2 fue inicialmente idéntica a la de la normal ( $1,00 \pm 0,05$  veces normal,  $n=8$ ); en este modelo diabético, si bien el tratamiento con Ex-4 indujo una reducción en la cantidad relativa del ARNm ( $0,82 \pm 0,06$  veces su control,  $n=7$ ), el decremento no alcanzó significación estadística.

La cantidad de proteína Glut-4 en el grupo DT2 control fue ligeramente menor ( $p < 0,05$ ) que en la rata normal en la misma condición ( $86 \pm 6\%$  normal,  $n=8$ ); el tratamiento con Ex-4 indujo un aumento significativo en la rata normal ( $124 \pm 4\%$  control,  $n=4$ ,  $p < 0,05$ ), pero no modificó el contenido en el grupo DT2 ( $105 \pm 4\%$  control,  $n=3$ ).



**Figura 12.** Efecto del tratamiento prolongado con Ex-4 sobre la expresión de Glut-4 –ARNm y proteína–, en el músculo esquelético de la rata normal (N) y diabética tipo 2 (DT2). Los resultados (media±EEM), correspondientes a 3-8 ratas, están expresados, respectivamente, en cantidad relativa y porcentaje del grupo N o DT2 tratado con salino (control). \*  $p < 0,05$  vs control.

## 11. EFECTO DEL TRATAMIENTO PROLONGADO CON EXENDINA-4 SOBRE LA EXPRESIÓN DE GLUT-2, EN EL HÍGADO DE LA RATA NORMAL Y DIABÉTICA TIPO 2

En la **figura 13** está representada la cantidad relativa de ARNm de Glut-2 y su posterior expresión en proteína, en el hígado de ratas normales y del modelo de diabetes tipo 2 (DT2), tratadas con Ex-4, o suero salino como control. Los resultados están expresados bien en porcentaje de su propio grupo –proteína– o cantidad relativa –ARNm–, o respecto al grupo normal, ambos tratados con salino.

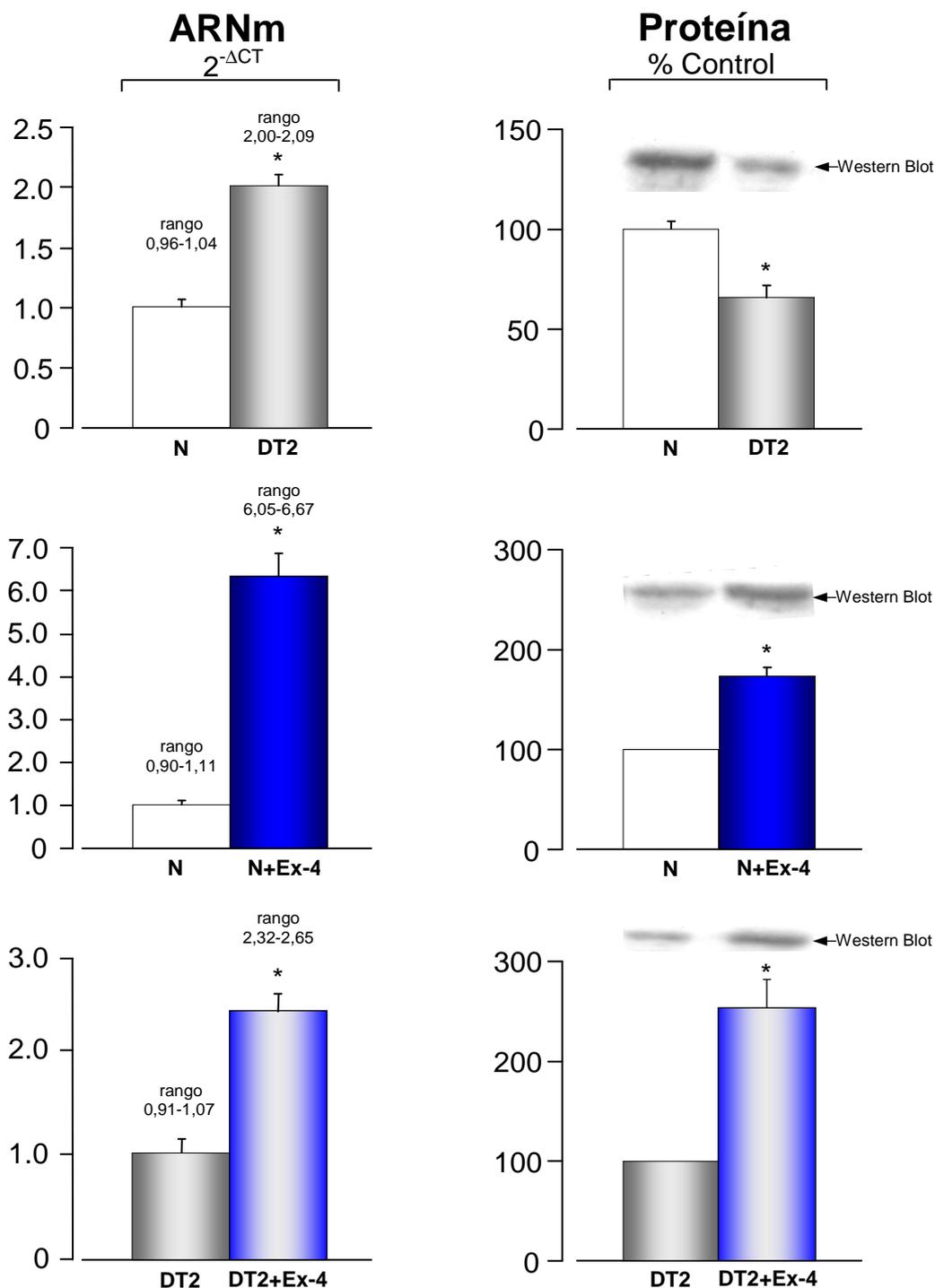
Tal como se había observado previamente en nuestro laboratorio [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001], la cantidad relativa de ARNm de la rata DT2 control, tratada con salino, fue mayor ( $2,05 \pm 0,08$  veces control normal,  $n=4$ ,  $p < 0,05$ ) que la de la rata normal ( $1,00 \pm 0,09$ ,  $n=4$ ). El tratamiento con Ex-4 indujo un incremento en la cantidad de ARNm en la rata normal ( $6,37 \pm 0,66$  veces su control,  $n=4$ ,  $p < 0,05$ ), y también en la rata diabética ( $2,49 \pm 0,23$  veces su control,  $n=4$ ,  $p < 0,05$ ) que, aunque menor, resultó en valores similares a los obtenidos en el grupo normal tratado con Ex-4.

La proteína Glut-2 fue menor en el hígado de la rata DT2 tratada con salino, que en el grupo normal ( $66 \pm 8\%$  control normal,  $n=5$ ,  $p < 0,05$ ); el tratamiento con Ex-4 aumentó ( $p < 0,05$ ) la expresión en el grupo normal ( $174 \pm 18\%$  control,  $n=5$ ) y también en la rata DT2 ( $254 \pm 56\%$  control DT2,  $n=5$ ,  $p < 0,05$ ), que incluso alcanzó un valor algo mayor que el de la rata normal tratada con salino.

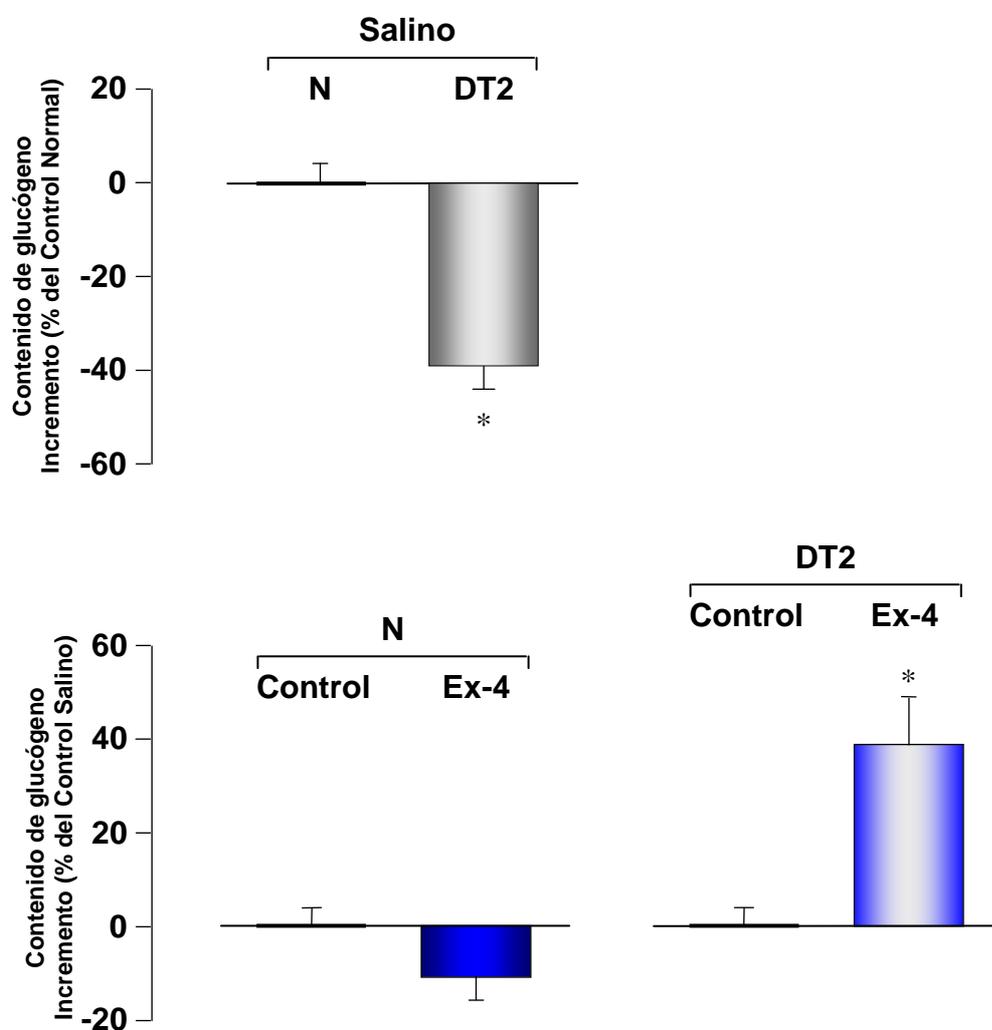
## 12. EFECTO DEL TRATAMIENTO PROLONGADO CON EXENDINA-4 SOBRE LA ACUMULACIÓN DE GLUCÓGENO HEPÁTICO, EN LA RATA NORMAL Y DIABÉTICA TIPO 2

La **figura 14** recoge los resultados obtenidos sobre el contenido de glucógeno en el hígado de ratas normales (N) y diabéticas tipo 2 (DT2), ambos tratados con Ex-4 o, como control, suero salino. Los resultados están expresados en incremento del valor medio de la rata N o DT2.

En el hígado de la rata DT2 control tratada con salino, la cantidad de glucógeno ( $225 \pm 20$  ng/ $\mu$ g proteína,  $n=5$ ) fue menor ( $p < 0,001$ ) que en el de la rata normal en la misma condición ( $386 \pm 16$  ng/ $\mu$ g proteína,  $n=5$ ). Tras tratamiento con Ex-4, no se



**Figura 13.** Efecto del tratamiento prolongado con Ex-4, sobre la expresión de Glut-2 –ARNm y proteína–, en el hígado de la rata normal (N) y diabética tipo 2 (DT2). Los resultados (media±EEM), correspondientes a 4-5 ratas, están expresados, respectivamente, en cantidad relativa y porcentaje del grupo N o DT2 tratado con salino (control). \*  $p < 0,05$  vs control.



**Figura 14.** Efecto del tratamiento con Ex-4, sobre la acumulación de glucógeno en el hígado de la rata normal (N) y en el modelo de diabetes tipo 2 (DT2). Los resultados, correspondientes a 5 ratas, están expresados en incremento del valor medio del grupo N o DT2 tratada con salino (control). \*  $p < 0,05$  vs control

detectaron modificaciones del contenido de glucógeno en la rata normal ( $342 \pm 26$  ng/ $\mu$ g proteína,  $n=5$ ,  $p=0,16$  vs normal salino); sin embargo, la Ex-4 indujo un incremento en la acumulación de glucógeno en la rata DT2 ( $309 \pm 22$  ng/ $\mu$ g proteína,  $n=5$ ), que no sólo fue significativo respecto a su propio grupo control ( $p < 0,02$ ), sino que la acción de la Ex-4 fue tendente hacia la normalización ( $p=0,06$  vs normal salino) del valor inicialmente reducido en esta situación diabética.

## DISCUSIÓN

El GLP-1 es una hormona con carácter fuertemente antidiabético, y su efecto lo ejerce al margen de su acción insulínica. Esto está fuera de toda duda, y su valor terapéutico potencial en el tratamiento de la diabetes ha impulsado su estudio y, por tanto, el avance en el conocimiento de muchos de sus efectos, de los que alguno de ellos han mostrado ser miméticos de los de la insulina.

El hecho de que las acciones del GLP-1 fueran ejercidas independientemente de la insulina, generó, en su momento, la sospecha de que el GLP-1 debía, necesariamente, tener efectos directos sobre el metabolismo primario de tejidos extrapancreáticos participantes en la homeostasis de la glucosa. El avance en las distintas investigaciones permitió documentar que, en el músculo esquelético y hepatocitos aislados de rata [Villanueva y col., 1994a; Valverde y col., 1994], y en miotúbulos y músculo del hombre [Luque y col., 2002], el GLP-1 estimula parámetros del metabolismo de la glucosa, como son la glucógeno sintasa  $\alpha$ , síntesis de glucógeno, y oxidación y utilización del azúcar; además, resultados de estudios en el hombre normal y diabético [Gutniak y col., 1992; D'Alessio y col., 1994, D'Alessio y col., 1995; Shalev y col., 1998] y en el perro depancreatectomizado [Sandhu y col., 1999], indicaban también una acción extrapancreática del GLP-1. Pero algún trabajo realizado en sujetos normales [Orskov y col., 1996; Toft-Nielsen y col., 1996; Larsson y col., 1997; Ryan y col., 1998], diabéticos tipo 2 [Ahren y col., 1997; Vella y col., 2000] y perros diabéticos dependientes de insulina [Freyse y col., 1999], han cuestionado esas conclusiones porque, realmente, dada la gran interacción hormonal, no es fácil determinar *in vivo* un efecto directo del GLP-1 sobre el metabolismo de la glucosa. No obstante todo lo anterior, un estudio posterior, realizado en pacientes diabéticos tipo 1 [Vella y col., 2001], ha propuesto que, en estados de hiperglucemia, hiperinsulinemia, y durante glucosa enteral, el GLP-1, si bien no modifica la captación de glucosa por el intestino, sí aumenta la total, y que ello correría a cargo, muy probablemente, del músculo esquelético. Además, se ha demostrado que, en el hígado, el GLP-1 estimula la captación de la hexosa, independientemente de la insulina [Meneilly y col., 2001; Dardevet y col., 2003], y que disminuye la producción del azúcar al margen de su acción sobre la secreción de insulina y glucagón [Pigeon y col., 2003].

Una gran parte de los efectos del GLP-1 descritos hasta ahora, se mantienen en situación diabética en el tejido adiposo e hígado de rata y en adipocitos y músculo esquelético de hombre [Morales y col., 1997, González y col., 2005b].

Con este trabajo, hemos querido investigar, por un lado, el efecto del GLP-1 sobre el transporte de glucosa y sus características de acción, en el músculo esquelético de un modelo de diabetes tipo 2 inducida por tratamiento con streptozotocina al nacer. Y hemos observado que, en esta situación, el GLP-1 no estimula, a diferencia de lo detectado en la rata normal [Acitores y col., 2004], la captación del azúcar, disminuida ya en estado basal, y que ello va acompañado de una falta de modificación en la actividad de quinasas –PI3K, PKB, p70s6k y MAPK–. Sobre ello, no sólo se ha documentado previamente un efecto estimulador del GLP-1 en el músculo de la rata normal, sino también la participación, en mayor o menor grado, de algunas de esas enzimas en esta acción del péptido [Acitores y col., 2005]. Por otro lado, en la rata diabética, la respectiva actividad basal p70s6k y MAPK, es mayor que en el grupo normal, y la PI3K y PKB, sensiblemente menor. Una actividad quinasa alterada en tejidos extrapancreáticos tanto del hombre como de la rata en distintas patologías, ha sido previamente detectada [Sancho y col., 2005; González y col., 2005b]; de hecho, en un grupo de pacientes diabéticos tipo 2, se ha informado una actividad PI3K en el músculo muy superior a lo normal [Meyer y col., 2002; González y col., 2005b], si bien algún investigador ha detectado valores disminuidos [Krook y col., 1998], que quizás sugieren una desensitización de la célula por hiperactivación sostenida.

Ya ha sido previamente documentada, una falta de acción del GLP-1 en situación patológica, en relación a su efecto lipogénico en el adipocito aislado de la rata, el cual, no se produce, o es indetectable, en este mismo modelo DT2 [Sancho y col., 2005].

Por otro lado, en el grupo de ratas diabéticas incluidas en este estudio, la producción basal de piruvato fue significativamente mayor que la del grupo normal, acompañada de una producción de CO<sub>2</sub> ligeramente inferior.

La diabetes mellitus tipo 2 podría considerarse como una situación de inanición en medio de la abundancia, es decir, que se traduciría en acumulación de ácidos grasos libres (AGL) en plasma –liberados por el tejido adiposo–, aumento en la producción de glucosa por el hígado, y disminución en el contenido de glucógeno y en la liberación

de aminoácidos por el músculo, consecuencia de la degradación de proteínas. En este trabajo hemos utilizado un modelo de diabetes experimental con secreción de insulina alterada, tanto en el ritmo como en la cantidad [Portha y col., 1997], que podría entonces emular esa misma situación. De hecho, está documentado, en este modelo diabético, una concentración alta de AGL en plasma [Pari y col., 2005], y una tasa lipolítica, en el adipocito, también por encima del valor normal [Sancho y col., 2005]. Lo anterior induciría un aumento en el metabolismo lipídico – $\beta$ -oxidación– en el músculo y una acumulación de Acetil-CoA, inhibiéndose así el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa [Randle y col., 1994], que justificaría el aumento observado en la concentración de piruvato. Por otro lado, hemos detectado que, en situación normal, la relación piruvato/ $\text{CO}_2$  es de aproximadamente 1:3, como corresponde a la estequiometría del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT). Esta relación está descompensada en el grupo diabético de este trabajo, donde apenas alcanza la proporción 1:2, indicativo de una reducción en el flujo del piruvato proveniente de la glucosa extracelular en el CAT. Además, hemos detectado que la actividad GSa está también aumentada en el modelo DT2, posiblemente debido a que, y en base al mismo argumento, la inhibición de la glucólisis por Acetil-CoA provoca la acumulación de glucógeno en el músculo [Stephens y col., 2007].

La relación entre el metabolismo de los hidratos de carbono y lípidos, en el músculo esquelético, ha sido objeto de investigación desde que Randle y col. propusieran el llamado ciclo *glucosa-ácidos grasos* [Randle y col., 1970]. Éste sugiere, básicamente, que la mayor disponibilidad de ácidos grasos conlleva un aumento en el metabolismo lipídico e inhibición del glucídico en el músculo, produciendo una acumulación de intermediarios metabólicos de la glucólisis, como piruvato y glucosa 6 fosfato, e inhibición no sólo de algunas enzimas como la fosfofructoquinasa, sino también del complejo piruvato deshidrogenasa y de la hexoquinasa. Todo lo anterior podría inducir a una menor captación de glucosa, como la observada en la rata diabética de este estudio. Pero, además, hemos detectado una fosforilación muy alta de los residuos Thr 421 y Ser 424 de la proteína p70s6k. Según recientes publicaciones, se ha relacionado la alta concentración de aminoácidos, premisa que tenemos en cuenta en este modelo, con la fosforilación de la p70s6k, como un sensor celular de la situación extracelular [Takano y col., 2001]. La p70s6k activa fosforila a la PI3K, regulando

negativamente su actividad y también la de la PKB [Tremblay y col., 2005], de acuerdo con los resultados de este estudio. Por tanto, la actividad PI3K y PKB disminuida en el modelo de la rata diabética podría ser consecuencia de niveles alterados de insulina en plasma, y de un aumento de la  $\beta$ -oxidación en el músculo y/o actividad p70s6k basal que, en su conjunto podría inducir una menor captación del azúcar.

El hecho aparente de que el GLP-1 no modifique, *in vitro*, el transporte de glucosa en el músculo esquelético de la rata diabética, no descarta a esta hormona como agente antidiabético. Además, se sabe no sólo que el hígado, sino también el músculo de la rata diabética, conservan su capacidad de respuesta al GLP-1 en relación a la actividad GSa –como paso previo hacia la síntesis de glucógeno–, sino que el GLP-1 modula la expresión del glucotransportador mayoritario en el hígado, músculo y tejido adiposo, tanto en situación normal como diabética [Morales y col., 1997; Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001].

Al margen de todo lo anterior, y por el propio hecho de la corta vida media del GLP-1 en el torrente circulatorio –es degradado por DPP-IV–, es lógico el interés de la comunidad científica por el conocimiento de los mecanismos de acción de la Ex-4.

La Ex-4, homóloga del GLP-1, tiene un efecto antidiabético, que es mucho más prolongado, y en ocasiones más potente, que el del GLP-1, ya que carece de puntos sensibles a degradación por DPP-IV. Como su naturaleza no es mamífera, y en base a la información proporcionada por el ADN clonado de la EX-4, se piensa que la existencia de un homólogo, propia del mamífero, es poco probable [Pohl y Wank, 1998]; de hecho, se desconoce, por el momento, la existencia de receptores específicos para la Ex-4 en tejidos del hombre u otros mamíferos. Sin embargo, el carácter de la Ex-4 y el de su péptido truncado Ex-9, agonista y antagonista, respectivamente, del receptor del GLP-1 en distintos sistemas celulares [Doyle y Egan, 2001] y también de su acción insulínica [Cancelas y col., 2001a; Cancelas y col., 2001b], está bien documentado. En este trabajo hemos observado que la unión específica máxima del GLP-1 a su receptor de membrana en el músculo esquelético de la rata, es desplazable por el propio GLP-1 ( $ID_{50}=3 \times 10^{-9}$ ) –confirmándose con ello observaciones previas [Delgado y col., 1995]–, y también por Ex-4 –presente trabajo–, si bien en este caso con una afinidad algo menor ( $ID_{50}=10^{-8}$ ). Esto último hace pensar que las acciones, ya descritas, de la Ex-4

en el músculo, como son su efecto estimulador sobre la G<sub>S</sub>α y utilización de glucosa [Alcántara y col., 1997], pueden ocurrir, al menos en parte, a través del propio receptor de GLP-1, tal y como también se ha documentado en otros tejidos [Raufman y col., 1992]

La Ex-4 estimula, *in vitro*, el transporte de glucosa en el músculo de la rata normal –presente estudio–, proporcionando un incremento similar al observado con insulina y GLP-1 [Acitores y col., 2005], y a una concentración 10 veces menor que el último, lo que indica una mayor potencia de la Ex-4 para inducir este efecto en el músculo esquelético de la rata. Cuando se estudió la acción de ambas exendinas, combinadas en el medio de incubación, la Ex-9 no modificó el efecto de la Ex-4, lo cual podría ser debido a esa pérdida de 8 aminoácidos en posición C-terminal, convirtiéndola en un péptido con poca afinidad por el receptor. Cuando el músculo se incubó con Ex-4 y GLP-1, en combinación, no aumentó la magnitud del incremento sobre el transporte de glucosa inducido por cada una de ellos individualmente. Esto no excluye la hipótesis de una utilización conjunta de un único receptor –el del GLP-1–, y podría ser más bien indicativo de una respuesta máxima de las células del tejido a cada uno de los péptidos; sin embargo, en miocitos humanos [González y col., 2005a] y adipocitos de rata [Sancho y col., 2005], la Ex-9 no sólo estimula, como la Ex-4, el transporte de glucosa, sino que el efecto de ambas es aditivo. No obstante, hay que tomar en consideración el que, en miocitos humanos, si bien la Ex-4, como el GLP-1, no modifica el contenido celular de AMPc –indicativo de que el receptor utilizado no está asociado al sistema adenilato ciclasa-AMPc, a diferencia del pancreático [Thorens y col., 1992b]–, la Ex-9 lo incrementa significativamente [Luque y col., 2002], lo que sugiere una utilización, por su parte, de un mecanismo/receptor distinto. Por otro lado, la falta de acción de la Ex-9 sobre la captación del azúcar por el músculo esquelético de la rata, podría también ser debida, aunque es poco probable, a que su afinidad por el receptor del GLP-1 sea cien veces inferior. Esta diversidad en las características de acción de ambas exendinas en relación a la del GLP-1, podrían justificarse en base a especificidades de tejido y/o también de especie.

En este estudio hemos detectado que ambas exendinas estimulan, *in vitro*, la PI3K, p70s6k y MAPK en el músculo esquelético de la rata, al igual que el GLP-1 [Acitores y col., 2004]; sin embargo, sólo la Ex-4 y el GLP-1 [Acitores y col., 2004] incrementan la de la PKB en este tejido. Está ampliamente documentada la implicación de la PKB en el

transporte de glucosa [Watson y Pessin, 2006; Farese y col., 2005], y la falta de efecto de la Ex-9 explicaría, por sí sola, el que este péptido no muestre una acción sobre la captación del azúcar; pero, además, se sabe que la wortmanina bloquea, aunque parcialmente, la acción estimuladora del GLP-1 sobre el transporte de glucosa en el músculo de rata [Acitores y col., 2004], hecho que confiere a la vía PI3K/PKB una importancia determinante en esta acción del GLP-1 y, quizás también, de las exendinas. No obstante, la Ex-9, como la Ex-4 y el GLP-1, sí estimuló la actividad del resto de enzimas estudiadas, por lo que, de nuevo, una reducida afinidad de esta molécula por el receptor del GLP-1, no debe ser descartada.

Por otro lado, hemos observado, mediante la utilización de inhibidores específicos de la actividad PI3K, p70s6k y MAPK, que la presencia de cualquiera de ellos reduce el transporte de glucosa inducido por Ex-4 en el músculo. Esto es similar a lo ya descrito en relación al efecto del GLP-1 [Acitores y col., 2005] en este mismo tejido de rata, hecho que refuerza el papel esencial de la PKB en la vía de señalización post-receptor, y también el que éste sea utilizado por Ex-4, al margen de que el resto de los enzimas estudiados también puedan estar implicados. Respecto a esto último, algunos autores afirman que las MAPK no participan en el transporte de glucosa inducido por insulina [Shepherd y col., 1997], mientras que otros propugnan su implicación en la captación del azúcar inducida por otros péptidos [Cantó y col., 2004], y también en la producida durante el ejercicio físico o fármacos que lo simulan [Chen y col., 2002]. Por otro lado, se ha informado recientemente [Zhou y col., 2008], que la actividad p70s6k incrementa la expresión de Glut-1, aumentando su presencia en la membrana, y esto afectaría al transporte de glucosa basal independiente de insulina; por tanto, es posible que la rapamicina –inhibidor específico de la p70s6k– no influya directamente sobre el estímulo de la captación de la hexosa inducido por Ex-4, sino, más bien, sobre la situación basal de la célula.

Los resultados de este trabajo no excluyen la posibilidad de que la PKC participe en el mecanismo de señalización celular del efecto de la Ex-4 sobre el transporte de glucosa en el músculo de la rata; de hecho, el H-7 bloquea el incremento inducido por Ex4. Previamente, se había observado que la presencia de H-7, y también de Ro31-8220 –derivado de estaurosporina y potente inhibidor bisindolmaleimida de varias isoformas de la PKC, fundamentalmente de la  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\gamma$  [Wilkinson y col., 1993]–

inhiben, ambos, en la rata, tanto el efecto del GLP-1 sobre el metabolismo lipídico del tejido adiposo [Sancho y col., 2005] como su efecto sobre la captación del azúcar en el músculo esquelético [Acitores y col., 2005]. Si bien la participación de algunas isoformas de la PKC en los efectos de la insulina sobre el transporte de glucosa, parece estar más consolidada [Ishiki y Klip 2005], los resultados de este estudio sólo sugieren que su implicación es muy probable, porque tanto el H-7 como muchos de los inhibidores hasta ahora disponibles, o bien no son específicos para una isoforma en concreto, o tienen otras acciones de forma independiente [Davies y col., 2000]. No obstante, el posible papel de la PKC en la acción del GLP-1 ya ha sido sugerida con anterioridad en otros tejidos, en relación, por ejemplo, a su efecto estimulador sobre la GSa en el hepatocito de la rata [Redondo y col., 2003] y transporte de glucosa en el músculo del hombre [González y col., 2005a].

La Ex-4, como el GLP-1 y la insulina, incrementa en el músculo esquelético de la rata normal –presente trabajo–, *in vitro*, tanto la actividad GSa como la glucólisis –formación de piruvato– y oxidación de glucosa (liberación de CO<sub>2</sub>), lo que confirma observaciones previas de nuestro laboratorio [Alcántara y col., 1997]. En situación normal, tras la ingestión de alimentos, la insulina favorece la acumulación de glucógeno en el músculo, y el exceso de glucosa se reconduce hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos para, posiblemente, su acumulación en forma de lípidos, procesos en los que intervienen la PI3K/PKB y las MAPK. El carácter de la Ex-4, mimético del de la insulina, viene reforzado por el hecho de que este péptido también estimula la actividad de esos mismos enzimas, implicados, además, en su acción estimuladora sobre la captación de glucosa por el músculo [Acitores y col., 2005; González y col., 2005b] .

En el modelo DT2, el músculo sólo parece conservar su capacidad de respuesta a la insulina en cuanto al transporte de glucosa, puesto que ni el GLP-1 ni la Ex-4 modifican, aparentemente, el valor basal. El hecho de que, en la situación diabética, esto vaya acompañado de que ninguno de los dos péptidos incrementen, al parecer, la actividad PKB, aunque al menos la Ex-4 sí la del resto de enzimas estudiados –PI3K, p70s6k y MAPK–, parece indicar no sólo un papel esencial de la PKB en la acción de la Ex-4 sobre la captación de glucosa por el músculo, sino, también, su posible responsabilidad, al menos parcial, en la falta de efecto de la Ex-4 sobre la glucólisis y oxidación de la hexosa, en esta situación diabética.

La aparente falta de efecto de la Ex-4 sobre la captación de glucosa por el músculo de la rata diabética, y tampoco sobre los otros parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa, medidas *in vitro* en este estudio, no excluye, sin embargo, la posibilidad de que este péptido pueda ejercer estas acciones *in vivo*, no sólo en el músculo sino también en otros tejidos extrapancreáticos participantes en la homeostasis de la glucosa. De hecho, en este modelo de diabetes experimental, con una proteína Glut-4 del músculo inicialmente reducida respecto a la rata normal, y una expresión génica similar, el tratamiento prolongado con Ex-4 no modificó, en apariencia, la expresión del Glut-4 –ni la proteína, ni el ARNm–, si bien indujo un ligero aumento de la proteína en la rata normal. No obstante, tras Ex-4, se detectó un transporte basal de glucosa significativamente mayor que el del grupo no tratado, e incluso mayor que el de la rata normal tratada con Ex-4. Además, el hígado de este grupo diabético, en el que se confirma una proteína Glut-2 inicialmente menor que la de la rata normal [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001], y una mayor expresión génica del glucotransportador, muestra, tras tratamiento con Ex-4, un incremento importante de la proteína hacia su normalización, y también una mayor cantidad de ARNm hasta niveles similares a los de la rata normal tras tratamiento. Unos valores alterados de expresión, tanto de Glut-2 como de Glut-4, en este mismo modelo de diabetes experimental, ya habían sido informados por nuestro laboratorio [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001], que en el caso del Glut-2 podría ser quizás debido a una más alta concentración de glucosa circulante en este modelo [Burcelin y col., 2000]; además, el GLP-1, en administración exógena, se vio que ejerce un control sobre la expresión del Glut-2 y Glut-4 tanto en la rata normal como en el mismo modelo de diabetes experimental tipo 2 aquí utilizado [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001]. Esto último concuerda también con resultados incluidos en este estudio, relativos al glucógeno hepático, en el cual se detecta, en la rata diabética, una acumulación inicial sustancialmente menor que en la normal, y que documentan cómo el tratamiento con Ex-4 induce un incremento en este parámetro, que no sólo es significativo respecto a su grupo control no tratado sino que, además, aproxima el valor de contenido hepático de glucógeno al de la rata normal.

Según todo lo expuesto, la acción normalizadora de la Ex-4 sobre la expresión del Glut-2 en el hígado, podría ser un mecanismo por el cual, y tal y cómo se ha

propuesto en el caso del GLP-1, esta exendina ejerza, al menos en parte, el control descrito sobre los niveles de glucosa circulante.

## CONCLUSIONES

### En el músculo esquelético de la rata normal...

La Ex-4 –péptido de origen no mamífero, estructuralmente homólogo del GLP-1, y mimético de éste en algunas de sus acciones– estimula, como el GLP-1, el transporte de glucosa, la actividad GSa y la oxidación y utilización de la hexosa, en el músculo esquelético. La Ex-9, molécula que procede de la Ex-4 por pérdida de 8 aminoácidos en su extremo N-terminal, no parece modificar la captación del azúcar.

La Ex-4 desplaza la unión específica máxima del GLP-1 a su receptor de membrana, con un ID<sub>50</sub> similar al del propio GLP-1; la Ex-9, aunque también se une a este receptor, su afinidad por él es, al menos, cien veces menor.

La Ex-4, *in vitro*, como el GLP-1, incrementa la actividad PI3K, PKB, p70s6k y MAPKs; la Ex-9 estimula la actividad de estos mismos enzimas, excepto la de la PKB.

En el efecto estimulador de la Ex-4 sobre el transporte de glucosa, la PI3K/PKB, p70s6k y MAPKs parecen estar determinadamente implicadas; la PKC, si bien podría participar en esta acción del péptido, su función sería parcial.

### En el músculo esquelético de la rata modelo experimental de diabetes tipo 2...

El transporte de glucosa y liberación de CO<sub>2</sub> es menor que en la rata normal; sin embargo, la actividad GSa y la producción de piruvato, es mayor.

La Ex-4, la Ex-9 y el GLP-1, ninguno estimula el transporte de glucosa, a diferencia de la insulina; además, la Ex-4 tampoco modifica los valores iniciales de actividad GSa y glucolisis.

La actividad PI3K y PKB es menor que en la rata normal, y la p70s6k y MAPKs, mayor. De estos enzimas, la Ex-4 incrementa la actividad PI3K, p70s6k y p42 MAPK, y la Ex-9, sólo la de la p42 MAPK; y mientras que el GLP-1 no parece afectar la situación basal de ninguno de ellos, la p70s6k y las MAPKs sí conservan, sin embargo, su capacidad de respuesta a la insulina.

### El tratamiento sostenido con Ex-4, de la rata normal...

No modifica el transporte de glucosa en el músculo, ni tampoco la cantidad del ARNm del Glut-4, aunque sí provoca un incremento significativo de su proteína.

No modifica el contenido hepático de glucógeno, pero sí aumenta significativamente la expresión del glucotransportador Glut-2 –proteína y ARNm–.

### **El tratamiento sostenido con Ex-4, de la rata modelo experimental de diabetes tipo 2...**

Incrementa el transporte de glucosa en el músculo esquelético, inicialmente disminuido respecto al de la rata normal; sin embargo, no provoca, en apariencia, modificación de los valores de ARNm y proteína Glut-4, en un principio, iguales y menores, respectivamente, que los de la rata normal.

Induce un incremento en la acumulación de glucógeno hepático, tendente hacia la normalización del valor, inicialmente más bajo que el de la rata normal. Además, ejerce un efecto estimulador sobre la expresión del glucotransportador Glut-2, tanto proteína como ARNm, cuyo valor inicial era, respectivamente, mayor y menor, de lo normal. Por otro lado, este efecto de la Ex-4 en la rata diabética, iguala los niveles de expresión génica del glucotransportador con los de la rata normal tratada con Ex-4.

**El demostrado efecto antidiabético de la exendina-4 podría estar basado, entre otros, en su acción normalizadora sobre el transporte de glucosa en el músculo esquelético, y sobre la expresión del glucotransportador y acúmulo de glucógeno, inicialmente disminuidos, en el hígado.**

## BIBLIOGRAFÍA

- Abraham EJ, Leech CA, Lin JC, Zulewski H, Habener JF (2002) Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells. *Endocrinology* 143: 3152–3161
- Acitores A, González N, Sancho V, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (2004) Cell signalling of glucagon-like peptide-1 action in rat skeletal muscle. *J. Endocrinol* 180: 389-398
- Acitores A, González N, Sancho V, Arnés L, Valverde I, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML (2005) Participation of protein kinases in the stimulant action of GLP-1 upon 2-deoxy-D-glucose uptake by normal rat skeletal muscle. *Horm Metab Res* 37: 275-280
- Ahren B, Larsson H, Holst JJ (1997) Effects of glucagon-like peptide-1 on islet function and insulin sensitivity in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocr Metab.* 82: 473-478
- Alcántara AI, Morales M, Delgado E, López-Delgado MI, Clemente F, Luque MA, Malaisse WJ, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (1997) Exendin-4 agonist and exendin(9-39)amide antagonist of the GLP-1(7-36)amide effects in liver and muscle. *Arch Biochem Biophys* 341: 1-7
- Álvarez E, Roncero I, Chowen JA, Thorens B, Blázquez E (1996) Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor gene in rat brain. *J Neurochem* 66: 920-927
- Banting FG, Best CH (1922) Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. *Canad Med Ass J* 12: 141
- Baron V, Kaliman P, Gautier N, Van Obberghen E (1992) The insulin receptor activation process involves localized conformational changes. *J Biol Chem* 267: 23290-23294
- Beck-Nielsen H, Groop LC (1994) Metabolic and genetic characterization of prediabetic states. Sequence of events leading to non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 94: 1714-1721
- Belfort R, Mandarino L, Kashyap S, Wirfel K, Pratipanawat T, Berria R, DeFronzo RA, Cusi K (2005) Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling. *Diabetes* 54: 1640–1648
- Bernard C (1849) Chiens rendus diabetique. *CR Soc Biol* 1: 60
- Bernard C (1865) An Introduction to the Study of Experimental Medicine. New York: Dover Publishers Inc. 1865
- Bernard C. (1877) Lecons sur le diabète et la glycogenèse animale. Paris
- Bhavsar S, Watkins J, Young A (1998) Synergy between amylin and cholecystokinin for inhibition of food intake in mice. *Physiol Behav* 64: 557-561

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Brichard SM, Desbuquois B, Girard J (1993a) Vanadate treatment of diabetic rats reverses the impaired expression of genes involved in hepatic glucose metabolism: effects on glycolytic and gluconeogenic enzymes, and on glucose transporter GLUT2. *Mol Cell Endocrinol* 91: 91-97
- Brichard SM, Henquin JC, Girard J (1993b) Phlorizin treatment of diabetic rats partially reverses the abnormal expression of genes involved in hepatic glucose metabolism. *Diabetologia* 36: 292-298
- Brown GK (2000) Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. *J Inherit Metab Dis* 23: 237-246
- Brubaker PL, Drucker DJ (2004) Minireview: glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. *Endocrinology* 145: 2653-2659
- Burcelin R, Eddokus M, Kande J, Assan R, Girard J (1992) Evidence that GLUT-2 mRNA and protein concentrations are decreased by hyperinsulinemia and increased by hyperglycaemia in liver of diabetic rats. *Biochem J* 288: 675-679
- Burcelin R, Dolci W, Thorens B (2000) Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT2-dependent: in vivo analysis in GLUT2-null mice. *Diabetes* 49:1643-1648
- Calvo JC, Yusta B, Mora F, Blázquez E (1995) Structural characterization by affinity cross-linking of glucagon-like peptide-1(7-36)amide receptor in rat brain. *J Neurochem* 64: 299-306
- Campos RV, Lee YC, Drucker DJ (1994) Divergent tissue-specific and developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide-1 in the mouse. *Endocrinology*. 134: 2156-2164
- Cancelas J, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ (2001a) Suppression by exendin(9-39)amide of glucagon-like peptide 1 insulinotropic action in rats infused with the dimethyl ester of succinic acid. *Endocrine* 15: 283-285
- Cancelas J, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ (2001b) Synergistic insulinotropic effects of succinic acid dimethyl ester and exendin-4 in anaesthetized rats. *Int J Mol Med* 8: 269-271
- Cancelas J, Prieto PG, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ (2006) Effects of an olive oil-enriched diet on glucagon-like peptide 1 release and intestinal content, plasma insulin concentration, glucose tolerance and pancreatic insulin content in an animal model of type 2 diabetes. *Horm Metab Res* 38: 98-105.
- Cannon WB (1929) Organization for physiological homeostasis. *Physiological Reviews* 9: 398-431.
- Cantó C, Pich S, Paz JC, Sanches R, Martínez V, Orpinell M, Palacín M, Zorzano A, Gumà A (2007) Neuregulins increase mitochondrial oxidative capacity and insulin sensitivity in skeletal muscle cells. *Diabetes* 56: 2185-2193

- Cheatham B, Kahn CR (1995) Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 16: 117-142
- Chen HC, Bandyopadhyay G, Sajan MP, Kanoh Y, Standaert M, Farese RV Jr, Farese RV (2002) Activation of the ERK pathway and atypical protein kinase C isoforms in exercise- and aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribose (AICAR)-stimulated glucose transport. *J Biol Chem* 277: 23554-23562
- Chen L, Alam T, Johnson JH, Hughes S, Newgard CB, Unger RH (1990) Regulation of beta-cell glucose transporter gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4088-4092.
- Chen YE, Drucker DJ (1997) Tissue-specific expression of unique mRNAs that encode proglucagon-derived peptides or exendin 4 in the lizard. *J Biol Chem* 272: 4108-4115.
- Christel CM, DeNardo DF, Secor SM (2007) Metabolic and digestive response to food ingestion in a binge-feeding lizard, the Gila monster (*Heloderma suspectum*). *J Exp Biol* 210: 3430-3439
- Clowes JA, Khosla S, Eastell R (2005) Perspective Potential role of pancreatic and enteric hormones in regulating bone turnover. *J Bone Miner Res* 9: 1497-1506
- Creutzfeldt W (1979) The incretin concept today. *Diabetologia* 16: 75-85
- Cushman SW, Warzala LJ (1980) Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell: aparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J Bio. Chem* 255: 4758-4762.
- Czech MP (1985) The nature and regulation of the insulin receptor: structure and function. *Annu Rev Physiol.* 47: 357-81
- Czech MP, Corvera S (1999) Signalling mechanism that regulate glucose transport. *J Bio Chem* 274: 1865-1868
- D'Alessio DA, Kahn SE, Leusner CR, Ensinck JV (1994) Glucagon-like peptide 1 enhances glucose tolerance both by stimulation of insulin release and by increasing insulin-independent glucose disposal. *J Clin Invest* 93: 2263-2266
- D'Alessio DA, Prigeon RL, Ensinck JW (1995) Enteral enhancement of glucose disposition by both insulin-dependent and insulin-independent processes: A physiologic role of Glucagon-like peptide 1. *Diabetes* 44: 1433-1437
- Dardevet D, Moore M, Neal D, DiCostanzo C, Snead W, Cherrington A (2003) Insulin-independent effects of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) on liver glucose metabolism: time of infusion and involvement of hepatoportal region. *Diabetes* 52: A78
- Dardevet D, Moore MC, Neal D, DiCostanzo CA, Snead W, Cherrington AD (2004) Insulin-independent effects of GLP-1 on canine liver glucose metabolism: duration of infusion and involvement of hepatoportal region. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 287: E75-81
- Davidson MB (1995) Clinical implications of insulin resistance syndromes. *Am J Med* 99: 420-426
- Davies SP, Reddy H, Caivano M (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351: 95-105

- Deacon CF, Johnsen AH, Holst JJ (1995) Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 952-957
- Delgado E, Luque MA, Alcántara A, Trapote MA, Clemente F, Galera C, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (1995) Glucagon-like peptide-1 binding to rat skeletal muscle. *Peptides* 16: 225-229
- Despres JP, Lamarche B, Mauriege P, Cantin B, Dagenais GR, Moorjani S, Lupien PJ (1996) Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *N Engl J Med* 334: 952-957.
- De Wulf H, Hers HG (1968) The interconversion of liver glycogen synthetase a and b in vitro. *Eur J Biochem* 6: 552-557
- Dohm GL, Tapscott EB, Pories WJ, Dabbs DJ, Flickinger EG, Meelheim D, Fushiki T, Atkinson SM, Elton CW, Caro JF (1988) An in vitro human muscle preparation suitable for metabolic studies. *J Clin Invest* 82: 486-494
- Dombrowski F, Filsinger E, Bannasch P, Pfeifer U (1996) Altered liver acini induced in diabetic rats by portal vein islet isografts resemble preneoplastic hepatic foci in their enzymic pattern. *Am J Pathol* 148: 1249-1256
- Doyle ME & Egan JM (2001) Glucagon-Like Peptide-1. *Recent Prog Horm Res* 56: 377-399
- Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF (1987) Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3434-3438
- During MJ, Cao L, Zuzga DS, Francis JS, Fitzsimons HL, Jiao X, Bland RJ, Klugmann M, Banks WA, Drucker DJ, Haile CN (2003) Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nat Med* 9: 1173-1179.
- Ebina Y, Edery M, Ellis L, Standring D, Beaudoin J, Roth RA, Rutter WJ (1985) Expression of a functional human insulin receptor from a cloned cDNA in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8014-8018.
- Edwards CM, Todd JF, Mahmoudi M, Wang Z, Wang RM, Ghatei MA, Bloom SR (1999) Glucagon-like peptide 1 has a physiological role in the control of postprandial glucose in humans: studies with the antagonist exendin 9-39. *Diabetes* 48: 86-93.
- Egan JM, Montrose-Rafizadeh CH, Wang Y, Bernier M, Roth J (1994) Glucagon-like peptide-1(7-36)amide (GLP-1) enhances insulin-stimulated glucose metabolism in 3T3-L1 adipocytes: One of several potential extrapancreatic sites of GLP-1 action. *Endocrinology* 135: 2070-2075
- Egan JM, Clocquet AR, Elahi D (2002) The insulinotropic effect of acute exendin-4 administered to humans: comparison of nondiabetic state to type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1282-1290.
- Elahi D, McAlbon-Dike M, Fukagawa NK, Meneilly GS, Sclater AL, Minaker KL, Habener JF, Andersen DK (1994) The insulinotropic actions of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (7-37) in normal and diabetic subjects. *Regul Pept* 51: 63-74

- Eng J, Kleinman WA, Singh L, Singh G, Raufman JP (1992) Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Biol Chem* 15: 7402-7405
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM (2003) Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction?. *Diabetes* 52: 1-8
- Farese RV, Sajan MP, Standaert ML (2005) Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): actions and defects in obesity and type II diabetes. *Exp Biol Med (Maywood)* 230: 593-605
- Ferré P (2007) Insulin signaling and insulin resistance. *Thérapie* 62: 277-284
- Fehse FC, Trautmann M, Holst JJ, Halseth AE, Fineman MS, Kim D (2004) Effects of exenatide on first and second phase insulin secretion in response to intravenous glucose in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 53(Suppl. 2): A 83
- Fleig WE, Noether-Fleig G, Füssgaenger R, Ditschuneit H 1984 Modulation by a sulfonylurea of insulin-dependent glycogenesis, but not of insulin binding, in cultured rat hepatocytes. *Diabetes* 33: 285-290
- Flint A, Raben A, Astrup A, Holst JJ (1998) Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J Clin Invest* 101: 515-520
- Frevert EU, Kahn BB (1997) Differential effects of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase on glucose transport, glycogen synthase activity, and DNA synthesis in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* 17: 190-198
- Freyse EJ, Knospe S, Becher T, El Hag O, Goke B, Fischer U (1999) Glucagon-like peptide-1 has no insulin-like effects in insulin-dependent diabetic dogs maintained normoglycemic and normoinsulinemic. *Metabolism* 48: 134-137
- Fukumoto H, Kayano T, Buse JB, Edwards Y, Pilch PF, Bell GI, Seino S (1989) Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transport expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *J Biol Chem* 264: 7776-7779
- Galera C, Clemente F, Alcántara A, Trapote MA, Perea A, López-Delgado MI, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I (1996) Inositolphosphoglycans and diacylglycerol are possible mediators in the glycogenic effect of GLP-1(7-36)amide in BC3H-1 myocytes. *Cell Biochem Funct* 14: 43-48
- Giroix MH, Sener A, Pipeleers Dg, Malaisse WJ (1984) Hexose metabolism in pancreatic islets. Inhibition of hexokinase. *Biochem J* 223: 447-453
- Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F, Heyneker HL, Yansura DG, Crea R, Hirose T, Kraszewski A, Itakura K, Riggs AD (1979) Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 106-110
- Göke R, Conlon JM (1988) Receptors for glucagon-like peptide-1(7-36)amide on rat insulinoma-derived cells. *J Endocrinol* 116: 357-362
- Göke R, Fehmann HC, Linn T, Schmidt H, Krause M, Eng J, Göke B (1993a) Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the

glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells. *J Biol Chem* 268:19650-19655

Göke R, Wagner B, Fehmann HC, Göke B (1993b) Glucose-dependency of the insulin stimulatory effect of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on the rat pancreas. *Res Exp Med (Berl)* 193: 97-103

Göke R, Larsen PJ, Mikkelsen JD, Sheikh SP (1995) Distribution of GLP-1 binding sites in the rat brain: evidence that exendin-4 is a ligand of brain GLP-1 binding sites. *Eur J Neurosci* 7: 2294-2300.

González N, Acitores A, Sancho V, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (2005a) Effect of GLP-1 on glucose transport and its cell signalling in human myocytes. *Regul Pept* 126: 203-211

González N, Sancho V, Martin-Duce A, Tornero-Esteban P, Valverde I, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML (2005b) GLP-1 signalling and effects on glucose metabolism in myocytes from type 2 diabetic patients. *Int J Mol Med* 16: 747-752

Goodge KA, Hutton JC. (2000) Translational regulation of proinsulin biosynthesis and proinsulin conversion in the pancreatic beta-cell. *Semin Cell Dev Biol* 11: 235–242

Goodyear LJ, Chang Py, Sherwood DJ, Dufresne SD, Moller DE (1996) Effects of exercise and insulin on mitogen-activated protein kinase signalling pathways in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 271: E403-408

Gould GW, Thomas HM, Jess TJ, Bell GI (1991) Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. *Biochemistry* 30: 5139-5145.

Greig NH, Holloway HW, De Ore KA, Jani D, Wang Y, Zhou J, Garant MJ, Egan JM (1999) Once daily injection of exendin-4 to diabetic mice achieves long-term beneficial effects on blood glucose concentrations. *Diabetologia* 42: 45-50

Guma A, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H, Klip A (1991) Insulin induces translocation of GLUT-4 glucose transporters in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 268: E613-E622

Gutniak MK, Holst JJ, arskov C, Ahren B, Efendic S (1992) Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7–36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 326: 1316-1322

Gutniak M, Linde B, Holst JJ, Effendic S (1994) Subcutaneous injection of the incretin hormone glucagon-like peptide 1 abolishes postprandial glycemia in NIDDM. *Diabetes Care* 17: 1039-1044

Gutniak M, Larsson H, Sanders SW, Juneskans O, Holst JJ, Ahren B (1997) GLP-1 tablet in type 2 diabetes in fasting and postprandial conditions. *Diabetes Care* 20: 1874-1879

Gutzwiller JP, Drewe J, Gfke B, Schmidt H, Rohrer B, Lareida J (1999) Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and reduces food intake in patients with diabetes mellitus type 2. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 276: R1541-R1544.

- Herrera R, Rosen OM (1986) Autophosphorylation of the insulin receptor in vitro. Designation of phosphorylation sites and correlation with receptor kinase activation. *J Biol Chem* 261: 11980-11985
- Hassid WZ, Abraham S (1957) Chemical procedures for analysis of polysaccharides. *Methods in Enzymology Academic Press* 3: 34-50
- Hellman BJ, Sehlin J, Täljedal IB (1971) Evidence for mediated transport of glucose in mammalian pancreatic B-cells. *Biochim Biophys Acta* 241: 147-154
- Herbert V, Lau KS, Gottlieb CW, Bleicher SJ (1965) Coated charcoal immunoassay of insulin. *J Clin Endocrinol* 25: 1375-1384
- Holst JJ, Deacon CF (1998) Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes. *Diabetes* 47: 1663-1670
- Hue L, Bontemps F, Hers HG (1975) The effect of glucose and of potassium ions on the interconversion of glycogen phosphorylase and of glycogen synthetase in isolated rat liver preparation. *Biochem J* 152: 105-114
- Hui H, Wright C, Perfetti R (2001) Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells. *Diabetes* 50: 785-796
- Hui H, Nourparvar A, Zhao X, Perfetti R (2003) Glucagon-like peptide-1 inhibits apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic 5V-adenosine monophosphate-dependent protein kinase A- and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Endocrinology* 144: 1444-1455
- Iltz JL, Baker DE, Setter SM, Keith Campbell R (2006) Exenatide: an incretin mimetic for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther* 28: 652-665
- Imamura T, Huang J, Usui I, Satoh H, Bever J, Olefsky JM (2003) Insulin-induced GLUT4 translocation involves protein kinase C-lambda-mediated functional coupling between Rab4 and the motor protein kinesin. *Mol Cell Biol* 23: 4892-4900
- Isakoff SJ, Taha C, Rose E, Marcosohn J, Klip A, Skolnik EY (1995) The inability of phosphatidylinositol 3-kinase activation to stimulate GLUT4 translocation indicates additional signaling pathways are required for insulin-stimulated glucose uptake. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10247-10251
- Ishiki M, Klip A (2005) Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners. *Endocrinology* 146: 5071-5078
- Jandeleit-Dahm KA, Tikellis C, Reid CM, Johnston CI, Cooper ME (2005) Why blockade of the renin-angiotensin system reduces the incidence of new-onset diabetes. *J Hypertens* 23: 463-473
- Jansson L, Eizirik DL, Pipeleers DG, Borg LA, Hellerstrom C, Andersson A (1995) Impairment of glucose-induced insulin secretion in human pancreatic islets transplanted to diabetic nude mice. *J Clin Invest* 96: 721-726
- Johnson JH, Ogawa A, Chen L, Orci L, Newgard CB, Alam T, Unger RH (1990) Underexpression of beta cell high Km glucose transporters in noninsulin-dependent diabetes. *Science* 250: 546-549

Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE (1967) Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med* 126: 201-205

Kahn BB (1996) Glucose transport: pivotal step in insulin action. *Diabetes* 45: 1644-1654

Kandror KV, Pilch PF (1996) Compartmentalization of protein traffic in insulin-sensitive cells. *Am J Physiol* 271: 21703-21708

Katsoyannis PG, Tometsko A, Fukuda K (1963) Insulin peptides IX: the synthesis of the A-chain of insulin and its combination with natural B-chain to generate insulin activity. *J Am Chem Soc* 85: 2863-2870

Kayano T, Fukumoto H, Eddy RL, Fan YS, Byers MG, Shows TB, Bell GI (1988) Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J Biol Chem* 263: 15245-15248

Kershaw EE, Flier JS (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2548-2556

Kieffer TJ, McIntosh CHS, Pederson RA (1995) Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* 136: 3585-3596

King N, Carroll SB (2001) A receptor tyrosine kinase from choanoflagellates: molecular insights into early animal evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 18:15032-15037

Kjems LL, Holst JJ, Volund A, Madsbad S (2003) The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion: effects on beta-cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects. *Diabetes* 52: 380-386

Kolligs F, Fehmann HC, Göke R, Göke B (1995) Reduction of the incretin effect in rats by the glucagon-like peptide-1 receptor antagonist exendin (9-39)amide. *Diabetes* 44: 16-19

Kolterman OG, Buse JB, Fineman MS, Gaines E, Heintz S, Bicsak TA, Taylor K, Kim D, Aisporna M, Wang Y, Baron AD (2003) Synthetic exendin-4 (exenatide) significantly reduces postprandial and fasting plasma glucose in subjects with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3082-3089

Koranyi L, Bourey RE, Turk J, Mueckler M, Permutt MA (1992) Differential expression of rat pancreatic islet beta-cell glucose transporter (GLUT2), proinsulin and islet amyloid polypeptide genes after prolonged fasting, insulin-induced hypoglycaemia and dexamethasone treatment. *Diabetologia* 35: 1125-1132

Krarup T, Saurbrey N, Moody AJ, Kqhl C (1998) Effect of porcine gastric inhibitory polypeptide on h-cell function in Type 1 and Type II diabetes mellitus. *Metabolism* 36: 677-682

Kreymann B, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR (1987) Glucagon-like peptide-1 (7-36): a physiological incretin in man. *Lancet* 2: 1300-1304

Krook A, Roth RA, Jiang XJ, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H. (1998) Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes* 47: 1281-1286

Laemli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Langerhans P (1869) Beiträge zur Mikroskopischen Anatomie der Bauchspeicheldrüse. *Diss. Med.* Berlin

Lankat-Buttgereit B, Göke R, Fehmann HC, Richter G, Göke B (1994) Molecular cloning of a cDNA encoding for the GLP-1 receptor expressed in rat lung. *Exp Clin Endocrinol* 4: 341-347

Larsen PJ, Holst JJ (2005) Glucagon-related peptide 1 (GLP-1): hormone and neurotransmitter. *Regul Pept* 15: 97-107

Larsson H, Holst JJ, Ahren B (1997) Glucagon-like peptide-1 reduces hepatic glucose production indirectly through insulin and glucagon in humans. *Acta Physiol Scand.* 160: 413-422

Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C (1993) Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329: 1988-1992

Opie LH (2007) Metabolic Syndrome. *Circulation* 15: 32-35

Litherland GJ, Hajduch E, Hundal HS (2001) Intracellular signalling mechanism regulating glucose transport in insulin-sensitive tissues. *Mol Membr Biol* 18: 195-204

Lund S, Holman GD, Schmitz O, Pedersen O (1995) Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5817-5821

Luque MA, González N, Márquez L, Acitores A, Redondo A, Morales M, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (2002) GLP-1 and glucose metabolism in human myocytes. *J. Endocrinol* 173: 183-189

Malaisse WJ, Sener A, Levy J (1976) The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Fasting-induced adaptation of key glycolytic enzymes in isolated islets. *J Bio Chem* 251: 1731-1737

Marger MD, Saier MH (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* 18: 13-20

Márquez L, Trapote MA, Luque MA, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (1998) Inositolphosphoglycans possibly mediate the effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on rat liver and adipose tissue. *Cell Biochem Funct* 16: 51-56

Matschisky FM, Elerman JE (1968) Metabolism of glucose in the islets of Langerhans. *J Biol Chem* 234: 2730-2736

Meier JJ, Hücking K, Holst JJ, Deacon CF, Schmiegel WH, Nauck MA (2001) Reduced insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide in first-degree relatives of patients with Type 2 diabetes. *Diabetes* 50: 2497-2504

Meneilly GS, McIntosh CH, Pederson RA, Habener JF, Gingerich R, Egan JM, Finegood DT, Elahi D (2001) Effect of glucagon-like peptide 1 on non-insulin-mediated glucose uptake in the elderly patient with diabetes. *Diabetes Care* 24:1951-1956

- Mérida E, Delgado E, Molina LM, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I (1993) Presence of glucagon and glucagon-like peptide-1-(7-36)amide receptors in solubilized membranes of human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 1654-1657
- Mering J, Minkowski O (1890) Diabetes mellitus nach Pankreasexstirpation. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 26: 371-387
- Meyer MM, Levin K, Grimmsmann T, Beck-Nielsen H, Klein HH (2002) Insulin signalling in skeletal muscle of subjects with or without Type II-diabetes and first degree relatives of patients with the disease. *Diabetologia* 45: 813-822
- Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF (1986) Preproglucagon gene expression in páncreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J Biol Chem* 261: 11880-11889
- Montrose-Rafizadeh C, Yang H, Wang Y, Roth J, Montrose MH, Adams LG (1997) Novel signal transduction and peptide specificity of glucagon-like peptide receptor in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Physiol* 172: 275-283
- Morales M, López-Delgado MI, Alcántara A, Luque MA, Clemente F, Márquez L, Puente J, Viñambres C, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I (1997) Preserved GLP-1 effects upon glycogen synthase a activity and glucose metabolism in isolated hepatocytes and skeletal muscle from diabetic rats. *Diabetes* 46: 1264-1269
- Moreno P, Nuche-Berenguer B, Arnés L, Dapía S, Esbrit P, Villanueva-Peñacarrillo ML (2008) Action of Exendin-4 on bone turnover markers in insulin-resistant state. *Diabetología* 51 (Suppl. 1), en prensa.
- Nauck M, Stfckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W (1986) Reduced incretin effect in Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 29: 46-54
- Nauck MA, Bartels E, arskov C, Ebert R, Creutzfeldt W (1993a) Additive insulinotropic effects of exogenous synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide infused at near-physiological insulinotropic hormone and glucose concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 912-917
- Nauck MA, Heimesaat MM, Arskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W (1993b) Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 91: 301-307
- Nauck MA, Niedereichholz U, Ettler R, Holst JJ, arskov C, Ritzel R (1997) Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 273: E981-E988
- Navarro M, Rodríguez de Fonseca F, Alvarez E, Chowen JA, Zueco JA, Gómez R, Eng J, Blázquez E (1996) Colocalization of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors, glucose transporter GLUT-2, and glucokinase mRNAs in rat hypothalamic cells: evidence for a role of GLP-1 receptor agonists as an inhibitory signal for food and water intake. *J Neurochem* 67: 1982-1991
- Nuche-Berenguer B, Sancho V, Cancelas J, Rodriguez-Frutos B, Esbrit P, Villanueva-Peñacarrillo ML (2007) Participation of GLP-1 in the bone remodelling process in normal and type 2 diabetic state. *Diabetología* 50 (Suppl 1) 0588: S243-S244

Nuche-Berenguer B, Moreno P, Dapía D, Esbrit P, Villanueva-Peñacarrillo ML (2008) Effect of GLP-1 on the bone remodelling in insulin resistant state. *Diabetología* 51 (Suppl 1), en prensa

Orci L, Ravazzola M, Baetens D, Imnan L, Amherdt M, Peterson RG, Newgard CB, Johnson JH, Unger RH (1990a) Evidence that down-regulation of beta-cell glucose transporters in non-insulin-dependent diabetes may be the cause of diabetic hyperglycemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9953-9957

Orci L, Unger RH, Ravazzola M, Ogawa A, Komiya I, Baetens D, Lodish HF Thorens B (1990b) Reduced beta-cell glucose transporter in new onset diabetic BB rats. *J Clin Invest* 86: 1615-1622

Orskov C, Holst JJ, Nielsen OV (1988) Effect of truncated glucagon-like peptide-1 (proglucagon-(78–107) amide) on endocrine secretion from pig pancreas, antrum, and nonantral stomach. *Endocrinology* 123: 2009-2013

Ørskov L, Holst JJ, Moller J, Ørskov C, Moller N, Alberti KG, Schmitz O (1996) GLP-1 does not acutely affect insulin sensitivity in healthy man. *Diabetologia* 39: 1227-1232

Pari L, Ashokkumar N (2005) Effect of N-benzoyl-d-phenylalanine on lipid profile in liver of neonatal streptozotocin diabetic rats. *Fundam Clin Pharmacol* 19: 563-568

Parkes DG, Pittner R, Jodka C, Smith P, Young A (2001) Insulinotropic actions of exendin-4 and glucagon-like peptide-1 in vivo and in vitro. *Metabolism* 50: 583-589

Perea A, Viñambres C, Clemente F, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I (1997) GLP-1(7-36)amide effects on glucose transport and metabolism in rat adipose tissue. *Horm Metab Res* 29: 417-421

Perfetti R, Merkel P (2000) Glucagon-like peptide-1: a mayor regulator of pancreatic beta-cell function. *Eur J Endocrinol* 143: 717-725

Perry T, Haughey NJ, Mattson MP, Egan JM, Greig NH (2002) Protection and reversal of excitotoxic neuronal damage by glucagon-like peptide-1 and exendin-4. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 881-888

Perry T, Lahiri DK, Sambamurti K, Chen D, Mattson MP, Egan JM, Greig NH (2003) Glucagon-like peptide-1 decreases endogenous amyloid-beta peptide (Abeta) levels and protects hippocampal neurons from death induced by Abeta and iron. *J Neurosci Res* 72: 603-612

Pohl M, Wank SA (1998) Molecular cloning of the helodermin and exendin-4 cDNAs in the lizard. Relationship to vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and glucagon-like peptide 1 and evidence against the existence of mammalian homologues. *J Biol Chem* 273: 9778-9784

Portha B, Picon L, Rosselin G (1979) Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. *Diabetologia* 17: 371-377

Prieto PG (2006) Papel de la dieta en la secreción y acción del glp-1 sobre la homeostasis de la glucosa. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.

- Prigeon RL, Quddusi S, Paty B, D'Alessio DA (2003) Suppression of glucose production by GLP-1 independent of islet hormones: a novel extrapancreatic effect. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 285: E701-707
- Pulido N, Romero R, Suárez AI, Rodríguez E, Casanova B, Rovira A (1996) Sulfonylureas stimulate glucose uptake through GLUT4 transporter translocation in rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 228: 499-504
- Randle PJ, England PJ, Denton RM (1970) Control of the tricarboxylate cycle and its interactions with glycolysis during acetate utilization in rat heart. *Biochem J* 117:677-95
- Randle PJ, Priestman DA, Mistry SC, Halsall A (1994) Glucose fatty acid interactions and the regulation of glucose disposal. *J Cell Biochem* 55: 1-11
- Raufman JP, Singh L, Singh G, Eng J (1992) Truncated glucagon-like peptide-1 interacts with exendin receptors on dispersed acini from guinea pig pancreas. Identification of a mammalian analogue of the reptilian peptide exendin-4. *J Biol Chem* 267: 21432-21437
- Rayner CK, Samsom M, Jones KL, Horowitz M (2001) Relationships of upper gastrointestinal motor and sensory function with glycemic control. *Diabetes Care* 24: 371-381 Review
- Reaven GM (1994) Syndrome X: 6 years later. *J Intern Med* 736: 13-22
- Redondo A, Trigo MV, Acitores A, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (2003) Cell signalling of the GLP-1 action in rat liver. *Mol Cell Endocrinol* 204: 43-50.
- Reinhold FG Müller (1932) The urinary flux of the ancient indians, Prameha. En: *Diabetes its Medical and Cultural History*. Ed.: Dietrich von Engelhardt, Springer-Verlag, pág. 161-197
- Rolla A (1994) Resistencia insulínica y desórdenes asociados. *Av Diabetol* 8: 13-36
- Rorsman P. (1997) The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia* 40: 487-495
- Roy D, Johannsson E, Bonen A, Marette A (1997) Electrical stimulation induces fiber type-specific translocation of GLUT-4 to T tubules in skeletal muscle. *Am J Physiol* 273: E688-E694
- Ruiz-Grande C, Alarcón C, Mérida E, Valverde I (1992) Lipolytic action of glucagon-like peptides in isolated rat adipocytes. *Peptides* 13: 13-16
- Rutter GA. (2001) Nutrient-secretion coupling in the pancreatic islet beta-cell: recent advances. *Mol Aspects Med* 22: 247-284
- Ryan AS, Egan JM, Habener JF, Elahi D (1998) Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1-(7-37) appears not to augment insulin-mediated glucose uptake in young men during euglycemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 83: 2399-2404
- Sancho V, Trigo MV, González N, Valverde I, Malaisse WJ, Villanueva-Penacarrillo ML (2005) Effects of glucagon-like peptide-1 and exendins on kinase activity, glucose transport and lipid metabolism in adipocytes from normal and type-2 diabetic rats. *J Mol Endocrinol* 35: 27-38

- Sancho V, Trigo ML, Martín-Duce A, González N, Acitores A, Arnés L, Valverde I, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML (2006) Effect of GLP-1 on D-glucose, lipolysis and lipogenesis, in adipocytes of obese subjects. *Int J Mol Med* 17: 1133-1137
- Sancho V, Nuche B, Arnés L, Cancelas J, González N, Díaz-Miguel M, Martín-Duce A, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (2007a) The action of GLP-1 and exendins upon glucose transport in normal human adipocytes, and on kinase activity as compared to morbidly obese patients. *Int J Mol Med* 19: 961-966
- Sancho V, Nuche-Berenguer B, Arnés L, Esbrit P, Villanueva-Peñacarrillo ML (2007b) Effect of Exendin-4 upon bone remodelling in normal and type 2 diabetic rats. *Diabetología (Suppl. 1)*: 0588, S243-244
- Sandhu H, Wiesenthal SR, MacDonald PE, McCall RH, Tchipashvili V, Rashid S, Satkunarajah M, Irwin DM, Shi ZQ, Brubaker PL, Wheeler MB, Vranic M, Efendic S, Giacca A (1999) Glucagon-like peptide 1 increases insulin sensitivity in depancreatized dog. *Diabetes* 48: 1045-1053
- Sanger F (1959) Chemistry of insulin. *Science* 29: 1340-1344
- Sanz C, Vázquez P, Navas MA, Alvarez E, Blázquez E (2008) Leptin but not neuropeptide Y up-regulated glucagon-like peptide 1 receptor expression in GT1-7 cells and rat hypothalamic slices. *Metabolism* 57(1): 40-48
- Sener A, Malaisse-Lagae F, Giroix MH, Malaisse WJ (1986) Hexose metabolism in pancreatic islets: compartmentation of hexokinase in islet cells. *Arch Biochem Biophys* 251: 61-67
- Shalev A, Ninnis R, Keller U (1998) Effects of glucagon-like peptide 1 (7-36)amide on glucose kinetics during somatostatin-induced suppression of insulin secretion on healthy men. *Horm Res* 49: 221-225
- Shepherd PR, Nave BT, Rincon J, Haigh RJ, Foulstone E, Proud C, Zierath JR, Siddle K, Wallberg-Henriksson H (1997) Involvement of phosphoinositide 3-kinase in insulin stimulation of MAP-kinase and phosphorylation of protein kinase-B in human skeletal muscle: implications for glucose metabolism. *Diabetologia*: 40: 1172-1177
- Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 333: 471-490
- Shipp J, Opie LH, Challoner DR (1961) Fatty acid and glucose metabolism in the perfused heart. *Nature* 189: 1018-1019
- Smith SR (1996) The endocrinology of obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 25: 921-942
- Smith U (2002) Impaired ('diabetic') insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance--is insulin resistance initiated in the adipose tissue?. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 897-904
- Stephens FB, Constantin-Teodosiu D, Greenhaff PL (2007) New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J Physiol* 1: 431-444

- Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF (2000) Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes* 49: 741-748
- Suzuki K, Kono T (1993) Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2452-2455
- Syvanne M, Taskinen MR (1997) Lipids and lipoproteins as coronary risk factors in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 350 (suppl 1): S120-S123
- Szayna M, Doyle ME, Betkey JA, Holloway HW, Spencer RG, Greig NH, Egan JM (2000) Exendin-4 decelerates food intake, weight gain, and fat deposition in Zucker rats. *Endocrinology* 141: 1936-1941
- Taha C, Klip A (1999) The insulin signalling pathway. *J Membr Biol* 169: 1-12
- Tal M, Khan BB, Lodish HF (1991) Expression of the low Km GLUT-1 glucose transporter is turned on in perivenous hepatocytes of insulin-deficient diabetic rats. *Endocrinology* 129: 1933-1941
- Thorens B, Sarkar MK, Kaback HR, Lodish HF (1988) Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney and pancreatic islets. *Cell* 55: 281-290.
- Thorens B, Flier JS, Lodish HF, Kahn BB (1990a) Differential regulation of two glucose transporters in rat liver by fasting and refeeding and by diabetes and insulin treatment. *Diabetes* 39: 712-719
- Thorens B, Weir GC, Leahy JL, Lodish HF, Bonner WS (1990b) Reduced expression of the liver/beta-cell glucose transporter isoform in glucose-insensitive pancreatic beta cells of diabetic rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6492-6496
- Thorens B (1992a) Molecular and cellular physiology of Glut2, a high-Km facilitated diffusion glucose transporter. En, *Molecular Biology of Receptors and Transporters: Bacterial and Glucose Transporters*. Friedlander, M., Mueckler, M. (eds.) *Academic Press, San Diego*, pág. 209-238
- Thorens B (1992b) Expression cloning of the pancreatic beta-cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8641-8645
- Toft-Nielsen MB, Madsbad S, Holst JJ (1996) The effect of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) on glucose elimination in healthy subjects depends on the pancreatic glucoregulatory hormones. *Diabetes* 45: 552-556
- Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, Hilsted LM, Hughes TE, Michelsen BK (2001) Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3717-3723.
- Tormo MA, Gil-Exojo I, Romero de Tejada A, Campillo JE (2006) White bean amylase inhibitor administered orally reduces glycaemia in type 2 diabetic rats. *Br J Nutr* 96: 539-544
- Tourrel C, Bailbé D, Meile MJ, Kergoat M, Portha B (2001) Glucagon-like peptide-1 and exendin-4 stimulate beta-cell neogenesis in streptozotocin-treated newborn rats

resulting in persistently improved glucose homeostasis at adult age. *Diabetes* 50: 1562-1570

Tourrel C, Bailbe D, Lacorne M, Meile MJ, Kergoat M, Portha B (2002) Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the beta-cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4. *Diabetes* 51: 1443-1452

Trapote MA, Clemente F, Galera C, Morales M, Alcántara AI, López-Delgado MI, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I (1996) Inositol-phosphoglycans are possible mediators of the glucagon-like peptide-1(7-36)amide action in the liver. *J Endocrinol Invest* 19: 114-118

Tremblay F, Gagnon A, Veilleux A, Sorisky A, Marette A (2005) Activation of the mammalian target of rapamycin pathway acutely inhibits insulin signaling to Akt and glucose transport in 3T3-L1 and human adipocytes. *Endocrinology*: 146: 1328-1337

Turner NC, Clapham JC (1998) Insulin resistance, impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes, pathologic mechanisms and treatment: current status and therapeutic possibilities. *Prog Drug Res* 51: 33-94

Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao YC, Tsubokawa M, Mason A, Seeburg PH, Grunfeld C, Rosen OM, Ramachandran J (1985) Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313: 756-761

Unger RH, Aguilar-Parada E, Müller W, Eisentraut AM (1970) Studies of pancreatic  $\alpha$  cell function in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* 49: 837-848

Unger RH (1991) Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic beta cells. *Science* 251: 1200-1205

Uttenthal LO, Blázquez E (1990) Characterization of the gastric receptor for truncated glucagon-like peptide-1 in the rat. *FEBS Lett* 262: 139-141

Uttenthal LO, Toledano A, Blázquez E (1992) Autoradiographic localization of receptors for glucagon-like peptide-1(7-36)amide in rat brain. *Neuropeptides* 21: 143-146

Valverde I, Barreto M, Malaisse WJ (1988) Stimulation by D-glucose of protein biosynthesis in tumoral insulin-producing cells (RINm5F line). *Endocrinology* 122: 1443-1448

Valverde I, Mérida E, Delgado E, Trapote MA, Villanueva-Peñacarrillo ML (1993) Presence and characterization of glucagon-like peptide-1(7-36)amide receptors in solubilized membranes of rat adipose tissue. *Endocrinology* 132: 75-79

Valverde I, Morales M, Clemente F, López-Delgado MI, Delgado E, Perea A, Villanueva-Peñacarrillo ML (1994) Glucagon-like peptide 1: a potent glycogenic hormone. *FEBS Letters* 349: 313-316

Valverde I, Puente J, Martin-Duce A, Molina L, Lozano O, Sancho V, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML (2005) Changes in glucagon-like peptide-1 (GLP-1) secretion after biliopancreatic diversion or vertical banded gastroplasty in obese subjects. *Obes Surg* 15: 387-397

- Vella A, Shah P, Basu R, Basu A, Holst JJ, Rizza RA (2000) Effect of glucagon-like peptide 1(7-36) amide on glucose effectiveness and insulin action in people with type 2 diabetes. *Diabetes* 49: 611-617
- Vella A, Shah P, Basu R, Basu A, Camilleri M, Schwenk WF, Rizza RA (2001) Type I diabetes mellitus does not alter initial splanchnic glucose extraction or hepatic UDP-glucose flux during enteral glucose administration. *Diabetologia* 44: 729-737
- Villanueva-Peñacarrillo ML, Alcántara AI, Clemente F, Delgado E, Valverde I (1994a) Potent glycogenic effect of GLP-1(7-36)amide in rat skeletal muscle. *Diabetologia* 37: 1163-1166
- Villanueva-Peñacarrillo ML, Mérida E, Delgado E, Molina LM, Arrieta F, Rovira A, Valverde I (1994b) Increased glucagon-like peptide 1 (7-36) amide binding in adipose tissue from non-insulin dependent and insulin-dependent diabetic patients. *Diab Nutr Metab* 7: 143-148
- Villanueva-Peñacarrillo ML, Delgado E, Trapote MA, Alcántara A, Clemente F, Luque MA, Perea A, Valverde I (1995) Glucagon-like peptide-1 binding to rat hepatic membranes. *J Endocrinol* 146: 183-189
- Villanueva-Peñacarrillo ML, Puente J, Redondo A, Clemente F, Valverde I (2001) Effect of GLP-1 treatment on GLUT2 and GLUT4 expression in type 1 and type 2 rat diabetic models. *Endocrine* 15: 241-248
- Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ (2001) Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagonlike peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 50: 609-613
- Wang Y, Egan JM, Raygada M, Nadiv O, Roth J, Montrose-Rafizadeh C (1995) Glucagon-like peptide-1 affects gene transcription and messenger ribonucleic acid stability of components of the insulin secretory system in RIN 1046-1038 cells. *Endocrinology* 136: 4910-4917
- Wang Y, Kole HK, Montrose-Rafizadeh C, Perfetti R, Bernier M, Egan JM (1997) Regulation of glucose transporters and hexose uptake in 3T3-L1 adipocytes: glucagon-like peptide-1 and insulin interactions. *J Mol Endocrinol* 19: 241-248
- Watson RT, Pessin JE (2006) Bridging the GAP between insulin signaling and GLUT4 translocation. *Trends Biochem Sci*: 31: 215-222
- Wheeler MB, Lu M, Dillon JS, Leng WH, Chen CH, Boyd AE (1993) Functional expression of the rat glucagon-like peptide-I receptor, evidence for coupling to both adenylyl cyclase and phospholipase-C. *Endocrinology* 133: 57-62
- Weinstein SP, O'Boyle E, Fisher M, Haber RS (1994) Regulation of GLUT2 glucose transporter expression in liver by thyroid hormone: evidence for hormonal regulation of the hepatic glucose transport system. *Endocrinology* 135: 649-654
- Wettergren A, Schjoldager B, Mortensen PE, Myhre J, Christiansen J, Holst JJ (1993) Truncated GLP-1 (proglucagon 78–107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man. *Dig Dis Sci* 38: 665–673
- Wilkinson SE, Parker PJ, Nixon JS (1993) Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. *Biochem J* 294: 335-337

- Willms B, Werner J, Holst JJ, Arskov C, Creutzfeldt W, Nauck MA (1996) Gastric emptying, glucose responses, and insulin secretion after a liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-(7–36) amide in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 327–332
- Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S (1999) Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 48: 2270-2276
- Yang H, Egan JM, Wang Y, Moyes CD, Roth J, Montrose MH, Montrose-Rafizadeh C (1998) GLP-1 action in L6 myotubes is via a receptor different from the pancreatic GLP-1 receptor. *Am J Physiol* 275: 675-683
- Young AA, Gedulin BR, Bhavsar S, Bodkin N, Jodka C, Hansen B, Denaro M (1999) Glucose-lowering and insulin-sensitizing actions of exendin-4: studies in obese diabetic (ob/ob, db/db) mice, diabetic fatty Zucker rats, and diabetic rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Diabetes* 48: 1026-1034.
- Young AA (2002) Glucagon-like peptide-1, exendin and insulin sensitivity. En, *Insulin Resistance and Insulin Resistance Syndrome*. Ed.: Hansen B, Shafrir E. Harwood Academic, New York. pág. 235-262.
- Zander M, Madsbad S, Madsen JL, Holst JJ (2002) Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet* 359: 824-830
- Zhou QL, Jiang ZY, Holik J, Chawla A, Hagan GN, Leszyk J, Czech MP (2008) Akt substrate TBC1D1 regulates GLUT1 expression through the mTOR pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* 411: 647-655
- Zorzano A, Wilkinson W, Kotliar N, Thoidis G, Wadzinski BE, Ruoho AE, Pilch PF (1989) Insulin-regulated glucose uptake in rat adipocytes is mediated by two transporter isoforms present in at least two vesicle populations. *J Biol Chem* 264: 12358-12363

## ABREVIATURAS

AA	aminoácido
ADP	adenosín difosfato
AGL	ácido graso libre
Akt	proteína quinasa B
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
AMPK	quinasa dependiente de AMPc
ANOVA	análisis de la varianza
ATP	adenosín trifosfato
BSA	albúmina de suero bovino
CAT	ciclo de los ácidos tricarbónicos
CE	célula endotelial
CH	carbohidrato
CHO	ovario de hamster chino
Ci	curio
CoA	Coenzima A
CRP	proteína C-reactiva
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPP-IV	dipeptidil peptidasa
DT2	modelo diabetes tipo 2 generado con streptozotocina al nacer
EDTA	ácido etilén-diaminotetraacético
EEM	error estándar de la media
EGTA	ácido etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético
ERK	quinasas reguladas extracelularmente
Ex-4	exendina 4
Ex-9	exendina 9
FBS	suero fetal bovino
GHRH	hormona liberadora de la hormona del crecimiento
GIP	péptido secretor de insulina dependiente de glucosa
GLP	glucagon-like peptide
GLUT	transportador de glucosa
GRPP	péptido pancreático relacionado con la glicentina
GSa	glucógeno sintasa a
GSK3	glucógeno sintasa quinasa-3
H	hombre
H-7	1-(5-isoquinolinesulfonil)-2-metipiperazina

HDL.....	lipoproteína de alta densidad
HEPES.....	ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil]-etanosulfónico
IBMX.....	3-isobutil-metilxantina
IgG.....	inmunoglobulina G
IL.....	interleuquina
IMC.....	índice de masa corporal
Ins.....	insulina
IPG.....	inositolfosfoglicano
IRS.....	sustrato del receptor de insulina
K.....	coeficiente de utilización de glucosa
kDa.....	kilodalton
KRB.....	tampón Krebs Ringer bicarbonato
LDL.....	lipoproteína de baja densidad
LSD.....	Least Significant Differences
M.....	molaridad
MAPK.....	proteínas quinasas mitogénicamente activas
MEK.....	quinasa de MAP/ERK
MPGF.....	fragmento mayor del proglucagón
mTOR.....	mammalian target of rapamycin
N.....	normal
NAD.....	nicotinamida adenina dinucleótido
NADH.....	nicotinamida adenina dinucleótido reducido
AGNE.....	ácido graso no esterificado
P.....	probabilidad
p70s6k.....	proteína quinasa ribosomal de 70 kDa
p90s6k.....	proteína quinasa ribosomal de 90 kDa
PBS.....	tampón fosfato salino
PC.....	proteína convertasa de hormona
PDK.....	proteína quinasa dependiente de 3'fosfoinositol
PG.....	proglucagón
PI3K.....	fosfatidilinositol 3-quinasa
PIP <sub>2</sub> .....	fosfatidilinositol 2-fosfato
PIP <sub>3</sub> .....	fosfatidilinositol 3-fosfato
PKB.....	proteína quinasa B
PKC.....	proteína quinasa C
PMSF.....	fluoruro de fenilsulfonilmetano
PP-1.....	proteína fosfata 1
PP-2.....	proteína fosfatasa-2A

---

PPAR- $\gamma$	receptor nuclear gamma activado por proliferadores de peroxisoma
PTH	hormona paratiroidea
Ra IL-1	antagonista del receptor de IL-1
Rab4	proteína 4 vinculada con Ras
ROS	especies reactivas de oxígeno
SDS	dodecil sulfato sódico
SH2	dominio con homología a src
SPSS	Statistical Package for the Social Science
SS	solvente de sustrato
STZ	estreptozotocina
T <sub>3</sub>	Triiodotironina
TBS	tampón tris-salino
TBS-LD	tampón tris-salino con leche desnatada
TBS-T	tampón tris-salino con Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetra metil-etilendiamida
TGF- $\beta$	factor de crecimiento tumoral $\beta$
TLC	cromatografía en capa fina
TNF- $\alpha$	factor de necrosis tumoral $\alpha$
UIC	unidades inhibitoras de caliceína
VIP	péptido intestinal vasoactivo
$\alpha$ -GDH	$\alpha$ -glicerofosfatodeshidrogenasa
$\Delta$	incremento