

Respuesta de la somatostatina plasmática y retiniana a la hipoglucemia insulínica en ratas diabéticas y controles

C. Ariznavarreta* y R. Fernández-Durango

Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense
28040-Madrid (España)

(Recibido el 6 de mayo de 1988)

C. ARIZNAVARRETA and R. FERNANDEZ-DURANGO. *The Somatostatin Response to Insulin-Induced Hypohlycemia in Diabetic and Control Rats*. Rev. esp. Fisiol., 45 (1), 65-70, 1989.

Changes in plasmatic levels and retinal content of somatostatin after insulin-induced hypoglycemia were investigated in three different groups of animals: Control group (C), Diabetic untreated group (D); and, Insulin-treated diabetic group (DI). In addition, another group of animals, not submitted to hypoglycemia, was used as control reference of retinal prehypoglycemic content of somatostatin (group B). Plasmatic basal levels of somatostatin were slightly higher in group DI, and significantly higher in group C, whereas they did not show any differences in group D and DI after hypoglycemia, being significantly higher in group C. The somatostatin retinal content is similar in animals not subjected to hypoglycemia and in the C and DI groups after hypoglycemia, where the rats of the D groups showed significantly higher values than the remainder of the experimental groups, an effect that is also evident in non-treated diabetic animals, even if they are not subjected to hypoglycemia. Summing up, the plasmatic somatostatin response to insulin-induced hypoglycemia is impaired in diabetic rats. Retinal somatostatin content is unchanged after hypoglycemia.

Key words: Somatostatin, Hypoglycemia, Diabetic rats.

En la diabetes mellitus existe junto a la alteración de las células B (secretoras de insulina) un aumento anormal del número de células D (secretoras de somatostatina), tanto en la enfermedad espontánea (8, 10) como en la inducida experimentalmente (11, 17, 18, 20). La secreción de somatostatina va aumentando en la diabetes no

tratada y llega a ser siete veces mayor que la de los individuos control (21).

Tanto la hiperglucemia (5, 13) como la hiperglucagonemia (22, 30) y la propia insulina (3, 14) estimulan la secreción de somatostatina. En los individuos diabéticos recién diagnosticados o no tratados, los niveles basales de somatostatina plasmática están elevados, y se reducen con el apropiado tratamiento insulínico (24). En

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

los diabéticos insulín-dependientes la respuesta de somatostatina a la ingesta es exagerada (4).

Se ha demostrado previamente (2) que tanto los niveles plasmáticos como el contenido retiniano de somatostatina, en ratas, aumentan en la diabetes no tratada, mientras que la situación se normaliza con un correcto tratamiento con insulina.

Existen por tanto cambios evidentes en la secreción de somatostatina en los individuos diabéticos, aunque la causa y/o consecuencias de esta alteración está aún por aclarar.

El interés del presente trabajo ha sido investigar el comportamiento de la somatostatina plasmática y retiniana durante la hipoglucemia insulínica aguda, tanto en ratas normales como en animales diabéticos, tratados y sin tratar.

Material y Métodos

Animales. — Se usaron ratas Wistar machos de aproximadamente 150 g de peso, mantenidas en condiciones constantes de temperatura (22 °C) y ciclos de luz-oscuridad de 12 h. El acceso al agua y comida era libre.

Los animales se dividieron en varios grupos experimentales: ratas controles (grupo C); ratas experimentalmente diabéticas por inyección intracardíaca de estreptozotocina (65 mg/kg) seis semanas antes del experimento (grupo D); ratas diabéticas, similares a las del grupo anterior, tratadas diariamente con insulina de acción retardada (Monotard M.C. Novo) en dosis de 3-5 UI/kg/24 h (grupo DI). La insulina era inyectada por vía s.c., a las 18 h, dado el hábito nutricional nocturno de los animales. El estudio evolutivo de los diversos grupos de animales se hizo con parámetros como peso, glucosurias y glucemias de los animales.

Un cuarto grupo de ratas no sometido a hipoglucemia fue utilizado como control de contenido retiniano de somatostatina sin hipoglucemia (grupo B). La inducción

de la hipoglucemia insulínica se llevó a cabo mediante la inyección s.c. de insulina cristalina (Actrapid Mc Novo) en dosis de 25 UI/kg en las ratas normoglicémicas (grupos C y DI) que recibieron 4-6 UI/animal, y de 75 UI/kg en las ratas hiperglicémicas (grupo D) que recibieron 12-16 UI/animal.

La inyección tuvo lugar a las 8 horas y al cabo de aproximadamente 3 horas, cuando los animales presentaron síntomas de hipoglucemia (temblor, convulsiones) fueron sacrificados.

Muestras. — Antes de ser inducida la hipoglucemia, se extrajo sangre de una de las venas yugulares a nivel de la clavícula del animal, ligeramente anestesiado con éter (tras haber comprobado que los niveles plasmáticos de somatostatina eran semejantes en ratas no anestesiadas). El día de la decapitación del animal, se recogió toda la sangre troncular.

A las ratas decapitadas se les enuclearon ambos globos oculares y las retinas fueron diseccionadas mediante visualización con una lupa de luz incorporada (Wilo-Heervrugg, 31 aumentos). Posteriormente, cada retina fue homogeneizada en ácido acético 2 N (0,6 ml/retina) siendo sometida la solución resultante a ebullición durante 10 min, decantada y liofilizada. Estas muestras fueron disueltas en el tampón del RIA el día que fueron valoradas.

Métodos analíticos. — La extracción de somatostatina plasmática se llevó a cabo recogiendo la sangre de los animales en tubos que contenían 1,2 mg de EDTA y 500 U de aprotinina/ml de sangre. El plasma fue inmediatamente separado por centrifugación a 3.000 g durante 15 min, a 4 °C. La somatostatina se extrajo por el método de ARIMURA *et al.* (1), siendo la recuperación de somatostatina sintética (20-100 pg/ml) añadida al plasma de $82 \pm 4\%$ (SEM; n = 8).

La determinación de somatostatina se llevó a cabo mediante RIA (25) usando

anticuerpo específico obtenido en nuestro laboratorio a una dilución final de 1:50.000.

Las glucemias se determinaron por el método de la glucosa oxidasa (Boehringer-Manheim) y para las proteínas se siguió el método de LOWRY *et al.* (16).

El estudio comparativo de las muestras se realizó mediante la aplicación del test de la *t* de Student (32).

Resultados

Somatostatina plasmática. — En la figura 1 se observan los niveles plasmáticos de somatostatina antes y después de la inyección subcutánea de insulina de acción rápida.

En ratas controles los valores previos a la hipoglucemia son de $40,6 \pm 8,4$ pg/ml, y tras la hipoglucemia son de $65,5 \pm 1,6$ pg/ml, siendo este aumento estadísticamente significativo.

En el grupo diabético no tratado, los valores basales de somatostatina plasmática fueron significativamente más elevados que en el grupo control ($124 \pm 15,4$

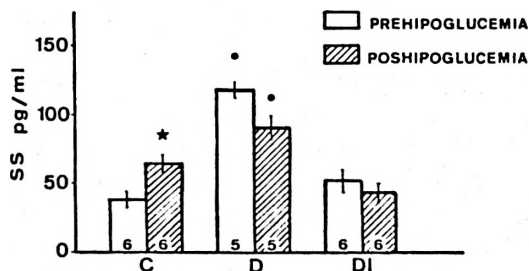


Fig. 1. Efecto de la inyección de insulina cristalina sobre los niveles plasmáticos de somatostatina en ratas controles (C), diabéticas sin tratar (D) y ratas diabéticas tratadas con insulina (DI).

* $P < 0,01$ respecto a los valores prehipoglucemia de su respectivo grupo. * $P < 0,001$ respecto al valor basal obtenido en el grupo control. Los números incluidos en las barras indican el número de animales.

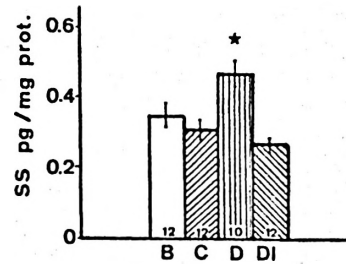


Fig. 2. Contenido retiniano de somatostatina en condiciones basales (B) y tras la inducción de hipoglucemia insulínica en ratas control (C), diabéticas sin tratamiento (D) y diabéticas tratadas diariamente con insulina (DI).

* $P < 0,01$ respecto al valor prehipoglucemia. Los números incluidos en las barras representan el número de retinas.

vs $40,6 \pm 8,4$ pg/ml). Tras la administración de insulina cristalina, la somatostatina descendió respecto a los valores basales, obteniéndose niveles de $95,2 \pm 21,5$ pg/ml, diferencia que no alcanzó significación estadística.

En ratas diabéticas tratadas diariamente con insulina retardada se obtuvieron valores basales de somatostatina plasmática de 62 ± 12 pg/ml, valor que es significativamente mayor ($P < 0,05$) al valor obtenido en ratas controles ($40,6 \pm 8,4$ pg/

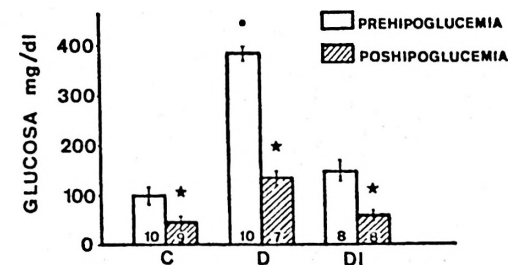


Fig. 3. Efecto de la inyección de insulina cristalina sobre los niveles plasmáticos de glucosa en ratas control (C), diabéticas sin tratamiento (D) y diabéticas tratadas diariamente con insulina (DI).

* $P < 0,01$ respecto al valor prehipoglucemia. * $P < 0,001$ respecto al valor basal obtenido en el grupo control. Los números incluidos en las barras indican el número de ratas.

ml). No hubo diferencia significativa con los valores de somatostatina plasmática obtenidos tras la inducción de la hipoglucemia.

Contenido de somatostatina en retina.

— Las ratas control tras la hipoglucemia muestran contenido retiniano de somatostatina semejante al que tienen las ratas no sometidas a hipoglucemia (fig. 2).

En el grupo D, la somatostatina retiniana tras la hipoglucemia fue de $0,49 \pm 0,04$ pg/mg de proteína, valor superior al obtenido en el grupo control.

En las ratas diabéticas tratadas se obtuvieron valores de somatostatina retiniana tras la hipoglucemia de $0,29 \pm 0,10$ pg/mg de proteína, nivel comparable a la obtenida en ratas no tratadas.

Glucemias. — Como se observa en la figura 3 la inyección s.c. de insulina cristalina produjo un descenso significativo de los niveles plasmáticos de glucosa, respecto a los valores basales en cada grupo experimental.

Discusión

El descenso súbito de la concentración de glucosa plasmática provoca la secreción de numerosas hormonas, como la GH (23), el cortisol (15), el glucagón (10) y las hormonas adrenérgicas, epinefrina y norepinefrina (7). En nuestro estudio, se ha encontrado en los animales controles una elevación de los niveles circulantes de somatostatina tras la hipoglucemia insulínica.

Semejantes observaciones, en humanos (26, 27) muestran un aumento de los niveles de somatostatina plasmática tras la hipoglucemia insulínica en individuos normales, aumento que no parece deberse al estrés que conlleva la hipoglucemia, ya que el estrés quirúrgico no altera los niveles de somatostatina plasmática (27). Tampoco hay una correlación en tiempo

ni en magnitud entre el incremento de somatostatina y el resto de las hormonas que se movilizan durante la hipoglucemia, no pudiendo concluirse que alguna de ellas fuera responsable directa de los cambios obtenidos en la secreción de somatostatina.

Por otra parte, no parece probable que la insulina sea directamente la responsable del aumento plasmático de somatostatina, ya que se ha comprobado que si la inducción de hipoglucemia mediante la infusión de insulina se realiza simultáneamente con cierta cantidad de dextrosa, los niveles de somatostatina no experimentan el aumento que se observa cuando se infunde insulina sola (28).

Por todo ello, el mecanismo responsable del aumento de somatostatina tras la hipoglucemia insulínica está aún por aclarar, aunque GLASER *et al.* (9) han demostrado que depende de la integridad del nervio vago.

Otro hallazgo de nuestro trabajo es que los animales diabéticos, tanto tratados con insulina como sin tratar, no presentaron la elevación de los niveles plasmáticos de somatostatina, que se observa en los controles tras la hipoglucemia. Este mismo resultado fue obtenido por VINIK *et al.* (26) en sujetos no insulino dependientes, cuya secreción de somatostatina, fue independiente de su grado de neuropatía. Sin embargo, HILSTED *et al.* (12) encontraron que, tras la hipoglucemia insulínica, los individuos diabéticos afectados de neuropatía no mostraron el aumento de los niveles plasmáticos de somatostatina, glucagón ni de polipéptido pancreático que presentaron los diabéticos sin neuropatía. Estos resultados contradictorios ponen en duda la influencia de la integridad del sistema nervioso autónomo sobre la secreción de somatostatina.

En ratas diabéticas no tratadas con insulina, la respuesta del glucagón a la hipoglucemia insulínica va disminuyendo conforme avanza la duración de la diabetes y el tratamiento continuo no mejora esta

respuesta (19). Este resultado es importante en relación a nuestros resultados, ya que el glucagón ejerce un papel estimulante sobre la secreción de somatostatina (22, 29).

Respecto al contenido retiniano de somatostatina, las ratas controles y las diabéticas tratadas diariamente con insulina presentan, tras la hipoglucemia insulínica, valores equiparables de somatostatina al de los animales que no han sufrido ningún tipo de manipulación. Sólo en las ratas diabéticas que no han sido tratadas con insulina diariamente se encuentran niveles significativamente elevados de somatostatina en retina tras la hipoglucemia. Previamente describimos (2) que los niveles de somatostatina retiniana están aumentados en la diabetes mellitus no tratada, lo cual sugiere que este aumento no se debe a la hipoglucemia en sí, sino a que el contenido de somatostatina estaba ya previamente aumentado y no llega a sufrir cambios por efecto de la hipoglucemia. Esto se debe posiblemente al corto período de tiempo en el que el descenso de la glucemia tiene lugar (120-180 min), intervalo en el que la somatostatina retiniana, dado su lento *turnover*, que es de unos 25 femtomoles/hora (31), no llega a experimentar cambios importantes en su contenido.

En conclusión, la hipoglucemia insulínica en ratas normales produce un aumento significativo de los niveles de somatostatina plasmática. Este incremento no se produce tras la hipoglucemia en las ratas diabéticas, tanto tratadas diariamente con insulina, como sin tratar. El contenido retiniano de somatostatina no varía en respuesta a una situación de hipoglucemia aguda.

Agradecimientos

Los autores agradecen la asistencia técnica recibida de L. Krauss, P. Calvo y A. Arroyo. Asimismo, agradecen la generosa donación de la insulina, a los Laboratorios Novo. Este trabajo pudo llevarse a cabo gracias a la ayuda del F.I.S. (n.º 713/83).

Resumen

Se estudia la respuesta de la somatostatina plasmática y retiniana a la hipoglucemia aguda inducida por insulina en ratas controles (grupo C), ratas diabéticas sin tratar (grupo D) y ratas diabéticas tratadas diariamente con insulina (grupo DI). Además, otro grupo de animales no sometido a hipoglucemia (grupo B), sirve como control de contenido de somatostatina en retina en condiciones basales. Los valores plasmáticos basales de somatostatina son ligeramente mayores en el grupo DI y significativamente en el grupo C. El contenido de somatostatina en retina es semejante en los animales no sometidos a hipoglucemia y en los grupos C y DI tras la hipoglucemia, en donde las ratas del grupo D muestran valores significativamente mayores que en el resto de los grupos experimentales, efecto también evidente en los animales diabéticos sin tratar, aun sin ser sometidos a hipoglucemia. En conclusión, las ratas diabéticas, tratadas o no con insulina, tienen una respuesta de la somatostatina plasmática a la hipoglucemia insulínica significativamente menor que la de las ratas controles. El contenido retiniano de somatostatina no varía significativamente tras la hipoglucemia.

Palabras clave: Somatostatina, Hipoglucemia insulínica, Ratas diabéticas.

Bibliografía

1. Arimura, A., Lundqvist, G., Rothman, J., et al.: *Metabolism* 27, 1.139-1.144, 1978.
2. Ariznavarreta, C. y Fernández-Durango, R.: *J. Endocr.*, 114, 363-369, 1987.
3. Berelowitz, M., Dudlak, D. y Frohman, L. A.: *J. Clin. Invest.*, 69, 1.293-1.301, 1982.
4. Christensen, S. E., Schmitz, O., Hansen, A. P. y Orson, H.: *International Symposium of Somatostatin*. Atenas, 1981, Abst. 24.
5. Efendic, S., Nysten, A. y Roovete, A.: *FEBS Lett.*, 92, 33-35, 1978.
6. Ferner, H.: *Virchows. Arch. Pathol. Anat.*, 309, 87-136, 1942.
7. Gautier, C., Vranic, M. y Hetenyi Jr. G.: *Am. J. Physiol.*, 238, E131-E140, 1980.
8. Gepts, W.: *Diabetes*, 14, 619-633, 1965.
9. Glaser, B., Vinik, A. I., Valtysson, G. y Zoghlin G.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 52, 823-825, 1981.
10. Goldfein, A., Moore, R., Zileli, S., Havens, L. L., Boling, L. y Torn, G. W.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 21, 296-304, 1961.

11. Hellman, B. y Petersson, B.: *Endocrinology*, 72, 238-242, 1963.
12. Hilsted, J., Madsbad, S., Krarup, T., Tronier, B., Galbo, H., Sestoft, L. y Schwatz, T. W.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 54, 815-819, 1982.
13. Ipp, E., Dobbs, R. y Arimura A.: *J. Clin. Invest. Metab.*, 60, 760-765, 1977.
14. Kobayashi, R., Takahashi, Y. y Yohshita, T.: *Arch. Histol. Jpn.*, 25, 199-216, 1964.
15. Landon, J., Wynn, V. y James, V. H. T.: *J. Endocrinol.*, 27, 183-187, 1963.
16. Lowry, M. O., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall R. J.: *J. Biol. Chem.*, 53, 265-275, 1951.
17. Makino, H., Matsushima, Y. y Kanatsuda, A.: *Endocrinology*, 104, 243-247, 1979.
18. Mc Evoy, R. C. y Hegre, O. D.: *Diabetes* 26, 1.140-1.146, 1977.
19. Patel, D. G.: *Diabetes*, 32, 55-60, 1983.
20. Patel, Y. C. y Bankier D. A.: *Endocrinology*, 103, 917-923, 1978.
21. Patel, Y. C. y Weir, G.: *Clin. Endocrinol.*, 5, 191-194, 1976.
22. Patton, G., Ipp, E., Dobbs, R., Orci, L., Vale, W. y Unger, R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74, 21-40, 1977.
23. Roth, J., Glick, S. M., Yalow, R. S. y Berson, S.A.: *Science*, 140, 987-988, 1963.
24. Schusdzarra, V., Dobbs, R.E., Harris, V. y Unger, R. H.: *FEBS Lett.*, 81, 69-72, 1977.
25. Torres, I., Guaza, C., Fernández-Durango, R., et al.: *Neuroendocrinology* 35, 159-162, 1982.
26. Vinik, A. I., Ievitt, N. S., Pimston, B. L. y Wagner, L.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 52, 330-337, 1981.
27. Wass, J. A. H., Penman, E., Medbak, S., et al.: *Clin. Endocrinol.*, 12, 269-275, 1980.
28. Webb, S., Levy, I., Wass, J. A. H., et al.: *Clin. Endocrinol.*, 21, 667-670, 1984.
29. Weir, G., Samols, E., Day, J. y Patel, Y.: *Metabolism.*, 27 (suppl. 1), 1.223-1.226, 1978.
30. Weir, G., Samols, E., Loo, S., Patel, Y. y Gabbay, K.: *Diabetes*, 28, 35-40, 1979.
31. Yamada, T. y Basinger, S.: *J. Neurochem.*, 39, 1.539-1.546, 1982.
32. Yamane, T.: *Statistics: an introductory analysis*. Harper and Row, Nueva York, 1970.