

Laboratorio de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona
(Prof. F. Ponz)

Acción hiperglucemiante de los extractos de nódulos pancreáticos endocrinos en el atún

por
J. Planas * y M. Lluch

(Recibido para publicar el 2 de diciembre de 1956)

En un trabajo anterior (2) hemos estudiado la presencia de un factor hiperglucemiante (glucagón) en los extractos insulínicos del albacora (*Germa alalunga*, Gml.), por cuyo motivo nos ha parecido interesante investigar si los extractos de nódulos pancreáticos endocrinos del atún, sobre los cuales ha trabajado uno de nosotros (3), presentaban una acción hiperglucemiante semejante a los del albacora.

Material y métodos

Empleamos extractos insulínicos preparados según la técnica de DUDLEY (1) a partir de nódulos pancreáticos endocrinos del atún *Thunnus thynnus*, L., recogidos en la almadraba de Barbate (Cádiz) y mantenidos hasta el momento de la preparación en solución saturada de ácido pícrico a 4º C. (3).

El efecto hiperglucemiante se determina en conejos, con ayuno de 24 horas. El extracto se administra siempre por vía endovenosa a dosis de 0,03 c. c. y 0,05 c. c. por 2 kg. de peso corporal, que corresponden a 3 y 5 mgr., respectivamente, de tejido endocrino.

Las glucemias se determinan, a intervalos de tiempo que se expresan en cada experiencia, con el reactivo de SOMOGY (4). Los resultados se expresan en gramos de glucosa por litro o por los porcentajes de aumento respecto a la glucemia normal.

Efectuamos una valoración aproximada del factor hiperglu-

* Con una beca del Instituto de Investigaciones Pesqueras.

cemiente presente en un extracto insulínico del atún, comparándolo con el efecto obtenido por una muestra de glucagón amorfo Lilly, lote número 258-234B-40*.

Resultados

I. ACCIÓN HIPERGLUCEMIANTE DE LOS EXTRACTOS INSULÍNICOS DEL ATÚN.

En la tabla I se expresan los valores de la glucemia a diferentes tiempos después de la inyección de preparados procedentes de distintos extractos. El efecto hiperglucemiante máximo se encuentra a los cinco minutos; luego cede y da paso a la hipoglucemia insulínica.

TABLA I

Efectos sobre la glucemia del conejo de distintos extractos insulínicos del atún

Dosis	Extracto	Conejo		Glucemias (gr./l.)					
		N.º	Peso kg	0	5	10	15	30	60 min.
0,05 c.c./2 kg.	11	7	1,8	0,90	0,94	0,88	0,75	—	—
<	12	1	3	0,80	0,90	0,75	0,60	—	—
<	12	2	3	0,83	0,84	0,78	0,67	—	—
<	21	8	1,63	1,06	1,17	1,03	1,03	—	—
<	21	9	1,78	1,00	1,17	1,14	1,00	—	—
<	21	10	2,10	0,99	1,14	1,05	0,87	—	—
0'03 c.c./2 kg.	1	1	2,80	1,16	1,18	1,06	0,97	1,00	1,06
<	1	2	3	1,00	1,25	1,06	0,75	0,53	0,53
<	9	4	1,43	0,61	0,64	0,40	0,38	0,32	—
<	9	1	3	0,99	1,18	1,03	0,64	0,58	0'80
<	9	2	3	0,97	1,12	1,00	0,58	0'56	0,64

En otras experiencias se ha destruido la insulina de los extractos por incubación alcalina con KOH 0,08 N, según la técnica SUTHERLAND (5, 6).

En la tabla II se observa cómo ha desaparecido por completo la acción de la insulina, mientras persiste el efecto hiperglucemiante.

Uno de los extractos estudiados anteriormente (extracto número 13, tabla II) es inactivado posteriormente a 100° C durante 40 minutos para la destrucción del factor hiperglucemiante (5). Su ensayo en conejos demuestra la desaparición de toda acción sobre su glucemia (tabla III).

* Expresamos nuestro agradecimiento al doctor W. R. Kirtley, de la Eli Lilly and Company de Indianápolis (Estados Unidos), por el envío de dicha muestra.

TABLA II

*Inactivación de los extractos insulínicos con KOH a 37° C.
Glucemias durante los 60 minutos siguientes a la inyección*

Dosis	Extracto	Conejo		Glucemias (gr./l.)					
		N.º	Peso kg	0	3	6	9	30	60 min.
0,05 cc/ 2 kg.	12	1	3	0,89	0,96	0,87	0,87	—	—
>	12	2	3	0,80	1,05	1,15	1,11	—	—
>	12	3	1,8	0,75	1,00	0,98	0,97	—	—
>	12	4	1,7	0,65	0,84	0,83	0,75	—	—
>	13	1	3	0,99	1,16	1,16	1,07	—	—
>	13	2	3	1,00	1,13	1,10	1,01	—	—
>	13	5	2,15	0,80	—	1,16	1,14	0,71	0,91
>	13	7	2	0,88	1,00	1,04	1,01	0,94	0,91

TABLA III

*Inactivación total de un extracto insulínico del atún
por KOH a 100° C. durante 40 minutos*

Dosis	Extracto	Conejo		Glucemias (gr./l.)			
		N.º	Peso kg.	0	3	6	9 min.
0,05 c. c./2 kg.	13	5	2,15	0,98	1,00	0,96	1,00
>	13	6	2	0,85	0,87	0,84	0,86
>	13	7	2	0,98	1,00	1,00	0,84

2. VALORACIÓN APROXIMADA DEL PODER HIPERGLUCEMIANTE.

El efecto hiperglucemiante de los extractos se manifiesta con su máxima actividad a los 5 minutos de su administración. Por esto la valoración se ha efectuado comparando el efecto del glucagón con el producido por los extractos sin ningún tratamiento previo, durante los 9 primeros minutos, y a intervalos de 3 minutos.

Empleamos como standard una muestra de glucagón amorfo Lilly, cuya actividad corresponde al 50 % del glucagón cristalizado.

Adoptamos para el standard una dosis de 6,6 µg. de glucagón por 2 kg. de peso corporal, que se disuelven en agua destilada alcalina (pH=9), e inyectando por vía endovenosa volúmenes aproximadamente iguales a los del extracto.

El porcentaje de aumento de las glucemias (R) se calcula como se indica en una publicación anterior (2), suponiendo que

existe proporcionalidad entre la cantidad de factor hiperglucemiante y los porcentajes de aumento del azúcar sanguíneo.

En la tabla IV se expresan los valores correspondientes a las glucemias y sus porcentajes de aumento obtenidos para la valoración del extracto número 13.

TABLA IV

Valoración del contenido en glucagón del extracto núm. 13

Dosis	Conejo		Glucemias (gr./l.)				Porcentajes de aumento (R)
	N.º	Peso kg.	0	3	6	9 min.	
Extracto 0,05 c.c./2 kg.	1	3	1,00	1,16	1,16	1,07	13
	2	3	0,92	1,16	1,13	0,97	18
	3	1,8	0,86	1,00	1,05	0,95	16,2
	4	1,7	0,86	1,07	0,94	0,85	10,8
	5	2,15	0,85	0,94	1,00	1,01	15,6
	6	2	0,91	1,07	1,09	1,00	15,7
Glucagón Standard 8,6 γ /2 kg.	1	3	0,99	1,23	1,24	1,13	21,2
	2	3	0,95	1,23	1,14	1,02	18,9
	3	2	0,95	1,20	1,21	1,13	24,2
	4	1,8	1,00	1,23	1,15	1,12	17
	5	2,15	1,01	1,11	1,16	1,29	17,5
	6	2	1,01	1,17	1,20	1,22	18,5

A partir de los valores obtenidos se determina para los 0,05 c. c. del extracto insulínico inyectado una riqueza media en glucagón equivalente a 5 μ g., que corresponden a 5 mg. de tejido endocrino (1 mg. de glucagón por gramo de nódulo pancreático). Teniendo en cuenta que el glucagón amorfo tiene una actividad que corresponde al 50 % del glucagón cristalizado Lilly, la riqueza en factor hiperglucemiante de los extractos insulínicos del atún es, aproximadamente, de 0,5 mgr. por gramo de tejido endocrino.

Discusión

Los extractos insulínicos del atún presentan una clara acción hiperglucemiante sobre el conejo, que se mantiene durante los 9 primeros minutos después de la inyección. Este aumento del azúcar sanguíneo debe atribuirse a un factor distinto a la insu-

lina, ya que mediante la inactivación de ésta a 37° C con KOH 0,08 N desaparece el efecto hipoglucemiante, persistiendo, sin embargo, la acción hiperglucemiante.

El tratamiento posterior de estos extractos, sin actividad insulínica, con KOH a 100° C, inactiva totalmente los extractos, con lo cual desaparece todo efecto sobre la glucemia.

En los extractos insulínicos del *Thunnus thynnus*, L., existe un factor que posee unas propiedades semejantes a las que encontramos para los extractos de *Germo alalunga*, Gml. (2), lo cual nos hace suponer la presencia en los mismos de una sustancia hiperglucemiante de comportamiento muy parecido al del glucagón de los mamíferos.

La valoración aproximada de la riqueza en factor hiperglucemiante del extracto número 13 de nódulos de *Thunnus thynnus*, L., puede calcularse como equivalente a 1 mgr. de glucagón amorfo Lilly por gramo de tejido pancreático endocrino. Para dicho extracto, la relación entre las dos hormonas obtenidas es de 10 µg. de glucagón por unidad de insulina.

Resumen

Se estudia la presencia de un factor hiperglucemiante en los extractos insulínicos de nódulos pancreáticos endocrinos del atún (*Thunnus thynnus*, L.) por su acción sobre la glucemia en conejos.

Se elimina la acción insulínica de los extractos por tratamiento con KOH a 37° C, y se observa la persistencia del efecto hiperglucemiante. La inactivación más enérgica de los mismos a 100° C durante 40 minutos, determina la desaparición de toda acción sobre la glucemia. Este factor hiperglucemiante se considera homólogo al glucagón de los mamíferos.

Se compara el efecto de un extracto, sin tratamiento previo, con una muestra de glucagón amorfo Lilly. El contenido en glucagón de este extracto insulínico del atún es del orden de 1 mg. del preparado amorfo por gramo de nódulo pancreático endocrino.

Summary

Hyperglucemic action of extracts of endocrine pancreatic nodules from the tunny fish

The results obtained in a previous publication on the albacore, has suggested the present work in the tunny fish (*Tunnus thynnus*) using the material which one of us had employed for the determination of its insulin content. The endocrine pancreatic nodules were collected in the almadrabe of Barbate (Cadiz) and conserved in saturated solution of picric acid, the extraction of insulin being done by Dudley's method.

The hyperglucemia-provoking effect of the extracts are determined in rabbits fasting for 24 hours. The route of admi-

nistration is always the intravenous one, the dose being 0.03 to 0.05 cc. which correspond to 3 and 5 mg. respectively of endocrine tissue. The glucemias are determined by Somogy's reagent (4), at intervals of 3 to 5 minutes after the injection.

The hyperglucemic effect of the extracts is shown within the first 10 minutes of the injection, a hypoglucemia due to the insulin beginning later.

Alkaline incubation of the extracts with 0.08 N KOH at 37° C for two and a half hours (5,6) causes the disappearance of their hypoglucemia-producing action (Table II), while their hyperglucemia-producing action persists. However these inactivated extracts lose all action on the rabbit glucemia if they are kept 40 minutes at 100° C (Table III). In such conditions glucagon is equally hydrolysed.

An approximate evaluation has been realised of the glucagon content of an insulin extract (extr. n.º 13, Table IV), studying the percentage increase in glucemia provoked by the extract and by a sample of amorphous glucagon of Lilly (6.6 µg. per 2 kg. body weight). Glucagon content of this extract can be calculated to be equivalent to 1 mg. of amorphous glucagon per gram of pancreatic nodule (or 0.5 mg. of crystallised glucagon).

Bibliografía

- (1) DUDLEY, H. W. : *Biochem. J.*, **18**, 665, 1924.
- (2) LLUCH, M. y PLANAS, J. : *R. esp. Fisiol.*, **12**, 21, 1956.
- (3) PLANAS, J. : *Invest. Pesq.*, 1956 (en prensa).
- (4) SOLS, A. : *R. esp. Fisiol.*, **5**, 149, 1949.
- (5) SUTHERLAND, E. W. y CORI, C. F. : *J. Biol. Chem.*, **172**, 737, 1948.
- (6) SUTHERLAND, E. W., CORI, C. F., HAYNES, R. y OLSEN, N. S. : *J. Biol. Chem.*, **180**, 825, 1949.