
Señalización del receptor de pancreastatina: *cross-talk* con el receptor de insulina

Víctor Sánchez Margalet, José Santos Álvarez y Carmen González Yanes

Departamento de Bioquímica Clínica. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla.

Introducción

La pancreastatina (PST) es un péptido de 49 aminoácidos con una glicina-amida en el extremo carboxilo terminal, que fue aislado a partir de páncreas porcino a finales de 1986¹. La PST deriva de la proteólisis de un precursor prohormonal, la cromogranina A (CGA), una glucoproteína muy abundante en el gránulo de secreción cromafín, pero que también está presente en la mayoría de los gránulos de secreción de células neuroendocrinas^{2,3}. En los islotes de Langerhans, la PST se localiza tanto en las células β , productoras de insulina, como en las células δ , productoras de somatostatina⁴, y en las células α , productoras de glucagón^{5,6}. Además, la CGA puede sufrir su procesamiento proteolítico fuera de la célula, en el espacio extracelular, tras su secreción, así como en la circulación periférica^{7,8}. Puesto que la mayoría de la CGA circulante se origina en tejido cromafín, este origen debe ser la principal fuente indirecta de PST, mientras que el páncreas endocrino, el antro gástrico y las células neuroendocrinas del duodeno son la fuente mayoritaria de secreción de PST procesada^{9,10}. El ADNc de CGA de rata reveló la presencia de una secuencia PST-like, homóloga a la PST porcina¹¹⁻¹⁴.

La PST fue denominada así por su acción inhibitoria sobre el primer pico de secreción de la insulina estimulada por glucosa; sin embargo, se han descrito muchos más efectos biológicos en diferentes tejidos. De hecho, su papel como péptido regulador enteropancreático se ha establecido tras conocerse una serie de efectos biológicos cuya actividad radica en el extremo carboxilo terminal de la molécula¹⁵. Estos efectos se ejercen sobre la secreción pancreática endocrina y exocrina¹⁶⁻²², la secreción gástrica^{23,24}, la liberación de parathormona²⁵, las concentraciones de catecolaminas²⁶ y la retención de memoria²⁷. La PST sintética de rata también ha demostrado tener actividad

biológica en diferentes tejidos²⁸⁻³⁰. En el hígado de rata hemos encontrado que la PST posee un efecto glucogenolítico comparable al ejercido por el glucagón^{31,32}. Este efecto fue confirmado en hepatocitos aislados de rata, donde resultó ser dependiente de la presencia de calcio en el medio de incubación, e independiente de la producción de AMPc³³. Además, encontramos que la PST incrementa la concentración de calcio libre citosólico, aumentando tanto la salida de los depósitos intracelulares como la entrada de calcio extracelular³⁴. Por otra parte, comprobamos que la PST inhibe la síntesis de glucógeno estimulada por insulina en hepatocitos aislados de rata³⁵.

Recientemente hemos encontrado otro efecto contrarregulador de PST, esta vez sobre la acción de la insulina sobre otra célula diana, el adipocito de rata³⁶. La PST inhibe la captación de glucosa y la liberación de lactato estimulada por insulina. La lipogénesis también se ve inhibida por la PST aunque con menor eficacia. La PST tiene un efecto lipolítico sobre el adipocito aislado que es inhibido totalmente por la insulina³⁶. Por contra, la PST estimula la síntesis proteica, tanto basal como estimulada por insulina en los adipocitos aislados de rata³⁶. En definitiva, hemos encontrado una nueva acción endocrina de PST con un posible papel fisiológico en la regulación del metabolismo del tejido graso y con posibles implicaciones en procesos fisiopatológicos como la obesidad y otros síndromes con resistencia a la insulina.

La acción inhibitoria de PST sobre la secreción endocrina y exocrina en general condujo a la idea de que la PST podría desempeñar un papel en la regulación fina de la secreción tanto autocrina como paracrina y endocrina. Sin embargo, la estrecha relación de la PST con el tejido cromafín, y los efectos observados en el hígado y en el tejido adiposo, sugieren un papel como péptido contrarregulador de la insulina. Así, la PST actuaría en conjunción con las catecolaminas en la regulación del metabo-

mo de la glucosa^{37,38} y los lípidos³⁶, inhibiendo tanto la secreción de insulina como su acción sobre el hepatocito y el adipocito. Este efecto sinérgico con el de las catecolaminas podría ser útil en condiciones fisiológicas, como la respuesta al estrés (p. ej., producido por la hipoglucemia) (fig. 1). Por otro lado, los efectos de PST inhibiendo la secreción y la acción de la insulina han llevado a la hipótesis reciente que atribuiría un papel a la PST en la resistencia a la insulina^{37,38}. Así, la diabetes tipo 2 se caracteriza por una secreción inapropiada de insulina y resistencia a la misma³⁹. De hecho, se han encontrado valores elevados de PST circulante en la diabetes tipo 2, en la hipertensión y en la diabetes gestacional, donde parece correlacionarse con las catecolaminas⁴⁰⁻⁴³. Si bien la resistencia a la insulina parece preceder al

incremento en los valores de PST o de catecolaminas en la hipertensión esencial⁴⁴, estas hormonas contrarreguladoras podrían empeorar el síndrome de resistencia a la insulina.

A pesar de todas las acciones descritas aún no se conocen los mecanismos precisos por los que la PST ejerce tantos efectos biológicos. Durante los últimos años nos hemos interesado en el estudio del sistema de señalización de PST en el hepatocito. Por tanto, vamos a centrarnos en revisar nuestro trabajo sobre la señalización de PST en el hígado⁴⁵.

Receptores de pancreastatina en las membranas hepáticas

Aunque se han descrito múltiples efectos biológicos de la PST inhibiendo la secreción

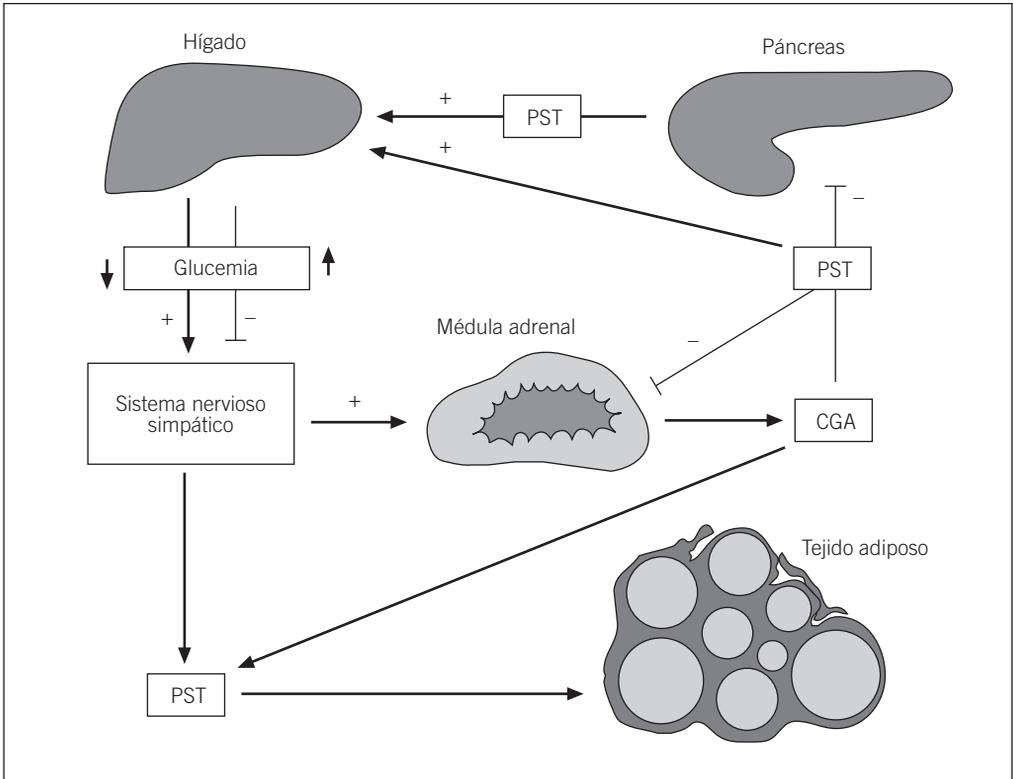


Fig. 1. Modelo del papel fisiológico de la pancreastatina (PST). Una señal de estrés (hipoglucemia) aumenta la actividad simpática, secretándose catecolaminas junto a la cromogranina A (CGA). La PST derivada de CGA inhibe la secreción y acción de la insulina en el hígado y en el tejido adiposo, estimula la glucogenólisis hepática e inhibe la captación de glucosa en el adipocito, lo que llevaría la glucemia a valores de normalidad, a la vez que la actividad simpática se inhibe, autolimitándose. Por otro lado, la PST producida en el páncreas o en el sistema gastrointestinal puede contrarregular la acción de la insulina; +: estimulación; -: inhibición.

exo y endocrina, la presencia de receptores en tejidos secretores no ha sido aún descrita. De hecho, una de las pruebas para demostrar el carácter endocrino de un péptido es la presencia de receptores específicos en la membrana plasmática de la célula diana.

En este sentido, hemos encontrado receptores específicos para PST de alta afinidad en membranas de hígado de rata⁴⁶. Empleamos PST marcada con ¹²⁵I para estudiar la caracterización funcional de los receptores de PST. Este estudio sugirió que el hígado de rata presentaba receptores específicos y de alta afinidad para PST. Así, la unión del ligando era muy dependiente de la estructura de la PST. Por tanto, PST de otras especies con poca homología estructural (porcina o humana) presentaron muy baja afinidad en los estudios de desplazamiento del radioligando. El receptor de PST parecía ser una glucoproteína monomérica funcionalmente acoplada a algún sistema de proteínas G, ya que la unión era muy sensible a nucleótidos de guanina, y podía adsorberse con diferentes lectinas⁴⁶. Estos resultados hacen pensar en un receptor de 7 dominios transmembrana acoplado a las proteínas G. El análisis de la unión en condiciones de equilibrio indicaba la presencia de una única clase de sitios de unión, con una B_{max} de 15 fmol/mg de proteína y una K_D de 0,2 nM. Estos valores se corresponden bastante bien con la ED₅₀ observada para los efectos de PST en los hepatocitos^{33,34}, y son comparables a los de la mayoría de receptores de péptidos, y lo que es más importante, los valores eran compatibles con las concentraciones circulantes de PST⁴⁷, lo que refuerza la idea de un papel fisiológico de PST como un regulador del metabolismo de la glucosa.

Recientemente, hemos conseguido solubilizar receptores de PST a partir de membranas hepáticas en un estado funcional y acoplados a proteínas G, como comprobamos al realizar la caracterización funcional de los receptores solubles⁴⁸. Así, obtuvimos resultados comparables a los observados previamente en membranas particuladas, con una B_{max} de 14 fmol/mg de proteína, una K_D de 0,3 nM y una sensibilidad similar a los nucleótidos de guanina. La caracterización molecular del receptor soluble de PST por medio de filtración en gel Sephacryl S-300 y *cross-linking* con radioligando reveló dos componentes: un pico de 80 K_D correspondiente al receptor y otro de 170 K_D compuesto de la asociación del receptor con una proteína G. Esta proteína G debe pertene-

cer a la familia de Gα_q ya que fue reconocida con anticuerpos específicos en el inmunoblot de las fracciones cromatográficas correspondientes al componente de 170 K_D⁴⁸.

También hemos conseguido, gracias a su naturaleza glucoproteica, purificar parcialmente el complejo receptor-proteínas G por medio de cromatografía de adsorción a lectinas (lectina del germen de trigo)⁴⁸. Éste es un primer paso importante hacia la purificación definitiva que llevará a la secuenciación y clonación del receptor.

Señalización del receptor de la pancreastatina

Una vez que habíamos encontrado el efecto biológico de la PST sobre el hígado nos interesó estudiar su señalización en el hepatocito⁴⁵.

Pronto observamos que el efecto glucogenolítico de la PST era independiente de AMPc pero muy dependiente del calcio³³. Más aún, observamos que la PST incrementaba el calcio libre citosólico ([Ca²⁺]_i), por medio de algún mecanismo tanto sensible como insensible al tratamiento con toxina pertúsica³⁴. Estos resultados sugerían que la acción de PST estaría mediada por un sistema efector que incluiría la activación de PLC. De hecho, comprobamos que la movilización de [Ca²⁺]_i está mediada por el incremento de IP₃, a través de un mecanismo insensible a toxina pertúsica, mientras que la estimulación de la entrada de calcio extracelular parece utilizar un mecanismo sensible a toxina pertúsica³⁴. Así, la PST incrementa la producción de IP₃ y DAG en la membrana del hepatocito por medio de la activación de PLC^{49,50}. La estimulación de PLC por un mecanismo insensible a toxina pertúsica sugería la intervención de una proteína G de la familia Gα_q. Hay que destacar que la producción de DAG estimulada por PST no es equimolar, sino mayor que la producción de IP₃. Estos resultados se explican por la actuación de fosfolipasa C sobre otros sustratos como la fosfatidil colina (resultados no publicados).

Si el IP₃ producido era responsable del incremento en [Ca²⁺]_i, el DAG producía una estimulación de la actividad proteincinasa C, como comprobamos en hepatocitos aislados⁵⁰. La función celular de ambas vertientes de la señalización derivadas del fosfatidil inositol bifosfato es sinérgica y parece ser responsable de la acción de PST en el hepatocito.

La PST también estimula la producción de GMPc, por medio de un mecanismo sensible a

toxina pertúsica. El papel del GMPC en la fisiología del hepatocito no se conoce. Sin embargo, hemos encontrado que la producción de GMPC inhibe la activación de PLC por PST, lo que sugiere una función de retroalimentación negativa sobre la señalización del receptor. El mecanismo íntimo de esta regulación está siendo investigado en la actualidad.

Proteínas G acopladas al receptor de PST en las membranas hepáticas

Los estudios del receptor de PST y su acción en el hepatocito sugerían el acoplamiento de proteínas G en la membrana plasmática. Así, teníamos datos indirectos de que PST estimula una proteína G: por la sensibilidad de la unión del radioligando a nucleótidos de guanina^{46,48} y por la estimulación por PST de la actividad GTPasa de alta afinidad en membranas hepáticas⁴⁹. Estos resultados fueron ratificados con estudios de unión de GTP- γ -³⁵S en membranas solubilizadas (resultados no publicados). El tratamiento con toxina pertúsica de las membranas hepáticas sólo inhibía parcialmente (15%) tanto la unión de GTP como la actividad GTPasa estimulada por PST. Esto sugería que el sistema principal de transducción del receptor de PST pertenecería a la familia de proteínas $G\alpha_q$, la cual es uno de los principales activadores de PLC de membrana (PLC- β). Por otra parte, el sistema de señalización sensible a toxina pertúsica parece pertenecer a la familia $G\alpha_{i,2}$ (resultados no publicados), y sería el responsable del acoplamiento con la activación de guanilato ciclasa, aunque el mecanismo preciso de esta activación es objeto de estudio en la actualidad.

El siguiente paso fue, por tanto, investigar la naturaleza de esta interacción receptor-proteína G por medio de anticuerpos específicos, utilizando diferentes abordajes. El efecto de PST incrementando la unión de GTP y la actividad GTPasa fue bloqueado de forma específica por anticuerpos contra $G\alpha_{q/11}$, y en menor medida por anticuerpos anti- $G\alpha_{i,2}$, lo que demuestra el acoplamiento funcional del receptor de PST con un doble sistema de proteínas G, pertenecientes a las familias $G\alpha_{q/11}$ y $G\alpha_{i,2}$ ⁵¹. Estos resultados coincidían con los obtenidos por inmunoblot en la cromatografía de exclusión en gel⁴⁶, en los que se observaba la coelución del receptor con la proteína $G\alpha_{q/11}$ formando un complejo de 170 kD. Esta asociación física selectiva fue comprobada por la presencia de $G\alpha_{q/11}$ en semipurificado de receptor de PST

por cromatografía de adsorción a lectina de germen de trigo. Por otro lado, la inmunoprecipitación de $G\alpha_{q/11}$ coprecipitó al receptor de PST, como se dedujo de la actividad de unión de PST al inmunoprecipitado⁵¹. Estos resultados demostraban definitivamente el acoplamiento físico entre el receptor y la proteína $G\alpha_{q/11}$.

Finalmente, el acoplamiento del receptor de PST con el sistema efector PLC fue bloqueado por el anticuerpo contra $G\alpha_{q/11}$, lo que sugiere que una proteína G de la familia de $G\alpha_{q/11}$ es efectivamente el mediador de la señal desde el receptor de PST a la activación de PKC en las membranas de hígado de rata.

Para discernir qué subunidad $G\alpha$ específica mediaba la activación de PLC por PST empleamos anticuerpos específicos contra $G\alpha_q$ y $G\alpha_{11}$ (cedidos generosamente por el Prof. John H. Exton, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN), ya que ambas subunidades están presentes en las membranas hepáticas. Este estudio reveló que es selectivamente $G\alpha_{11}$ la proteína que media la activación de PLC por PST, y no la homóloga $G\alpha_q$ ⁵².

El receptor de PST activa la isoenzima fosfolipasa C- β 3

Puesto que PST estimula la actividad PLC en membranas hepáticas, era de suponer que la isoenzima efectora de esta acción sería PLC- β (PLC- γ es citosólica y sólo se asocia a proteínas tirosin fosforiladas de la membrana en respuesta a la señalización por tirosincinasas).

Sin embargo, hay cuatro isoformas de PLC- β descritas hasta el momento, y tres de ellas están presentes en las membranas de hígado de rata (β 1, β 2 y β 3). Sólo PLC- β 4 (específica de tejido nervioso) está ausente en las membranas hepáticas. Por tanto, utilizamos anticuerpos específicos contra las 3 isoenzimas de PLC- β presentes en el hígado de rata. Encontramos que sólo anti-PLC- β 3 fue capaz de bloquear la acción de PST⁵². Por tanto, estos datos sugieren que PLC- β 3 media la respuesta del receptor de PST en el hepatocito.

La pancreastatina inhibe la señalización del receptor de la insulina

Muy recientemente hemos estudiado el efecto de la PST sobre la señalización del receptor de insulina en las células derivadas de hepatoma de rata HTC⁵³. La PST inhibe de forma dependiente de la dosis la autofosforilación del

β 3. La activación de PLC produce IP3 responsable del incremento en $[Ca^{2+}]_i$, y DAG que es responsable de la activación de proteincinasa C. Estas dos vías son probablemente responsables de la acción de PST sobre el metabolismo de la glucosa en el hepatocito. Además, la actividad PKC interviene en el mecanismo molecular de contrarregulación de la insulina, fosforilando su receptor en restos de serina y treonina y, por ello, inhibiendo la actividad tiro-sinasa del receptor de insulina. Por otro lado, existe un sistema de proteínas G sensible a toxina pertúsica ($G\alpha_{i,2}$), responsable del incremento en las concentraciones de GMPc. Sin embargo, el mecanismo por el cual el receptor de PST activa una guanilato ciclasa y cómo este sistema contrarregula la actividad PLC es motivo de trabajo en la actualidad, y de sus resultados podremos obtener nuevas conclusiones respecto a estos sistemas de transducción de membrana.

Agradecimiento

El trabajo revisado en este artículo ha sido subvencionado por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 96/1.411). Agradecemos el apoyo constante del Prof. R. Goberna, Jefe del Departamento de Bioquímica Clínica, y del Servicio Andaluz de Salud (SAS), del que depende el Hospital Universitario Virgen Macarena.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tatemoto K, Efendic S, Mutt V, Makk G, Feistner GJ, Barchas JC. Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. *Nature* 1986; 324: 476-478.
2. Iancangelo AL, Affolter HU, Eiden LE, Herbert E, Grimes M. Bovine chromogranin A sequence and distribution of its messenger RNA in endocrine tissues. *Nature* 1986; 323: 82-86.
3. Iancangelo AL, Fischer-Colbrrie R, Koller KJ, Brownstein MJ, Eiden LE. The sequence of porcine chromogranin A messenger RNA demonstrates chromogranin A can serve as the precursor for the biologically active hormone, pancreastatin. *Endocrinology* 1988; 155: 2.339-2.341.
4. Ravazzola M, Efendic S, Östenson CG, Tatemoto K, Hutton JC, Orci L. Localization of pancreastatin immunoreactivity in porcine endocrine cells. *Endocrinology* 1988; 123: 227-229.
5. Lamberts R, Schmidt WE, Creutzfeldt W. Light and electron microscopical immunocytochemical localization of pancreastatin-like immunoreactivity in porcine tissues. *Histochemistry* 1990; 93: 369-380.
6. Curry WJ, Johnston CF, Shaw C, Buchanan KD. Distribution and partial characterization of immunoreactivity to the putative C-terminus of rat pancreastatin. *Regul Peptides* 1991; 30: 207-219.
7. Simon JP, Bader MF, Aunis D. Proteolytic processing of CGA in cultured chromaffin cells. *Biochem Biophys Acta* 1989; 1.051: 123-130.
8. Watkinson A, O'Sullivan A, Burgoyne R, Dockray G. Differential accumulation of catecholamines, proenkephalin- and CGA-derived peptides in the medium after chronic nicotine stimulation of cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Peptides* 1990; 11: 435-441.
9. Winkler H, Fischer-Colbrrie R. The chromogranin-A and chromogranin-B - the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 1992; 49: 497-528.
10. Watkinson A, Johnson AC, Davison M, Young J, Lee CM, Moore S et al. Heterogeneity of chromogranin A-derived peptides in bovine gut, pancreas and adrenal medulla. *Biochem J* 1991; 276: 471-479.
11. Hutton JC, Nielsen E, Kastern W. The molecular cloning of the chromogranin A-like precursor of β -granin and pancreastatin from the endocrine pancreas. *FEBS Lett* 1988; 236: 269-274.
12. Abood ME, Eberwine JH. Characterization and regulation of a cDNA clone for rat pancreastatin. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 167: 1.079-1.085.
13. Iancangelo AL, Okayama H, Eiden LE. Primary structure of rat chromogranin A and distribution of its mRNA. *FEBS Lett* 1988; 227: 115-121.
14. Farmer RJ, Koop AH, Handa MT, O'Connor DT. Molecular cloning of chromogranin A from rat pheochromocytoma cells. *Hypertension* 1989; 14: 435-444.
15. Sánchez-Margalet V, Lucas M, Goberna R. Pancreastatin: further evidence for its consideration as a regulatory peptide. *J Mol Endocrinol* 1996; 16: 1-8.
16. Efendic S, Tatemoto K, Mutt V, Quan C, Chang D, Östenson C-G. Pancreastatin and islet hormone release. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7.257-7.260.
17. Silvestre RA, Peiró E, Miralles P, Villanueva ML, Marco J. Effects of pancreastatin on insulin, glucagon and somatostatin secretion by the perfused rat pancreas. *Life Sci* 1988; 42: 1.361-1.367.
18. Funakoshi A, Miyasaka K, Kitani K, Tatemoto K. Effect of pancreastatin on pancreatic endocrine function in the conscious rat. *Regul Peptides* 1989; 24: 225-231.
19. Sánchez-Margalet V, Lucas M, Goberna R. Pancreastatin increases cytosolic Ca^{2+} in insulin secreting RIN m5F cells. *Mol Cell Endocrinol* 1992; 88: 129-133.
20. Sánchez-Margalet V, Calvo JR, Lucas M, Goberna R. Pancreastatin and its 33-49 C-terminal fragment inhibit glucagon-stimulated insulin in vivo. *Gen Pharmacol* 1992; 23: 637-638.

21. Sánchez-Margalet V, Goberna R. Pancreastatin (33-49) enhances the priming effect of glucose in the rat pancreas. *Experientia* 1993; 49: 551-552.
22. Miyasaka K, Funakoshi A, Nakamura R, Kitani K, Shimizu F, Tatemoto K. Effects of porcine pancreastatin on postprandial pancreatic exocrine and endocrine functions in the conscious dog. *Digestion* 1989; 43: 204-211.
23. Lewis JJ, Zdon MJ, Adrian TE, Modlin IM. Pancreastatin: a novel peptide inhibitor of parietal cell secretion. *Surgery* 1988; 104: 1.031-1.036.
24. Lewis JJ, Goldenring JR, Asher VA, Modlin IM. Pancreastatin: a novel peptide inhibitor of parietal cell signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 163: 667-673.
25. Fasciotto BH, Gorr SU, DeFranco DJ, Levine MA, Cohn DV. Pancreastatin, a presumed product of chromogranin A (secretory protein I) processing, inhibits secretion from porcine parathyroid cells in culture. *Endocrinology* 1989; 125: 1.617-1.622.
26. Sánchez-Margalet V, Goberna R. Pancreastatin decreases plasma epinephrine levels in surgical stress in the rat. *Peptides* 1993; 14: 797-799.
27. Flood JF, Morley JE. Effects of systemic pancreastatin on memory retention. *Peptides* 1988; 9: 1.077-1.080.
28. Funakoshi A, Miyasaka K, Kitani K, Tamamura H, Funakoshi S, Yajima H. Bioactivity of synthetic C-terminal fragment of rat pancreastatin on endocrine pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158: 844-849.
29. Miyasaka K, Funakoshi A, Kitani K, Tamamura H, Fujii N, Funakoshi S. The importance of the C-terminal amide structure of rat pancreastatin to inhibit pancreatic exocrine secretion. *FEBS Lett* 1990; 263: 279-280.
30. Peiró E, Dégano P, Miralles P, Silvestre RA, Marco J. Homologous pancreastatin inhibits insulin secretion without affecting glucagon and somatostatin release in the perfused rat pancreas. *Regul Peptides* 1991; 34: 159-167.
31. Sánchez V, Calvo JR, Goberna R. Glycogenolytic effect of pancreastatin in the rat. *Biosci Rep* 1990; 10: 87-91.
32. Sánchez-Margalet V, Calvo JR, Goberna R. Glycogenolytic and hyperglycemic effect of 33-49 C-terminal fragment of pancreastatin in the rat in vivo. *Horm Metabolism Res* 1992; 34: 455-457.
33. Sánchez V, Lucas M, Calvo JR, Goberna R. Glycogenolytic effect of pancreastatin in isolated rat hepatocytes is mediated by a cyclic-AMP-independent Ca^{2+} -dependent mechanism. *Biochem J* 1992; 284: 659-662.
34. Sánchez-Margalet V, Lucas M, Goberna R. Pancreastatin increases free cytosolic Ca^{2+} in rat hepatocytes involving both pertussis-toxin-sensitive and insensitive mechanisms. *Biochem J* 1993; 294: 439-442.
35. Sánchez-Margalet V, Goberna R. Pancreastatin inhibits insulin-stimulated glycogen synthesis but not glycolysis in rat hepatocytes. *Regul Peptides* 1994; 51: 215-220.
36. Sánchez-Margalet V, González-Yanes C. Pancreastatin inhibits insulin action in rat adipocytes. *Am J Physiology* 1998; 275E: 1.055-1.060.
37. Sánchez-Margalet V, Goberna R. Pancreastatin, a new peptide associated with essential hypertension and hyperinsulinemia. En: Galteau MM, Henny J, Siest G, editores. *Biologie prospective*. París: John Libbey Eurotext, 1993; 575-580.
38. Sánchez-Margalet V, Santos-Álvarez J, Goberna R. Pancreastatin signaling in the liver. En: Teelken A, Korf J, editores. *Neurochemistry: cellular, molecular and clinical aspects*. Nueva York: Plenum, 1997; 589-593.
39. DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferranini E. Pathogenesis of NIDDM: a balanced overview. *Diabetes Care* 1992; 15: 318-368.
40. Funakoshi A, Tateishi K, Shinozaki H, Matsumoto M, Wakasugi H. Elevated plasma levels of pancreastatin (PST) in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Regul Peptides* 1990; 30: 159-164.
41. Sánchez-Margalet V, Valle M, Lobón JA, Maldonado A, Escobar F, Oliván J et al. Increased plasma pancreastatin-like immunoreactivity levels in non-obese patients with essential hypertension. *J Hypertension* 1995; 13: 251-258.
42. Sánchez-Margalet V, Valle M, Lobón JA, Escobar-Jiménez F, Pérez-Cano R, Goberna R. Plasma pancreastatin-like immunoreactivity correlates with plasma norepinephrine levels in essential hypertension. *Neuropeptides* 1995; 29: 97-101.
43. Sánchez-Margalet V, Lobón JA, González A, Escobar-Jiménez F, Goberna R. Increased basal and postglucose plasma pancreastatin levels in gestational diabetic subjects. Correlation with plasma norepinephrine levels. *Diabetes Care* 1998; 21: 1.951-1.954.
44. Sánchez-Margalet V, Ramos E, Mateo J, Oliván J, Pérez-Cano R, Goberna R. Normal pancreastatin-like levels in young offspring of non-obese essential hypertensive patients. *J Endocrinology* 1997; 153: 313-318.
45. Sánchez-Margalet V, Lucas M, Goberna R. Pancreastatin action in the liver: dual coupling to different G proteins. *Cell Signal* 1996; 8: 9-12.
46. Sánchez-Margalet V, Valle M, Goberna R. Receptors for pancreastatin in rat liver membranes: molecular identification and characterization by covalent cross-linking. *Mol Pharmacol* 1994; 46: 24-29.
47. Bretherton-Watt D, Valentino KL, Tatemoto K, Roth K, Polak JM, Bloom SR. Pancreastatin distribution and plasma levels in the pig. *Peptides* 1988; 9: 1.005-1.014.
48. Sánchez-Margalet V, Santos-Álvarez J. Solubilization and molecular characterization of pancreastatin receptors from rat liver membranes. *Endocrinology* 1997; 138: 1.712-1.718.
49. Sánchez-Margalet V, Goberna R. Pancreastatin activates pertussis toxin-sensitive guanylate cyclase and pertussis toxin-insensitive phospholipase C in rat liver membranes. *J Cell Biochem* 1994; 55: 173-181.

50. Sánchez-Margalet V, Lucas M, Goberna R. Pancreastatin activates protein kinase C by stimulating the formation of 1,2-diacylglycerol in rat hepatocytes. *Biochem J* 1994; 303: 51-54.
51. Santos-Álvarez J, González-Yanes C, Sánchez-Margalet V. Pancreastatin receptor is coupled to a guanosine triphosphate-binding protein of the G_{q/11}α family in rat liver membranes. *Hepatology* 1998; 27: 608-614.
52. Santos-Álvarez J, Sánchez-Margalet V. Pancreastatin activates beta 3 isoform of phospholipase C via G_{α11} protein stimulation in rat liver membranes. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 143: 101-106.
53. Sanchez-Margalet V. Modulation of insulin receptor signaling by pancreastatin. *Diabetologia* 1999. En prensa.
54. Sung CK, Sánchez-Margalet V, Goldfine ID. Role of p85 subunits of phosphatidylinositol-3-kinase as an adaptor molecule linking the insulin receptor, p62 and GTPase-activating protein. *J Biol Chem* 1994; 269: 12.503-12.507.
55. Sánchez-Margalet V, Goldfine ID, Truitt K, Imboden J, Sung CK. Role of p85 subunit of phosphatidylinositol-3-kinase as an adaptor molecule linking the insulin receptor to insulin receptor substrate 1. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 435-442.
56. Sánchez-Margalet V, Zoratti R, Sung CK. Insulin-like growth factor-1 stimulation of cells induces formation of complexes containing phosphatidylinositol-3-kinase, guanosine triphosphatase-activating protein (GAP), and p62 GAP-associated protein. *Endocrinology* 1995; 136: 316-321.
57. Sung CK, Choi W, Sánchez-Margalet V. Guanosine triphosphate-activating protein-associated protein, but not src-associated protein p68 in mitosis, is a part of insulin signaling complexes. *Endocrinology* 1998; 139: 2.392-2.398.
58. Sánchez-Margalet V, Goldfine ID, Vlahos CJ, Sung CK. Role of phosphatidylinositol-3-kinase in insulin receptor signaling: studies with inhibitor LY294002. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204: 446-452.

DISCUSIÓN

A. ZORZANO: ¿Cómo se regulan las concentraciones circulantes de pancreastatina (PST), y se correlacionan con el estado de sensibilidad insulínica in vivo? En segundo lugar, los efectos de la insulina en las células adiposas no son muy evidentes, ¿depende tal vez de que habéis estado trabajando con animales de una determinada edad? Por último, la incubación en presencia de PST disminuye la captación basal de 2-deoxiglucosa; ¿habéis estudiado la abundancia de GLUT-1 en estas condiciones?

V. SÁNCHEZ MARGALET: Empezando por el final, no lo hemos estudiado, aunque parece que efectivamente puede inhibir tanto el transporte de 2-desoxiglucosa como la presencia de GLUT-4 en la membrana. Por otro lado, y como tú comentas, la señal de insulina no es tan buena como sería deseable, puesto que las ratas en cuanto pesan más de 180 g no responden prácticamente a la insulina y las muy pequeñas no responden a PST. Nosotros trabajamos con animales entre 5 y 6 semanas de vida, que pesan unos 150-180 g. Respecto a las concentraciones circulantes de PST, normalmente se correlacionan muy bien con las concentraciones de catecolaminas. La misma célula β secreta PST, pero proporcionalmente es muy superior la secreción de insulina. Cuantitativamente, las concentraciones circulantes dependen mucho de la regulación por el sistema simpático, de modo que la cromogranina A que se secreta madura por el siste-

ma nervioso simpático se puede degradar a PST, constituyendo la fuente fundamental de PST. Aunque no está demostrado, nuestra hipótesis es que las concentraciones de PST pueden aumentar en situaciones de estrés y cuando se incrementa la actividad simpática. Creemos que el papel fisiopatológico de este aumento podría estar de alguna manera relacionado con la resistencia a la insulina, puesto que hemos hallado aumentos del péptido en síndromes de resistencia a la insulina en pacientes hipertensos y en diabéticas gestacionales. Aunque postulamos una participación del péptido, está claro que el síndrome de resistencia a insulina es aparte del efecto que pueda tener este péptido sobre la resistencia a insulina. En este sentido, seleccionamos una serie de hipertensos resistentes a la insulina en quienes detectamos un aumento en las concentraciones de PST. Posteriormente observamos que la mayoría de los hijos (con una media de edad de 20 años) de estos individuos y que no presentaban hipertensión arterial, eran ya resistentes a la insulina, pero sin embargo tanto sus concentraciones de catecolaminas como de PST eran completamente normales. Por tanto, probablemente la PST tenga un papel potenciador de la acción de las catecolaminas, y éstas tengan, a su vez, un efecto inhibitorio sobre la acción de la insulina.

A. GARCÍA DE HERREROS: El hecho de que el receptor de insulina se inactive es una evidencia

bastante circunstancial de que la PKC cinasa esté siendo activada, ya que otras cinasas también pueden hacerlo. ¿Disponéis de más evidencias sobre la activación de la PKC cinasa? En segundo lugar, observáis que la insulina potencia la síntesis de proteínas en lugar de bloquearla. Generalmente se considera que estos incrementos de síntesis son mediados por la vía de la activación de S6 cinasa. ¿No te resulta curioso que se observe inhibición o potenciación en función de la célula?

V. SÁNCHEZ MARGALET: Por requerimiento de unos *referees*, en este momento estamos estudiando otras evidencias de activación de la PKC en esta línea, ya que únicamente disponíamos de datos en hepatocito aislado de rata. Por los trabajos publicados, suponemos que las subunidades específicas que median esta fosforilación de receptores de insulina probablemente serán α o β_2 . Con referencia a tu pregunta del efecto sobre síntesis de proteínas, existen antecedentes de hormonas lipolíticas que aumentan la síntesis de proteínas posiblemente mediado por calcio. Es el caso de la angiotensina II y otras hormonas dependientes de calcio que son capaces de aumentar la síntesis de proteínas, aunque no puedo asegurarte si lo hacen sobre tejido adiposo blanco o marrón.

F. MAYOR: Creo que has comentado que este acoplamiento era preferentemente por vía de α_{11} , que también observasteis cierta capacidad de acoplamiento a proteínas tipo G_i o al menos sensible a toxina pertúsica y que esti-

mulaba actividad guanilatociclasa. ¿Sabéis si se trata de una activación por vía NO? Y, por otra parte, este bloqueo por toxina pertúsica ¿es total o parcial?

V. SÁNCHEZ MARGALET: Nosotros hemos observado un incremento de las concentraciones de GMPc, pero no sabemos si está o no mediado por NO, aunque es un tema que nos interesa y tenemos planificado estudiar. En cuanto al bloqueo por toxina pertúsica, se trata de un bloqueo total.

J.M. BAEYENS: ¿Se han identificado receptores de PST en el sistema nervioso central, o se cree al menos que puedan existir?

V. SÁNCHEZ MARGALET: No se han identificado receptores hasta el momento. Aunque iniciamos algunos estudios al respecto, los resultados fueron negativos. En la actualidad, sin embargo, no hemos podido seguir esta línea de investigación.

A. GARCÍA SÁNCHEZ: A propósito de la formación de GMPc, ¿sabéis si el aumento de calcio intracelular es sensible a toxina pertúsica?

V. SÁNCHEZ MARGALET: Fundamentalmente no lo eran, ya que la señal era más baja pero había un aumento del calcio.

A. GARCÍA SÁNCHEZ: Un posible mecanismo podría explicarse por esta vía. La NO sintetasa dependiente del calcio se puede activar por entrada de calcio o por movilización, y pueden ser sensibles a toxina pertúsica si en la entrada de calcio o en la movilización está involucrada una proteína G sensible a la toxina pertúsica.