



# Insulina. Estructura, síntesis, secreción, depuración y degradación (Revisión)

Freddy González-Mujica <sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Médico. Cirujano. PhD. en Bioquímica. Sección de Bioquímica Médica, Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela  
freddygonzalezmujica@gmail.com

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 19 de Junio del 2017 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

## RESUMEN

La insulina es una hormona polipeptídica formada por 2 cadenas, una de 21 aminoácidos, la A y otra de 30 aminoácidos, la B, unidas por 2 enlaces disulfuro y existe un tercer enlace disulfuro dentro de la cadena A. La estructura secundaria es muy compleja para el tamaño de la molécula, presentando estructura  $\alpha$  helicoidal y giros  $\beta$  en ambas cadenas y lámina  $\beta$  en la cadena B. La forma activa de la insulina es monomérica, así está en la circulación general, es la que se une al receptor y existe a concentraciones de 10-6 M. A concentraciones mayores se forman dímeros por interacciones entre las cadena B. En los gránulos secretorios de las células  $\beta$  la insulina forma hexámeros coordinados con 2 átomos de Zn<sup>2+</sup> y es la forma de almacenamiento de la hormona. En humanos existe un solo gen de la insulina ubicado en el cromosoma 11p15.5 en el cual se encuentran 3 exones y 2 intrones. El ARNm maduro en 5' posee 7-metil guanosina y en 3' una cola de poliadenina, dicha molécula sirve de molde para la síntesis de la preproinsulina de 110 aminoácidos, ésta madura por la eliminación del péptido líder cuando entra al retículo endoplasmático dando origen a proinsulina la cual se

pliega y forma los enlaces disulfuro antes de ser transferida al aparato de Golgi donde se elimina el péptido C dando la insulina la cual se almacena en gránulos secretorios. Existen controles transcripcionales y post-transcripcionales durante la síntesis de insulina y ambos procesos están bajo regulación. La secreción de insulina puede depender de los canales de K<sup>+</sup>ATP, mecanismo mediante el cual se libera insulina y está en relación directa a la glicemia y al metabolismo de la glucosa. La producción de ATP corre paralelo con la utilización de la glucosa lo cual incrementa la relación ATP/ADP y esto condiciona el cierre de los canales de K<sup>+</sup>ATP despolarizándose la membrana plasmática con la apertura de los canales de Ca<sup>2+</sup> incrementándose la concentración intracelular del mismo y secretándose la insulina. El mecanismo independiente de los canales de K<sup>+</sup>ATP es mediado por las incretinas (péptido insulinotropico dependiente de glucosa GIP y el peptido 1 similar al glucagón GLP1), las cuales se unen a su receptor y mediante unas proteínas G incrementan la actividad de la adenilato ciclase y en consecuencia se eleva la cantidad de AMPc y con ello la actividad de la proteína quinasa A y de Epac 2 liberándose la insulina. Los mecanismos de secreción de insulina están regulados de manera muy precisa y se adecuan a los requerimientos metabólicos del organismo. La depuración de insulina ocurre en todas las células sensibles a la hormona pero en mayor medida en el hígado, riñón y músculo esquelético. La insulina unida al receptor es internalizada en vesículas endocíticas donde se inicia su degradación por la participación de una enzima específica que degrada insulina (IDE por sus siglas en inglés).

**PALABRAS CLAVE:** Insulina, estructura de insulina, síntesis de insulina, secreción de insulina, depuración de insulina, degradación de insulina, preproinsulina, proinsulina, incretinas, diabetes.

## INSULIN. STRUCTURE, SYNTHESIS, SECRETION, CLEARENCE AND DEGRADATION

### SUMMARY

Insulin is a polypeptide hormone formed by 2 chains, one of 21 amino acids, A and another of 30 amino acids, B, linked by 2 disulfide bonds and a third disulfide bond exists within the A chain. The secondary structure is very complex for the size of the molecule, presenting  $\alpha$  helical structure and  $\beta$ -turns in both chains and  $\beta$ -sheet in the B-chain. The active form of insulin is monomeric, so it is in the general circulation, also it is the one that binds to the receptor and exists at concentrations of 10-6 M. At higher concentrations dimers are formed by interactions between the B chains. In the secretory granules of the  $\beta$  cell the insulin forms hexamers coordinated with 2 Zn<sup>2+</sup> atoms and is the form of storage of the hormone. In humans there is a single insulin gene located in the chromosome 11p15.5 in which 3 exons and 2 introns are found. Mature mRNA in 5' possesses 7-methyl guanosine and in 3' a polyadenine tail, which serves as a template for the synthesis of 110 amino acids preproinsulin. It matures by eliminating the leader peptide when it enters the endoplasmic reticulum giving rise to proinsulin which folds and forms the disulfide bonds before being transferred to the Golgi apparatus where the C-peptide is removed giving the insulin which is stored in secretory granules. There are transcriptional and post-transcriptional controls during insulin synthesis and both processes are under regulation. Insulin secretion may depend on K<sup>+</sup>ATP channels, a mechanism by which insulin is released in direct relation to glycaemia and glucose metabolism. The production of ATP is parallel to glucose utilization, which increases the ATP / ADP ratio and this condition closure of the K<sup>+</sup>ATP channels depolarizing the plasma

membrane with the opening of the  $\text{Ca}^{2+}$  channels, increasing its intracellular concentration and secreting the insulin. The mechanism independent of  $\text{K}^+$ -ATP channels is mediated by incretin (glucose-dependent insulinotropic peptide GIP and glucagon-like peptide 1 GLP1-), which bind to its receptor and by G proteins increase the activity of adenylate cyclase and consequently increases the amount of cAMP and thus the activity of protein kinase A and of Epac 2 are increased, releasing the insulin. The mechanisms of insulin secretion are regulated very precisely and are adapted to the metabolic requirements of the body. The clearance of insulin occurred in all cells sensitive to the hormone, but it is higher in liver, kidney and skeletal muscle. Insulin binds to its receptor is internalized in endocytic vesicles where its degradation start by the action of a specific enzyme that degraded insulin (IDE).

**KEY WORDS:** Insulin, insulin structure, insulin synthesis, insulin secretion, insulin clearance, insulin degradation, preproinsulin, proinsulin, incretins, diabetes.

## INSULINA. ESTRUCTURA, SÍNTESIS, SECRECIÓN, DEPURACIÓN Y DEGRADACIÓN (REVISIÓN)

### INTRODUCCIÓN

La insulina es una hormona polipeptídica anabólica de 51 aminoácidos, secretada por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans, la cual consta de dos cadenas polipeptídicas designadas A y B conectadas por enlaces disulfuro. Una de las funciones primarias de la hormona es la de incrementar la toma de glucosa desde la sangre por los tejidos muscular y adiposo, y la reducción de la producción hepática de glucosa lo cual en su conjunto se traduce en la regulación de la homeostasis de la glucosa y en la prevención de la diabetes mellitus <sup>(1)</sup>. La diabetes se caracteriza por una disminución de la tolerancia a la glucosa como resultado de una deficiencia relativa de la producción de insulina o una falta de sensibilidad a la hormona o a una combinación de ambas, lo cual trae como consecuencia hiperglicemia y esta última generalmente se asocia con complicaciones tales como enfermedad vascular, en particular coronariopatía, enfermedad vascular cerebral, retinopatía, nefropatía y neuropatía <sup>(2)</sup>.

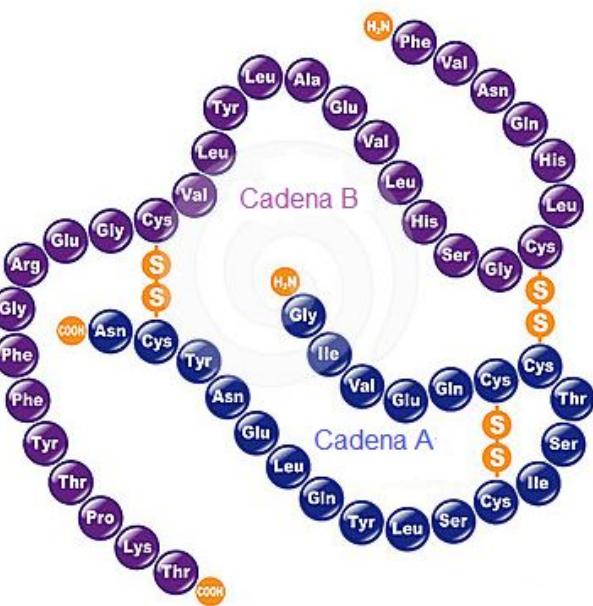
En 1890 se demostró que la pancreatectomía condiciona el desarrollo de diabetes <sup>(3)</sup>. Schafer en 1916 <sup>(4)</sup>, especuló sobre la existencia de una hormona antidiabética producida por los islotes pancreáticos la cual designó como "insulina"; poco después se demostró que la ligadura del conducto pancreático conduce a la destrucción del páncreas exocrino y solo se produce diabetes si los islotes de Langerhans son destruidos también <sup>(5)</sup>. Posteriormente los trabajos de Banting, Best, Collip y MacCleod <sup>(6)</sup> condujeron al descubrimiento de la insulina la cual no solo controla la homeostasis de la glucosa sino también participa en la regulación del metabolismo intermedio de lípidos y proteínas, en la síntesis de ARN y ADN y en el crecimiento y diferenciación celular.

En el presente trabajo pasaremos revista a las características estructurales de la insulina, al mecanismo de su síntesis y maduración, a los aspectos relacionados con su secreción,

depuración y degradación.

## ESTRUCTURA DE LA INSULINA

La insulina monomérica consta de dos cadenas polipeptídicas: la cadena A está formada por 21 aminoácidos y la cadena B por 30 aminoácidos unidas por enlaces disulfuro y con un peso molecular de 5800 Dalton. El monómero posee 3 enlaces disulfuro, dos de ellos entre las cadenas A y B (A7 con B7 y A20 con B19) y uno dentro de la cadena A (A6 con A11)<sup>(7)</sup>. Sanger<sup>(8)</sup> y su grupo establecieron la secuencia de aminoácidos de ambas cadenas polipeptídicas así como la ubicación de los enlaces disulfuro, lo cual se muestra en la Figura 1.

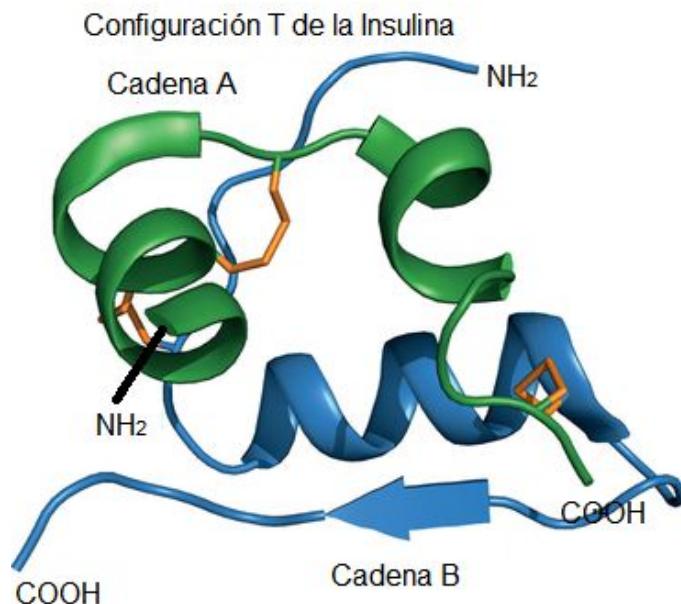


**Figura 1.** Secuencia de aminoácidos de la insulina humana. Se esquematiza en azul la secuencia de aminoácidos de la cadena A (21 aminoácidos) y en violeta los de la cadena B (30 aminoácidos) de la insulina humana. Se destacan en naranja los grupos amino y carboxilo terminales de los aminoácidos iniciales y finales de cada cadena, también se destacan en naranja los enlaces disulfuro entre las cadenas A y B (A7 con B7 y A20 con B19) y entre la cadena A (A6 con A11). Para detalles ver el texto.

La estructura secundaria de la Cadena A consta de 2  $\alpha$  hélices dispuestas antiparalelamente, la primera formada entre los aminoácidos A2 al A8 y la segunda entre los aminoácidos A13 al A19, las dos hélices están conectadas por el segmento de aminoácidos A9 Al A12, el cual está dispuesto en un giro en "U" de tal suerte que ambas hélices se encuentran lado a lado y el extremo amino terminal de una de ellas está próximo al extremo carboxilo terminal de la otra (ver Figura 2) (9).

La estructura secundaria de la cadena B presenta  $\alpha$  hélice y lámina  $\beta$  y cuando se cristaliza existe en dos configuraciones<sup>(10)</sup>. En la configuración T existe una  $\alpha$  hélice central entre los

aminoácidos B9 al B19, la cual muestra un patrón de enlaces de hidrógeno del aminoácido 1 al 5 en lugar del patrón clásico 1 al 4. A continuación de la hélice se encuentra un giro  $\beta$  entre las Gly B20 y B23 permitiendo un plegado en forma de "U". Los residuos de los aminoácidos B24 al B30 forman una lámina  $\beta$  extendida, la cual gracias al giro  $\beta$  se aproxima a la  $\alpha$  hélice central con la Phe B24 y la Tyr B26, de la lámina  $\beta$ , en intimo contacto con las Leu B11 y B15, de la  $\alpha$  hélice central (Figura 2). En la configuración R existe una  $\alpha$  hélice desde B1 hasta B19 con el resto de la estructura como se describió antes (9). Los enlaces disulfuro entre las Cys A7 y B7 y A20 y B19 contribuyen a estabilizar la estructura nativa de la insulina. La estructura secundaria de ambas cadenas A y B es sorprendentemente compleja para un péptido pequeño y esas intrincadas interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácidos contribuyen a determinar la afinidad de la hormona por su receptor.

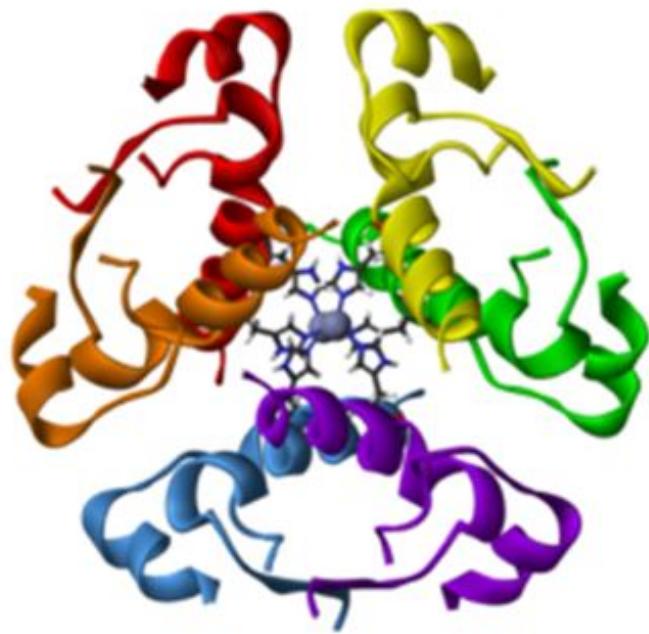


**Figura 2.** Estructura secundaria de la insulina. Se esquematiza en verde la estructura secundaria de la cadena A destacándose las dos  $\alpha$  hélices antiparalelas como cintas y el giro  $\beta$  que las une. La cadena B está esquematizada en azul, la porción de  $\alpha$  hélice central se destaca como una cinta y la estructura en lámina  $\beta$  como una flecha en forma de cinta. Se destacan en naranja los enlaces disulfuro, también se destacan los grupos amino y carboxilo terminales de ambas cadenas. El esquema corresponde a la configuración T.

La estructura monomérica de la insulina existe a concentraciones de aproximadamente  $10^{-6}$  M, es la forma que está presente en la circulación general y es la forma activa de la hormona que se une a su receptor. A concentraciones superiores ( $\approx 10^{-5}$  M), como la que se encuentra en la circulación portal, la insulina forma dímeros, gracias al establecimiento de puentes de hidrógeno y enlaces hidrofóbicos entre los aminoácidos de los extremos carboxilo terminales de las cadenas B, en configuración de lámina  $\beta$ , de dos moléculas de insulina (11).

La insulina se deposita en las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos en gránulos densos, en los cuales se encuentra la insulina en forma cristalina insoluble y hexamérica, la concentración de insulina en dichos gránulos es de aproximadamente 40 mM (11). En el hexámero las 6

moléculas de insulina se agrupan en 3 dímeros, además se coordinan con 2 átomos de  $Zn^{2+}$  a través del grupo imidazol de 3 histidinas (His B10) y también el  $Zn^{2+}$  forma enlaces de coordinación con 3 moléculas de agua. En el hexámero las 6 moléculas de insulina están en la configuración T antes descrita <sup>(11)</sup> (Figura 3). Por lo antes mencionado se puede afirmar que la configuración monomérica de la insulina es la forma activa de la hormona y que el hexámero es la configuración de depósito.



**Figura 3.** Configuración hexamérica de la insulina. En el esquema se muestran los 6 monómeros de insulina con diferentes colores agrupados en 3 dímeros, cada uno de los cuales forma un enlace de coordinación, a través de la His B10, con los 2 átomos de  $Zn^{2+}$  centrales

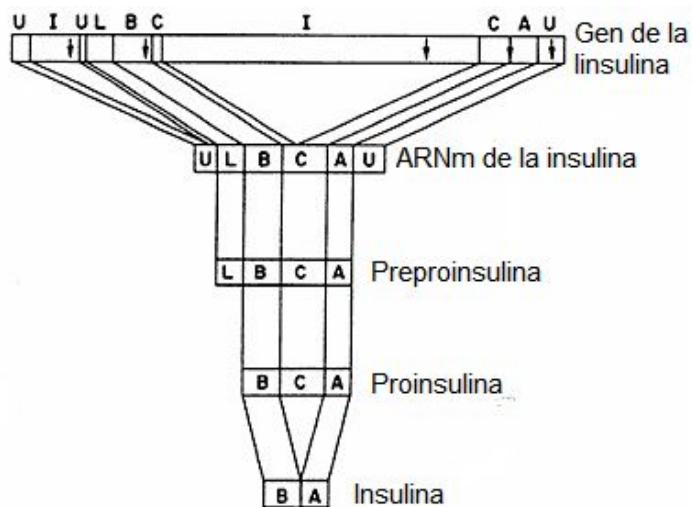
En la insulina se describen 2 sitios de unión al receptor, el sitio 1 o “superficie de unión clásica” incluye aminoácidos de ambas cadenas, siendo los de la cadena A: A1 Gly, A5 Gln, A19 Tyr y A21 Asn y los residuos de la cadena B son: B12 Val, B16 Tyr B24, Phe, B25 Phe y B26 Tyr. En sitio 2 están incluidos también aminoácidos de ambas cadenas: Ser A12, Leu A13, Glu A17, His B10, Glu B13 y Glu B17. En general se acepta que el sitio 1 de la insulina se une al sitio 1 de receptor de la hormona y el sitio 2 de la insulina se une al sitio 2 del receptor <sup>(11)</sup>.

## **BIOSÍNTESIS DE LA INSULINA.**

La insulina es una hormona polipeptídica de 51 aminoácidos, sin embargo se sintetiza como

un precursor de 110 aminoácidos denominado preproinsulina, cuya existencia fue demostrada por Chang y colaboradores<sup>(12)</sup>, en el mismo están unidas sucesivamente las secuencias de aminoácidos de un péptido líder, la cadena B, el péptido C y la cadena A (ver más adelante. Figura 5)

En los humanos existe una copia del gen de la insulina, Harper y colaboradores<sup>(13)</sup> demostraron mediante el uso de hibridación *in situ*, que el gen que codifica para la insulina está ubicado en el brazo corto del cromosoma 11 (11p15.5). Casi simultáneamente se reportó la secuencia de dicho gen<sup>(14)</sup> estableciéndose que el mismo está constituido por 3 exones (región codificante de un gen o preARNm) y 2 intrones (región no codificante de un gen o preARNm). El exón 1 codifica para una región del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) que no se traduce, el exón 2 codifica al péptido señal a la cadena B y parte del péptido C y el exón 3 codifica al resto del péptido C y la cadena A. (Figura 4).

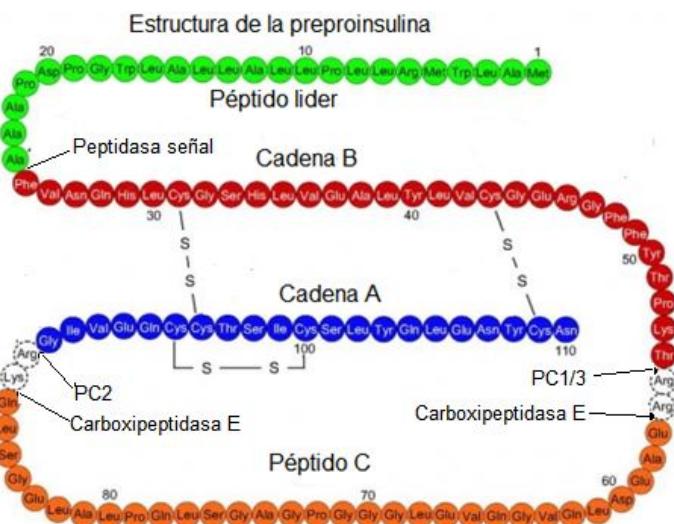


**Figura 4.** Expresión del gen de la insulina. Se esquematizan de arriba abajo la estructura del gen de la insulina, el ARNm maduro, la proteína traducida a partir del mismo, preproinsulina y su maduración hasta producir insulina. Las letras corresponden a: I a los intrones, U a las regiones no traducidas, L al péptido líder, B a la cadena B, C al péptido C y A a la cadena A.

La primera etapa en la síntesis de la insulina ocurre a nivel de los ácidos nucleicos, el ARN transcripto primario mediante el mecanismo del "splicing" (eliminación de intrones y empalme de exones) pierde los dos intrones, en el extremo 5' se le adiciona 7-metil guanosina (casquete) y en el extremo 3' se le añade la cola de poliadenina (poli A) obteniéndose el ARNm maduro el cual es traducido en el retículo endoplasmático rugoso para dar preproinsulina.

Como ocurre con otras proteínas secretadas, la preproinsulina (Figura 5) contiene un péptido señal o líder amino terminal hidrofóbico de 24 aminoácidos, el cual al ser sintetizado en los ribosomas y antes de concluir la síntesis total de la proteína, se une en el citosol a partículas ribonucleoproteicas que reconocen al péptido señal (SRP por sus siglas en inglés)<sup>(15)</sup>. Dichas partículas facilitan que la preproinsulina sea translocada a través de la membrana del retículo endoplasmático hasta la cisterna del mismo. Este proceso ocurre por medio de un canal

especializado que conduce péptidos (16), una vez en la cisterna del retículo endoplasmático, el péptido señal de la preproinsulina es hidrolizado gracias a la participación de una peptidasa señal generándose la proinsulina (17).



**Figura 5.** Estructura de la preproinsulina humana. En el esquema se representa la secuencia de aminoácidos de la preproinsulina humana. En verde se destaca el péptido líder o señal, en rojo la cadena B, en naranja el péptido C, en azul la cadena A y en transparente los aminoácidos de ambos extremos del péptido C que son eliminados durante el procesamiento de la proinsulina. Se destacan los sitios de acción de las proteasas: peptidasa señal, PC2, PC1/3 y carboxipeptidasa E

El péptido señal es rápidamente degradado y en consecuencia no es un producto de secreción de las células  $\beta$ . A continuación la proinsulina se pliega y ocurre la formación de los tres enlaces disulfuro (18) proceso que requiere una variada gama de proteínas chaperonas del retículo endoplasmático tales como la reductasa de grupos tioles de las proteínas (19). Luego de adquirir el plegamiento tridimensional, la proinsulina es transferida del retículo endoplasmático al aparato de Golgi y entra a vesículas secretoras inmaduras.

La proinsulina a pesar de su mayor tamaño comparte varias de las características físicas de la insulina, la proinsulina forma dímeros y hexámeros de coordinación con el  $Zn^{2+}$ , tienen puntos isoeléctricos similares, igual solubilidad y reacción cruzada con los anticuerpos. Estos hallazgos sugieren que la estructura de la insulina en la proinsulina está conservada y que el péptido C, de unos 35 aminoácidos, tiene una configuración flexible pero no completamente desordenada.

La conversión de proinsulina en insulina se inicia en el trans Golgi y se acelera en los gránulos prosecretarios en la medida en que estos se acidifican y maduran, la misma tiene lugar por la participación de unas endopeptidasas similar a la tripsina y una exopeptidasa similar a la carboxipeptidasa B. En los gránulos secretorios existen dos endoproteasas que participan en la conversión de proinsulina en insulina denominadas PC2 y PC1/3, la primera hidroliza después de los aminoácidos básicos Lys-Arg en la unión péptido C/cadena A y la segunda preferentemente hidroliza antes del dipéptido Arg-Arg en la unión cadena B/ péptido C aun

cuando puede actuar en ambos extremos (Figura 5). Ambas endopeptidasas presentan un pH óptimo cercano a 5,5 consistente con el encontrado en los gránulos secretores de las células  $\beta$ , el cual se alcanza gracias a la participación de una bomba de protones presente en dichos gránulos secretorios (20). La enzima que elimina los dipéptidos básicos después de la acción de PC2 y PC1/3 se denomina carboxipeptidasa E (Figura 5). Los estudios cinéticos han demostrado que primero actúa PC1/3 generando un intermediario y luego lo hace PC2 y por último la carboxipeptidasa E. A diferencia del péptido líder, el péptido C no es hidrolizado y es secretado junto con la insulina en cantidades equimolares.

La insulina recién sintetizada forma cristales con el  $Zn^{2+}$ , el cual es transportado al interior de los gránulos por un transportador denominado ZnT8 (21), dichos cristales se acumulan en el centro electrónico denso de los gránulos y en la periferia menos densa se encuentra el péptido C.

Las insulinopatías clásicas: insulina Chicago en la cual se sustituye la Leu B25 por Phe (22) ; insulina Los Ángeles en la cual se reemplaza la Phe B24 por Ser (23) e insulina Wakayama en la cual se sustituye Val A3 por Leu (23) resultan de mutaciones puntuales acumulándose en la sangre las insulinas mutantes las cuales presentan una menor capacidad para unirse al receptor de insulina y en consecuencia una menor actividad biológica. Síndromes clínicos raros resultan de mutaciones en otros sitios que afectan etapas claves en la biosíntesis de la insulina (23).

## REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE INSULINA

La biosíntesis de la insulina está regulada tanto a nivel de la transcripción como de la traducción. Las secuencias de señales que determinan la exclusividad de la expresión del gen de la insulina en las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos están ubicadas entre - 520 y + 1 pares de bases relativas al inicio de la transcripción (24).

En las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos existen unos 13.000 gránulos secretorios los cuales ocupan aproximadamente un 10 % del volumen celular y cada gránulo contiene cerca de 200.000 moléculas de insulina (25). Sin embargo el contenido de insulina de las células  $\beta$  es altamente dinámico, acumulándose la hormona en la presencia de nutrientes y disminuyéndose en la ausencia de los mismos. La habilidad de las células  $\beta$  de responder rápidamente a señales celulares, generalmente está relacionado con regulación post-transcripcional. En la región promotora del gen de la insulina existen un número de secuencias de bases denominadas elementos A, C, E, Z y el elemento que responde al AMPc (CRE por sus siglas en inglés) que determinan la localización de la insulina en las células  $\beta$ , así como también la unión a diferentes factores de transcripción los cuales determinan la regulación de la expresión genética de la insulina (26). La región promotora del gen de la insulina se extiende aproximadamente a unas 400 pares de bases antes del punto de inicio de la transcripción (26).

Es interesante mencionar que uno de los factores de transcripción que une al elemento C es denominado MafA el cual se expresa exclusivamente en las células  $\beta$ , con lo cual condiciona, al menos en parte, la exclusividad de la expresión del gen de la insulina en dichas células<sup>(27)</sup> y además media la regulación de la expresión del gen de la insulina por la glucosa.

En respuesta a la presencia de nutrientes, las células  $\beta$  incrementan la síntesis proteica, por lo menos en parte, por la desfosforilación del factor eucariota de iniciación 2a (eIF2a por sus siglas en inglés) mediante la participación de la proteína fosfatasa 1 la cual es estimulada por glucosa<sup>(28)</sup>, por el contrario la quinasa pancreática del retículo endoplasmático fosforila a eIF2a regulando negativamente la traducción.

En las células  $\beta$  existe un mecanismo que permite detectar la cantidad de insulina almacenada y secretada y consecuentemente ajustar su síntesis. La proteína granular transmembranosa denominada autoantígeno de las células de los islotes 512 (ICA512 por sus siglas en inglés) es una parte esencial del mecanismo de control por retroalimentación. Los gránulos de insulina se fusionan transitoriamente con la membrana plasmática para liberar insulina y simultáneamente la elevada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  activa una proteasa  $\mu$  calpain la cual hidroliza el segmento citoplasmático de ICA512; éste último migra al núcleo donde se une al factor de transcripción STAT5, impidiendo su defosforilación y regulando positivamente la expresión del gen de la insulina<sup>(29)</sup>. En consecuencia la liberación de insulina contenida en los gránulos secretores es comunicada al núcleo donde funciona como un mecanismo de retroalimentación positiva iniciándose la síntesis de insulina con lo cual se mantiene una cantidad adecuada de la hormona en depósito.

La velocidad de la traducción del ARNm de la preproinsulina se incrementa cuando los islotes pancreáticos son incubados con altas concentraciones de glucosa (25 mM) evento que es independiente de la transcripción<sup>(30)</sup>.

Los resultados de los estudios *in vitro* indican que la estabilidad del ARNm de la preproinsulina disminuye en condiciones de una baja concentración de glucosa y por el contrario se incrementa con la elevación de la concentración de la hexosa<sup>(31)</sup>.

Las proteínas que unen polipirimidinas, regiones ricas en uridina y citosina en la región 5' no traducida del ARNm, incrementan la viabilidad del ARN y estimulan el inicio de la traducción no solo de la preproinsulina sino también de otras proteínas de los gránulos secretorios tales como la ICA512 y la PC2. Es interesante mencionar que en la región 5' no transcrita del ARNm de la preproinsulina existe una secuencia de bases que juega un papel esencial en la regulación de la traducción, ya que su remoción bloque la estimulación de la síntesis de preproinsulina por la glucosa<sup>(32)</sup>.

La regulación post-transcripcional modula la síntesis de la insulina de manera inmediata, por el contrario la regulación transcripcional modifica la síntesis de insulina a largo plazo.

## SECRECIÓN DE INSULINA

En los sujetos sanos la liberación de la insulina está exactamente controlada para alcanzar las demandas metabólicas, las células  $\beta$  detectan los cambios en la glicemia y liberan la cantidad exacta de insulina <sup>(33)</sup>. Para detectar el estado nutricional las células  $\beta$  están agrupadas en islotes los cuales están conectados estratégicamente con los vasos sanguíneos. Los islotes forman una densa red con los vasos sanguíneos pequeños y reciben 10 veces más sangre que el tejido exocrino circundante. Los capilares que irrigan los islotes están fenestrados, estructura que incrementa la permeabilidad capilar, lo cual permite un íntimo contacto de las células  $\beta$  con los nutrientes presentes en la sangre, así mismo facilita que la insulina secretada alcance la circulación <sup>(34)</sup>. Además de la glucosa, algunos aminoácidos y ácidos grasos pueden regular la secreción de insulina.

La secreción de insulina se realiza mediante dos mecanismos: uno relacionado con los canales de  $K^+$  dependientes de ATP y otro que es independiente de dichos canales. A continuación discutiremos ambos mecanismos.

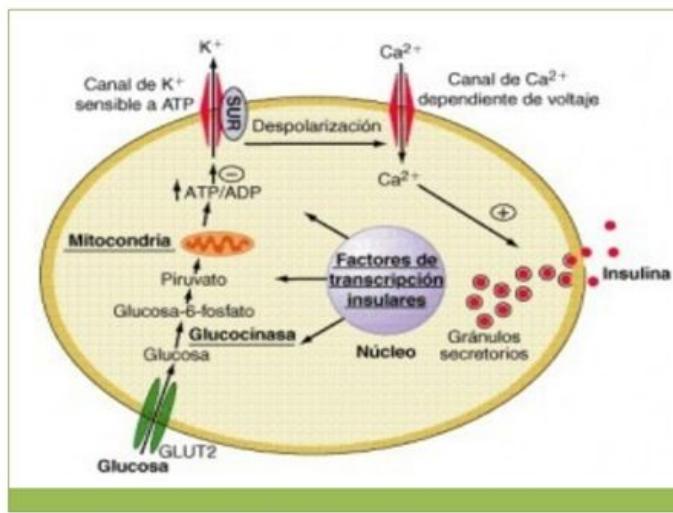
### Secreción de insulina dependiente de canales de $K^+$ ATP.

Los islotes de Langerhans son pequeños órganos encargados de detectar los cambios en las cantidades de los nutrientes y hormonas presentes en el medio ambiente que los rodea, además de responder a estímulos nerviosos. El aparato secretor de insulina de las células  $\beta$  está equipado con controles metabólicos en diferentes etapas de señalización que están bajo riguroso control. La maquinaria metabólica de las células  $\beta$  está diseñada para detectar las variaciones de la glicemia y liberar insulina de acuerdo a los requerimientos del organismo<sup>(35)</sup>. Además de la glucosa, algunos aminoácidos incluyendo glutamina y leucina, así como los ácidos grasos son capaces de estimular la secreción de insulina en respuesta a la glucosa <sup>(35,36)</sup>. La estimulación de la secreción de insulina en la fase temprana pre-absortiva es mediada por la inervación parasimpática de los islotes <sup>(37)</sup>.

El metabolismo de la glucosa en las células  $\beta$ , corre paralelo con el incremento en la producción de ATP y el consecuente aumento de la relación ATP/ADP lo cual condiciona el cierre y la inhibición de los canales de potasio dependientes de ATP ( $K^+$ ATP) despolarizándose la membrana plasmática. Los canales de  $K^+$ ATP son un complejo constituido por 4 subunidades del receptor sensibles a las sulfonilureas 1 (SUR 1, por sus siglas en inglés), las cuales son las subunidades regulatorias sensibles a ATP y que se encuentran rodeando a 4 subunidades del canal iónico de potasio (Kir6.2) propiamente dicho. Cuando la relación ATP/ADP se incremente la subunidad SUR1 une ATP cerrando el canal iónico de  $K^+$  con lo cual se incrementa la concentración intracelular del catión, despolarizándose la membrana plasmática. En respuesta a la despolarización de la membrana plasmática por el cierre de los canales de  $K^+$ ATP se abren los canales de  $Ca^{++}$  tipo L dependientes de voltaje y se produce un influjo de  $Ca^{++}$  lo cual es conocido como uno de los eventos primarios en la exocitosis de la insulina (Ver Figura 6) <sup>(38)</sup>.

La habilidad de las células  $\beta$  de responder a las fluctuaciones de la glicemia en un rango

comprendido entre 3 y 16 mM se puede realizar gracias al concurso de dos proteínas; la primera de ellas es el transportador de glucosa independiente de  $\text{Na}^+$  (GLUT 1 en el hombre y GLUT 2 en roedores) que presenta un alto  $KM$  para la glucosa ( $\approx 17 \text{ mM}$ ) lo cual permite un rápido equilibrio de la concentración de glucosa intra y extra celular; la otra es la hexoquinasa IV o glucoquinasa, la cual cataliza la primera reacción de la utilización de la glucosa y en particular de la glicólisis con un  $KM$  para la glucosa de  $\approx 10 \text{ mM}$ <sup>(39)</sup>. La combinación de la participación del GLUT 1 y de la glucoquinasa condicionan un incremento de la glicólisis y del ATP, casi paralelamente con el incremento de la glicemia y en consecuencia una liberación de insulina proporcional al cambio en la concentración de glucosa en sangre<sup>(35)</sup>. En las células  $\beta$  la glicólisis y el ciclo de Krebs están estrechamente relacionados por la baja expresión genética de la lactato deshidrogenasa lo cual permite aún más un paralelismo entre la glicemia, la producción de ATP y la secreción de insulina<sup>(40)</sup>.



**Figura 6.** Mecanismo de la secreción de insulina por las células  $\beta$  pancreáticas dependiente de los canales  $\text{K}^+\text{ATP}$ . La utilización de la glucosa, por las células  $\beta$  corre paralela con la glicemia gracias a la participación del GLUT 2 (en roedores) y de la glucoquinasa, con lo cual la síntesis de ATP está relacionada con la glicemia. El incremento de la relación ATP/ADP cierra los canales de  $\text{K}^+\text{ATP}$  despolarizándose la membrana plasmática lo cual condiciona la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{++}$  produciéndose la liberación de insulina. Para detalles ver el texto.

La secreción de insulina está orquestada por varios factores, evidentemente el  $\text{Ca}^{++}$  es uno de ellos, además existen efectores proteicos de la exocitosis asociados a las vesículas (un factor soluble sensible a N-etilmaleimida que se une a un receptor proteico, SNARE por sus siglas en inglés), que contienen insulina, y a la membrana plasmática lo cual facilita la fusión entre ambas<sup>(41)</sup>.

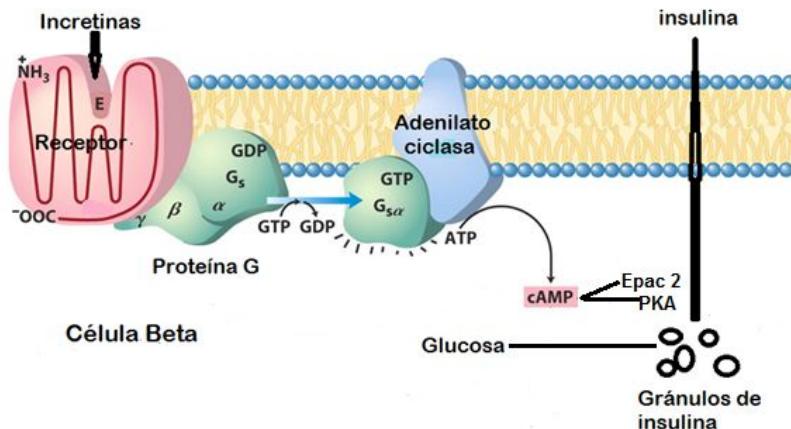
La secreción de insulina transcurre en dos fases, la primera consiste de un pico inicial que ocurre entre 3 y 10 minutos de la ingesta de alimentos y una segunda fase de desarrollo más lento; la primera fase está disminuida en los pre-diabéticos y está casi totalmente ausente en los diabéticos tipo 2 con una disminución variable de la segunda fase<sup>(42)</sup>. De los aproximadamente 13.000 gránulos de insulina que existen en la célula  $\beta$  unos 500 están

adosados a la membrana plasmática y de estos unos 100 muy próximos a los canales de  $\text{Ca}^{++}$  y que son los que contribuyen a la primera fase de secreción; una vez que estos han liberado la insulina, son reemplazados por el reclutamiento de otros gránulos produciéndose la segunda fase más sostenida (43).

#### Secreción de insulina independiente de los canales de $\text{K}^{+}\text{ATP}$

Las incretinas son hormonas producidas en el intestino en respuesta a la ingesta de alimentos, y que han sido reconocidas como estimuladoras fisiológicas de la secreción de insulina (44). El polipéptido insulíntrópico dependiente de glucosa (GIP por sus siglas en inglés) es secretado por las células K, ubicadas en la parte proximal del intestino delgado y el péptido 1 similar al glucagón (GLP 1 por sus siglas en inglés) es producido por las células L ubicadas en la porción distal del intestino delgado y el colon (45).

Tanto GIP como GLP 1 se unen, en las células  $\beta$  pancreáticas, a un receptor de membrana constituido por 3 subunidades, el cual por medio de una proteína G estimula la adenilato ciclase, ésta enzima a su vez incrementa la concentración intracelular de AMPc y éste estimula la secreción de insulina por un mecanismo dependiente de la vía de la proteinquinasa A (PKA por sus siglas en inglés) y otro dependiente de una proteína intercambiadora estimulada directamente por AMPc 2 (Epac 2 por sus siglas en inglés). El mecanismo por el cual la vía de PKA estimula la secreción de insulina no está claro pero es independiente del cierre de los canales de  $\text{K}^{+}\text{ATP}$  y la subsecuente despolarización de las células  $\beta$  y el incremento de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, pero si está estrechamente relacionado con la concentración sanguínea de glucosa (Ver Figura 7) (46). Por otro lado, Epac 2 se une a AMPc y funciona como un factor intercambiador de nucleótidos de guanina para las proteínas de bajo peso molecular similar a Ras, denominada Rap 1. La interacción de Epac 2 con Rap 1 es un evento crítico para promover la exocitosis de las vesículas que contienen insulina; además Epac 2 interactúa con una proteína de andamiaje denominada Rim 2 la cual está localizada tanto en la membrana de las vesículas secretoras como en la membrana plasmática, lo cual permite las etapas de acoplamiento e iniciación de la exocitosis (47).



**Figura 7.** Secreción de insulina por las células  $\beta$  mediada por incretinas e independiente de los canales  $\text{K}^{+}\text{ATP}$ . Las incretinas se unen a receptores de membrana en las células  $\beta$  los cuales

por modulación de proteínas G condicionan el incremento en AMPc y éste estimula la proteína quinasa A y a Epac 2, aumentándose la liberación de insulina por un mecanismo desconocido pero dependiente de glucosa.

#### Regulación de la secreción de insulina

a.- Glucosa. Éste carbohidrato es el estímulo primario para la liberación de insulina en muchos animales incluyendo el hombre; en humanos, la ingesta de 75 g de glucosa incrementa los niveles de insulina desde el basal, de 20-30 pmol/L, hasta 250-300 pmol/L en 30 minutos, mientras que una ingesta similar de lípidos o de lípidos más proteínas solo incrementa los valores de insulina hasta 50-60 pmol/L (48).

Las células  $\beta$  no cuentan con un receptor de membrana para la glucosa que les permita detectar los cambios de concentración; sin embargo el mecanismo antes descrito (Secreción de insulina dependiente de los canales de  $K^+ATP$ ) les permite a las células  $\beta$  adecuar finamente la secreción de insulina a la glicemia.

La ingesta de una cantidad de glucosa incrementa más la secreción de insulina que la administración intravenosa de una cantidad similar de glucosa (49) debido a la liberación de las incretinas por las células del intestino que incrementa la secreción de insulina (Secreción de insulina independiente de los canales de  $K^+ATP$ ).

b.- Aminoácidos. En general los aminoácidos individuales son pobres secretagogos de insulina, sin embargo algunas combinaciones de aminoácidos, a concentraciones fisiológicas o superiores pueden estimular la secreción de insulina tal es el caso de la combinación de glutamina y leucina (50).

c.- Ácidos grasos. Recientemente se ha demostrado que las células  $\beta$  tienen receptores para los ácidos grasos y que por medio de los mismos dichas moléculas influencian la liberación de insulina (51).

d.- Estrógenos. Las células  $\beta$  no son blancos clásicos de los estrógenos, sin embargo en dichas células se encuentran receptores estrogénicos. La principal consecuencia fisiológica de la acción del 17  $\beta$  estradiol es el incremento de la secreción de insulina (52).

e.- Melanotonina. Es la hormona producida por la glándula pineal, la misma atenúa la liberación de insulina por las células  $\beta$  probablemente por disminución de la producción de AMPc (53).

f.- La leptina es secretada por el tejido adiposo y es conocida la influencia que tiene sobre el efecto de la insulina en los tejidos adiposo y hepático. Generalmente se acepta que tiene un efecto inhibitorio sobre la liberación de insulina (54).

g.- Hormona de crecimiento. Una de las acciones mejor conocidas de la hormona de crecimiento es la estimulación de la síntesis del factor I de crecimiento similar a la insulina, el cual disminuye los niveles séricos de insulina y péptido C en humanos (55).

H.- Acetilcolina y colecistoquinina. Este neurotransmisor y la hormona producida por el duodeno potencian la secreción de insulina mediante el catabolismo del fosfoinositol (9). Ambas moléculas se unen a sus respectivos receptores en la membrana plasmática de las células  $\beta$  y mediante proteínas G activan la fosfolipasa C, la cual hidroliza al fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2 por sus siglas en inglés) produciendo inositol 1,4,5-trifosfato (IP3 por sus siglas en inglés) y diacilglicero, los cuales actúan como segundos mensajeros liberando calcio del retículo endoplasmático (9). El incremento del calcio citosólico incrementa la liberación de insulina como se describió antes (Secreción de insulina dependiente de los canales de  $K^+ATP$ ).

#### Depuración y degradación de insulina

La captura y degradación de la insulina es una característica de todos los tejidos sensibles a la hormona (56). A concentraciones fisiológicas, la captura de insulina está mediada por el receptor con una mínima participación de procesos no específicos. La vida media de la insulina es de 4 a 6 minutos, como se pudiera esperar de una rápida respuesta a los cambios de la glicemia (56).

El hígado es el principal órgano depurador de insulina, es capaz de captar el 50% de la hormona presente en la circulación portal (57). La depuración hepática de la insulina está disminuida en la diabetes y la obesidad (58). El riñón depura el 50% de la insulina de la circulación general y el 70% del péptido C circulante por filtración glomerular, reabsorción y degradación (59). Además de hígado y riñón el tejido muscular juega un papel importante en la depuración de insulina (58).

En condiciones normales la casi totalidad de la insulina es degradada intracelularmente o por lo menos en procesos que ocurren a nivel de la membrana plasmática (58). La etapa inicial, en la toma de la insulina por las células, es la unión de la hormona a su receptor, constituyendo un reservorio de insulina la cual puede regresar a la circulación o ser internalizada (60). La insulina unida al receptor es internalizada en vesículas endocíticas, donde puede ocurrir el inicio de la degradación de la hormona gracias a la participación de una enzima específica que degrada insulina (IDE por sus siglas en inglés) o ser transferida intacta a otros organelos intracelulares como el núcleo, el aparato de Golgi, el citosol, entre otros (58) o su liberación de la célula intacta por diacitosis o retroendocitosis (58). La degradación de la insulina se puede considerar como un mecanismo de terminar su acción.

## REFERENCIAS

1. Bliss M. 1982. The Discovery of Insulin. Chicago: University of Chicago Press 6.
2. Leslie RGD and Robbins DC 1995 Diabetes: Clinical Science in Practice, Cambridge University Press 221-271.
3. Von Mering J and Minkowski O 1890 Diabetes mellitus nach pankreas exterpation. Arch Exp Path Pharmacol (Leipzig) 26:371.
4. Schafer EA 1916. An introduction to the study of internal secretion. In: The Endocrine Organs. London: Longmans, Gree.
5. Barron M. 1920. The relation of the islets of Langerhans to diabetes with special reference to cases of pancreatic lithiasis. *Surg Gynecol Obstet* 31:437-448.
6. Banting FG and Best CH. 1921. The internal secretion of the pancreas. *J Lab Clin Med* 7:247-253
7. Abel JJ. 1926. Crystalline insulin. *Proc Natl Acad Sci*. 12: 132-136.
8. Sanger F. 1959. Chemistry of insulin; determination of the structure of insulin opens the way to greater understanding of life processes. *Science*. 129: 1340-1344
9. Fu Z. Gilbert ER. and Liu D. 2013. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Curr Diabetes Rev*. 9: 25-53.
10. Baker EN, Blundell TL, Cutfield JF, Cutfield SM, Dodson EJ, Dodson GG, Hodgkin DC, Hubbard RE, Isaacs NW, Reynolds CD, Sakabe K, Sakabe N, Vijayan M. 1988. The structure of 2 Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution. *Philos Trans R Soc London*. B319:369-456.
11. De Meyts P. 2004. Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *Bioessays*. 26: 1351-62.
12. Chan SJ, Keim P, and Steiner DF. 1976. Cell-free synthesis of rat preproinsulins: characterization and partial amino acid sequence determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73: 1964-1968.
13. Harper ME, Ullrich A, and Saunders GF. 1981. Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 78: 4458-4460.
14. Bell, G.I., Pictet, R.L., Rutter, W.J., Cordell, B., Tischer, E., and Goodman, H.M. 1980. Sequence of the human insulin gene. *Nature* 284:26-32.
15. Egea PF, Stroud RM and Walter P. 2005. Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Curr Opin Struct Biol*. 15: 213-20.
16. Lomedico PT, Chan SJ, Steiner DF and Saunders GF. 1977. Immunological and chemical characterization of bovine preproinsulin. *J Biol Chem*. 252: 7971-7978.
17. Patzelt C, Labrecque AD, Duguid JR, Carroll RJ, Keim PS, Heinrikson RL, and Steiner DF.

1978. Detection and kinetic behavior of preproinsulin in pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 75: 1260-1264.
18. Huang XF and Arvan P. 1995. Intracellular transport of proinsulin in pancreatic beta-cells. Structural maturation probed by disulfide accessibility. *J Biol Chem*. 270: 20417-20423.
19. Munro S and Pelham HR. 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*. 48: 899-907.
20. Smeekens SP, Albiges-Rizo C, Carroll R, Martin S, Ohagi S, Phillips LA, Benig M, Gardner P, Montag AG, Swift HH, Thomas G and Steiner DF 1992 Proinsulin processing by the subtilisin-related proprotein convertases furin, PC2, and PC3. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8822-8826.
21. Davidson HW, Wenzlau JM and O'Brien RM. 2014. Zinc transporter 8 (ZnT8) and beta cell function. *Trends Endocrinol Metab*. 25: 415-424.
22. Kwok SC, Steiner DF, Rubenstein AH and Tager HS. 1983. Identification of a point mutation in the human insulin gene giving rise to a structurally abnormal insulin (insulin Chicago). *Diabetes*. 32: 872-875.
23. Nishi M and Nanjo K. 2011. Insulin gene mutations and diabetes. *J Diabetes Investigig*. 2: 92-100.
24. Bucchini D, Ripoche MA, Stinnakre MG, Desbois P, Lores P, Monthioux E, Absil J, Lepesant JA, Pictet R and Jami J. 1986. Pancreatic expression of human insulin gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83: 2511-2515.
25. Howell SL. 1984. The mechanism of insulin secretion. *Diabetologia*. 26: 319-327.
26. Hay CW and Docherty K. 2006. Comparative analysis of insulin gene promoters: implications for diabetes research. *Diabetes*. 55: 3201-3213.
27. Matsuoka TA, Artner I, Henderson E, Means A, Sander M and Stein R. 2004. The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 2930-2933.
28. Vander Mierde D, Scheuner D, Quintens R, Patel R, Song B, Tsukamoto K, Beullens M, Kaufman RJ, Bollen M and Schuit FC. 2007. Glucose activates a protein phosphatase-1-mediated signaling pathway to enhance overall translation in pancreatic beta-cells. *Endocrinology*. 148: 609-617.
29. Mziaut H, Trajkovski M, Kersting S, Ehninger A, Altkruger A, Lemaitre RP, Schmidt D, Saeger HD, Lee MS, Drechsel DN, Muller S and Solimena M. 2006. Synergy of glucose and growth hormone signalling in islet cells through ICA512 and STAT5. *Nat Cell Biol*. 8: 435-445.
30. Itoh N and Okamoto H. 1980. Translational control of proinsulin synthesis by glucose. *Nature*. 283: 100-102.
31. Giddings SJ, Chirgwin J and Permutt MA. 1982. Effects of glucose on proinsulin messenger RNA in rats in vivo. *Diabetes*. 31: 624-629.

32. Wicksteed B, Uchizono Y, Alarcon C, McCuaig JF, Shalev A and Rhodes CJ. 2007. A cis-element in the 5' untranslated region of the preproinsulin mRNA (pplGE) is required for glucose regulation of proinsulin translation. *Cell Metab.* 5: 221-227.
33. Schmitz O, Rungby J, Edge L and Juhl CB. 2008. On high-frequency insulin oscillations. *Ageing Res Rev.* 7: 301-305.
34. Suckale J and Solimena M. 2008. Pancreas islets in metabolic signaling--focus on the beta-cell. *Front Biosci.* 13: 7156-7171.
35. Nolan CJ and Prentki M. 2008. The islet beta-cell: fuel responsive and vulnerable. *Trends Endocrinol Metab.* 19: 285-291.
36. Nolan CJ, Madiraju MS, Delghnngaro-Augusto V, Peyot ML, and Prentki M. 2006. Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes*; 55 (Suppl 2): S16-23.
37. Ruiz De Azua I, Gautam D, Guettier JM and Wess J. 2011. Novel insights into the function of beta-cell M3 muscarinic acetylcholine receptors: Therapeutic implications. *Trends Endocrinol Metab.* 22: 74-80.
38. Ashcroft FM and Rorsman P. 2012. Diabetes mellitus and the beta cell: The last ten years. *Cell* 148: 1160-1171.
39. Zou C-Y, Gong Y and Liang, J. 2014. Metabolic signaling of insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cell and its derangement in type 2 diabetes. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 18: 2215-2227.
40. Sekine N, Cirulli V, Regazzi R, Brown LJ, Gine E, Tamarit-Rodriguez J, Girotti M, Marie S, Macdonald MJ, Wollheim CB and Rutter GA. 1994. Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic beta-cells. Potential role in nutrient sensing. *J Biol Chem.* 269: 4895-4902.
41. Kwan EP and Gaisano HY. 2009. Rescuing the subprime meltdown in insulin exocytosis in diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 1152: 154-164.
42. Nolan CJ, Damm P and Prentki M. 2011. Type 2 diabetes across generations: From pathophysiology to prevention and management. *Lancet.* 378: 169-181.
43. Wang Z and Thurmond DC. 2009. Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis—roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J Cell Sci.* 122: 893-903.
44. Drucker DJ. 2006. The biology of incretin hormones. *Cell Metab.* 3: 153-165.
45. Ishii H, Sato Y, Takei M, Nishio S and Komatsu M. 2011. Glucose-incretin interaction revisited. *Endocrine J.* 58: 519-525.
46. Seino S, Takahashi H, Fujimoto W and Shibasaki T. 2009. Roles of cAMP signalling in insulin granule exocytosis. *Diabetes Obes Metab* 11: 180-188.
47. Seino S and Shibasaki T. 2005. "PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis". *Physiol Rev.* 85: 1303-1342.

48. Chang TW and Goldberg AL. 1978. The metabolic fates of amino acids and the formation of glutamine in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 253: 3685-3693.
49. Nauck MA, Bartels E, Orskov C, Ebert R and Creutzfeldt W. 1993. 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.
50. Dixon G, Nolan J, McClenaghan N, Flatt PR and Newsholme P. 2003. A comparative study of amino acid consumption by rat islet cells and the clonal beta-cell line BRIN-BD11 - the functional significance of L-alanine. *J Endocrinol.* 179: 447-454.
51. Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, Ogi K, Hosoya M, Tanaka Y, Uejima H, Tanaka H, Maruyama M, Satoh R, Okubo S, Kizawa H, Komatsu H, Matsumura F, Noguchi Y, Shinohara T, Hinuma S, Fujisawa Y and Fujino M. 2003. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature.* 422: 173-176.
52. Nadal A, Rovira JM, Laribi O, Leon-quinto T, Andreu E, Ripoll C and Soria B. 1998. Rapid insulinotropic effect of 17beta-estradiol via a plasma membrane receptor. *FASEB J.* 12: 1341-1348.
53. Peschke E, Peschke D, Hammer T and Csernus V. 1997. Influence of melatonin and serotonin on glucose-stimulated insulin release from perfused rat pancreatic islets in vitro. *J Pineal Res.* 23: 156-163
54. Kulkarni RN, Wang ZL, Wang RM, Hurley JD, Smith DM, Ghatei MA, Withers DJ, Gardiner JV, Bailey CJ and Bloom SR. 1997. Leptin rapidly suppresses insulin release from insulinoma cells, rat and human islets and, in vivo, in mice. *J Clin Invest.* 100: 2729-2736.
55. Guler HP, Schmid C, Zapf J and Froesch ER. 1989. Effects of recombinant insulin-like growth factor I on insulin secretion and renal function in normal human subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86: 2868-2872.
56. Cañas X, Fernández-López JA, Ardévol A, Adán C, Esteve M, Rafecas I, Remesar X and Alemany M. 1995. Rat insulin turnover in vivo. *Endocrinology.* 136: 3871-3876.
57. Sato H, Terasaki T, Mizuguchi H, Okumura K and Tsuji A. 1991. Receptor-recycling model of clearance and distribution of insulin in the perfused mouse liver. *Diabetologia.* 34: 613-621.
58. Duckworth WC, Bennett RG and Hamel FG. 1998. Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev.* 19: 608-624.
59. Rabkin R, Ryan MP and Duckworth WC. 1984. The renal metabolism of insulin. *Diabetologia.* 27: 351-357.
60. Hamel FG, Peavy DE, Ryan MP and Duckworth WC. 1987. HPLC analysis of insulin degradation products from isolated hepatocytes. Effects of inhibitors suggest intracellular and extracellular pathways. *Diabetes.* 36: 702-708.

