

El GLP-1, incretina antidiabética con potencial terapéutico

I. Valverde Alonso

Dpto. Metabolismo, Nutrición y Hormonas.
Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

Correspondencia: Dra. Isabel Valverde, Jefe de Servicio Metabolismo, Nutrición y Hormonas, Fundación Jiménez Díaz, Avda. Reyes Católicos, 2, 28040-Madrid.

E-mail: ivalverde@fjd.es

RESUMEN: El GLP-1 («glucagon-like peptide-1») es una hormona con carácter de incretina, que ayuda a regular la homeostasis de la glucosa, y que está siendo considerada para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 por su acción insulínica y también insulinomimética. *In vitro*, el GLP-1 tiene efectos anabólicos sobre el metabolismo hepático de la glucosa en la rata normal y diabética, y sobre el del músculo de la rata y del hombre. También estimula el del tejido adiposo de rata y humano, en el que el GLP-1 es, además, lipolítico y lipogénico. En estos tres tejidos extrapancreáticos, el GLP-1 parece actuar a través de receptores específicos, de estructura y/o vía de señalización distinta del pancreático, y sobre los que se ha propuesto un inositol fosfoglicano como posible segundo mensajero. Por otro lado, la respuesta secretora de la célula β al GLP-1, modulada en condiciones normales por la concentración extracelular de glucosa, está alterada en la diabetes tipo 2, debido, posiblemente, a la imposibilidad de la célula para reconocer a la hexosa; sin embargo, la presencia, tanto *in vivo* como *in vitro*, de nutrientes no glucídicos, capaces de sortear los defectos específicos de reconocimiento de la célula β diabética hacia la glucosa, como son los ésteres de ácidos dicarboxílicos –succínico, glutámico, pirúvico–, potencia y/o prolonga la acción insulínica del GLP-1. La importancia potencial del GLP-1 en el control de la homeostasis de la glucosa y, por tanto, como posible agente terapéutico en la diabetes, es un hecho que no se debe ignorar, cuyo mecanismo de acción concreto, no del todo conocido, requiere ser aclarado.

PALABRAS CLAVE: GLP-1; Incretina; Diabetes.

La glucosa, si se ingiere, no produce el nivel de glucosuria observado con cantidades mucho menores de azúcar, cuando se administra por vía intravenosa. Este es un hecho conocido desde antiguo, que Claude Bernard, en 1877, justificó en su «Leçons sur le diabète»⁽¹⁾, atribuyendo al hígado el papel captador de gran parte de la hexosa durante el transcurso de su circulación portal. Pero en 1906, Moore y cols.⁽²⁾, en un estudio sobre efectos metabólicos de extractos de intestino, sugirieron que el duodeno proporciona una sustancia inductora de la actividad interna del páncreas –tiempo después denominada incretina–, al igual que la secretina lo era de la externa⁽³⁾; de ello, se intuía la importancia que podía tener la ausencia de ese factor en el desarrollo de ciertas clases de diabetes.

El término *incretina*, que de manera general se refiere a agentes transmisores endocrinos de la liberación de insulina, está muy próximo al de *eje enteroinsular* acuñado en 1969 por Unger y Eisentraut⁽⁴⁾, el cual compren-

de todos los estímulos del intestino delgado que actúan, por cualquier posible vía, sobre el islote de Langerhans, afectando la liberación de sus diversas hormonas. No obstante, aunque muchas de las hormonas o péptidos del aparato digestivo, con funciones gastrointestinales, son capaces también de estimular la secreción de insulina *in vitro* e *in vivo*, únicamente se denomina incretina a aquéllas que actúan a dosis fisiológicas, y que, además, su liberación obedece a la absorción de nutrientes como, y en especial, la glucosa⁽⁵⁾. De hecho, gran parte de las hormonas gastrointestinales, como la colecistoquinina, la secretina, o el péptido intestinal vasoactivo, entre otras, sólo cumplen una de las dos condiciones mencionadas; y sólo la gastrina y el GIP (péptido inhibidor de la secreción ácida del estómago, o péptido insulínico dependiente de glucosa) fueron, durante mucho tiempo, los únicos candidatos a *incretina*.

En 1970, se caracterizó una inmunoreactividad «glucagon-like» (GLI)

en extractos de intestino de perro⁽⁶⁾, que aumentaba tras la administración oral, pero no intravenosa, de glucosa⁽⁷⁾, y que tenía capacidad para estimular la secreción de insulina⁽⁸⁾. A principios de la década de los ochenta, se purifican y caracterizan químicamente dos de los componentes de esa mezcla heterogénea de péptidos: la glicentina⁽⁹⁾ y la oxintomodulina⁽¹⁰⁾, que contienen ambas la molécula del glucagón.

Con el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética, se inicia el conocimiento de los precursores de muchas hormonas en distintas especies animales; y así, en 1983, Bell y cols.⁽¹¹⁾ proporcionan la estructura química del proglucagón humano –160 aminoácidos–, deducida de los nucleótidos del gen, y observan que, además del glucagón, incluye la de otros dos péptidos separados por pares de aminoácidos básicos, similares a aquél («glucagon-like peptides», GLPs), por lo que se les denomina GLP-1 y GLP-2 (Fig. 1). Mediante purificación y análisis secuencial de algunos de los péptidos GLP, se pudo deducir que el proceso postraducción del proglucagón en el páncreas difiere marcadamente del que se produce en el intestino⁽¹²⁾, a partir, como así es, de un ARN mensajero común⁽¹³⁾ (Fig. 2). En las células α del páncreas, el proglucagón da lugar, predominantemente, a proglucagón 1-30 –llamado también péptido pancreático relacionado con la glicentina o GRPP–⁽¹⁴⁾, proglucagón 33-61, que es idéntico al glucagón, proglucagón 64-69⁽¹⁵⁾, y a un fragmento del extremo carboxiterminal, proglucagón 77-158⁽¹⁶⁾. En las células L del intestino, el proceso postraducción da lugar a proglucagón 1-69, también llamado glicentina⁽⁹⁾,

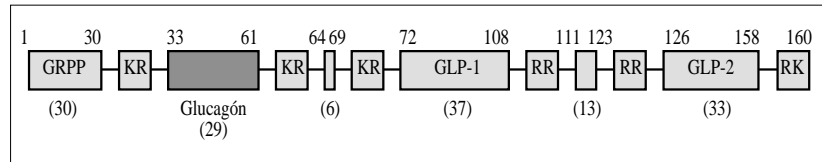


Figura 1. Proglucagón.

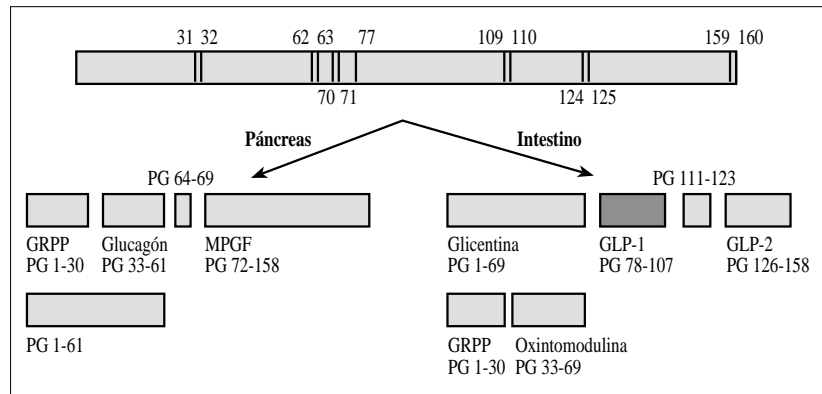


Figura 2. Proglucagón y su procesamiento post-traduccional.

a proglucagón 33-69 u oxintomodulina⁽¹⁰⁾, y a GLP-1 –proglucagón 72-108– y GLP-2 –proglucagón 126-158–^(12, 17). En el intestino de varios mamíferos, incluido el hombre, el GLP-1⁽⁷⁻³⁶⁾ amida es la forma predominante⁽¹⁷⁻²⁰⁾, que se identificará, a partir de ahora, como GLP-1.

La estructura química del GLP-1 es idéntica en varios mamíferos estudiados, incluido el hombre^(21,22), y coincide con la del glucagón en la posición de catorce aminoácidos.

Hoy día se sabe que el GLP-1 es una hormona intestinal, con fuerte carácter de incretina –incluso más potente que el GIP–, tanto en personas normales como en pacientes diabéticos tipo 2⁽²³⁻²⁵⁾, y que provoca una inmediata respuesta del páncreas a estímulos procedentes de la absorción de alimentos –fundamentalmente azúcares y grasas–, en el que estimula la secreción

de insulina e inhibe la de glucagón^(20,26-32). Además, también en estado normal y diabético, reduce la secreción ácida del estómago⁽³³⁻³⁵⁾, enlentece su vaciamiento⁽³⁶⁾, y parece tener una función en la regulación del apetito, induciendo sensación de saciedad⁽³⁷⁻³⁹⁾. Por otro lado, en 1992 se documentó que el GLP-1, administrado en infusión intravenosa continua en sujetos normales, disminuye el aumento de glucosa y el de insulina en sangre producidos tras una comida mixta, y que en sujetos diabéticos tipo 2 y tipo 1, mantenidos en glucemia normal mediante un páncreas artificial, reduce la cantidad de insulina exógena requerida⁽⁴⁰⁾.

Todo indicaba un efecto antidiabético del GLP-1, con el beneficio añadido de que este péptido no produce hipoglucemia, al ejercer su acción en función de la concentración de glucosa; por ello, fue propuesto como agen-

te terapéutico potencial en la diabetes mellitus tipo 2. Como consecuencia, se iniciaron una serie de estudios dirigidos a tal fin, parte de ellos de carácter clínico –vías y modos posibles de administración–⁽⁴¹⁻⁴⁸⁾. Otros, basados, fundamentalmente, en la ya demostrada acción del GLP-1 independiente de la insulina circulante^(40,49,50), se centraron en la acción del péptido sobre el metabolismo de la glucosa en tejidos extrapancreáticos. Como resultado, se ha demostrado que el GLP-1 estimula la incorporación de D-glucosa a glucógeno en el hepatocito aislado y en el músculo esquelético de la rata normal^(51,52) y diabética⁽⁵³⁾, y en miocitos humanos en cultivo primario⁽⁵⁴⁾, y que este efecto glucogénico está asociado a un incremento de la actividad glucógeno sintasa α , y a una estimulación de la oxidación y utilización de glucosa. También se ha documentado, tanto en el músculo⁽⁵⁵⁾, como en el hígado⁽⁵⁶⁾, una proteína de unión para el GLP-1, de aproximadamente 63.000 Mr, que probablemente es distinta al receptor del GLP-1 descrito en el páncreas⁽⁵⁷⁾, ya que el GLP-1, como la insulina, no parece inducir aumento de la actividad adenilato ciclasa. Pero, al igual que la insulina⁽⁵⁸⁾, el GLP-1 genera la producción inmediata de un inositolfosfoglicano en las células HEP-G2 –línea de hepatoma humano–⁽⁵⁹⁾ y en las BC3H –línea de miocitos murinos–⁽⁶⁰⁾, en hepatocitos y adipocitos de rata normal⁽⁶¹⁾ y diabética⁽⁶²⁾, y en miocitos humanos⁽⁶³⁾. Además, en el tejido adiposo de la rata y del hombre, donde el GLP-1 tiene un doble efecto, lipogénico y lipolítico según la dosis⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾, también se ha detectado una unión específica del GLP-1^(67,68). Estos efectos insu-

linomiméticos del GLP-1 en tejidos participantes en el aclaramiento de la glucosa circulante, pueden justificar, al menos en parte, su acción antidiabética.

Por otro lado, se ha documentado que en membranas plasmáticas de tejido adiposo de pacientes diabéticos dependientes de insulina (tipo 1) y del tipo 2, la unión específica del GLP-1 es mayor que en sujetos normales de similar peso⁽⁶⁹⁾, sin cambios significativos en la constante de disociación de alta afinidad ni en la dosis que produce el 50% de inhibición, lo cual indica un número mayor de receptores. Y también se ha encontrado un mayor número de receptores para GLP-1 en el hígado de un modelo experimental de ratas diabéticas tipo 1⁽⁷⁰⁾ y en el músculo esquelético del tipo 1 y tipo 2⁽⁷¹⁾, tejidos en los que el GLP-1 tiene efecto glucogénico. Estos resultados indican que la acción del péptido pudiera ser mayor en estados que cursan con deficiencia de insulina o acción alterada de ésta.

Más recientemente, y a través de un estudio sobre el efecto del tratamiento prolongado con GLP-1 o insulina –mediante infusión continua– de ratas normales y diabéticas tipo 1 y tipo 2, se ha demostrado que el GLP-1 ejerce un control modulador del glucotransportador mayoritario respectivo al hígado, músculo y grasa, a nivel de la traducción y/o postraducción, y que en el músculo y tejido adiposo, la acción del GLP-1 sobre la activación de la transcripción del glucotransportador parece estar condicionada a la presencia adicional de insulina⁽⁷²⁾.

Si bien se ha avanzado en el conocimiento de los efectos insulinomimé-

ticos del GLP-1 en distintos tejidos extrapancreáticos participantes en la homeostasis global del azúcar, como el hepático, el muscular esquelético y el adiposo⁽⁷³⁻⁷⁷⁾, se desconoce, hasta la fecha, la naturaleza exacta de su receptor. No obstante, resultados preliminares indican que el GLP-1, como la insulina, estimula en el hepatocito y en el músculo esquelético la actividad PI3K, y la fosforilación no sólo de la PKB, sino también de la p42/44 MAPK (ERK-2 y ERK-1); sin embargo, y mediante la utilización de inhibidores específicos, parece que la acción estimuladora del GLP-1 sobre la glucógeno sintasa está mediada, fundamentalmente, por la activación del sistema PI3K/PKB^(78,79). En el adipocito aislado de la rata, el efecto estimulador del GLP-1 sobre la lipogénesis parece requerir de la activación de la PI3K, mientras que su acción lipolítica sólo se ve parcialmente reducida en presencia de wortmanina, inhibidor específico de esa vía de señalización⁽⁸⁰⁾.

Por otro lado, todo parece indicar que en la diabetes tipo 2 la célula β sufre de ceguera específica hacia la glucosa, defecto que podría incluir, total o parcialmente, los de subexpresión del gen del Glut-2 o mutación del de la glucoquinasa, hiperactividad de la glucosa-6-fosfatasa, o ausencia, heredada o adquirida, de la glicerolfosfato deshidrogenasa asociada al FAD mitocondrial, y acumulación de glucógeno.

Además, se sabía que en el islote aislado de rata, el GLP-1, en ausencia de glucosa extracelular, mejora marcadamente la respuesta secretora de la célula β al dimetiléster del ácido succínico (SAD)⁽⁸¹⁾, lo que indica que el GLP-1 mantiene su efecto insulino-

pico en presencia de nutrientes no glucídicos, incluso en ausencia total de glucosa. Tras esta observación, se ha documentado, mediante estudios *in vivo*, que la secreción de insulina inducida por GLP-1 se potencia en presencia de SAD, tanto en la rata normal⁽⁸²⁾, como en la diabética tipo 2 –generada por tratamiento con estreptozotocina al nacer⁽⁸³⁾; con el dimetil éster del ácido glutámico y el metilpiruvato, se obtuvieron de nuevo los mismos resultados⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾. También la α -D-glucosa pentaacetato (GPA), que no necesita el transportador de la glucosa para acceder al interior de la célula, potencia la respuesta secretora de ésta al GLP-1 en ambos tipos de rata⁽⁸⁷⁾, y aumenta, además, la secreción de insulina inducida por una sulfonilurea –gliquidona– y por un análogo de la meglitinida –repaglinida⁽⁸⁸⁾. Estos resultados indican que, determinados nutrientes, capaces de sortear los defectos responsables de la ceguera de la célula β diabética a la glucosa, pueden ser utilizados para potenciar y/o prolongar la acción insulino-trópica de agentes antidiabéticos, como el GLP-1.

Los efectos descritos del GLP-1 sobre el metabolismo de la glucosa en tejidos extrapancreáticos han sido confirmados mediante estudios *in vivo*, en el hombre normal y diabético^(40,49, 50,89), en el perro depancreatectomizado⁽⁹⁰⁾, y en la rata diabética⁽⁹¹⁾, en los que el péptido se administró intravenosamente. Algún otro investigador no ha podido detectar estas acciones en sujetos normales⁽⁹²⁻⁹⁵⁾, diabéticos tipo 2^(96,97) y perros diabéticos dependientes de insulina⁽⁹⁸⁾. Sin embargo, recientemente, Vella y cols.⁽⁹⁹⁾ han demostrado en pacientes diabéticos tipo 1 en estado de

hiperglucemia, hiperinsulinemia, y en el transcurso de una administración entérica de glucosa, que el GLP-1 no modifica la captación visceral del azúcar, pero sí estimula la total del organismo, indicando que el tejido muscular y adiposo son probables dianas de la acción del GLP-1.

En cualquier caso, la importancia potencial del GLP-1 en el control de la homeostasis de la glucosa y, por tanto, como posible agente terapéutico en la diabetes, es un hecho que no se debe ignorar, cuyo mecanismo de acción concreto, no del todo conocido, requiere ser aclarado.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido a mi quehacer científico, muy especialmente, a la Dra. María Luisa Villanueva-Peñacarrillo por su pasada y presente participación, al Dr. Roger H. Unger por iniciarme en esta labor, y al Prof. Willy J. Malaisse por su continuado apoyo y colaboración. Agradezco también a la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz su inestimable aporte de becarios, y al Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social por la subvención económica de los trabajos realizados.

BIBLIOGRAFÍA

- Bernard C. *Leçons sur le diabète*. JB Baillière (ed.). Paris, 1877.
- Moore B, Edie ES, Abram JH. On the treatment of diabetes mellitus y acid extract of duodenal mucous membrane. *Biochem J* 1906;1:28-38.
- La Barre J, Still EU. Studies on the physiology of the secretin. III Further studies on the effects of secretin on the blood sugar. *Am J Physiol* 1930;91:649-653.
- Unger RH, Eisentraut AH. Entero-insular axis. *Arch Intern Med* 1969;123:261-266.
- Creutzfeldt W. The incretin concept today. *Diabetologia* 1979;16:75-85.
- Valverde I, Rigopoulou D, Marco J, Faloon GR, Unger RH. Characterization of glucagon-like immunoreactivity (GLI). *Diabetes* 1970;19:614-623.
- Unger RH, Ohneda A, Valverde I, Eisentraut AM, Exton J. Characterization of the responses of circulating glucagon-like immunoreactivity to intraduodenal and intravenous administration of glucose. *J Clin Invest* 1968;47:48-65.
- Ohneda A, Ketterer H, Eisentraut AM, Unger RH. Effects of gut hormone on insulin and glucagon secretion. *Acta Diab Latina* 1968;5 [Suppl 1]:191-203.
- Thim L, Moody AJ. The primary structure or porcine glicentin (proglucagon). *Regul Peptides* 1981;2:139-150.
- Bataille D, Coudray AM, Carlqvist M, Rosselin G, Mutt V. Isolation of glucagon-37 (bioactive enteroglucagon/oxyntomodulin) from porcine jejunum-ileum. Isolation of the peptide. *FEBS Lett* 1982;146:73-78.
- Bell GI, Sanchez-Pescador R, Laybourn PJ, Najarian RC. Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene. *Nature* 1983;304:368-371.
- Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF. Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J Biol Chem* 1986;261:11880-11889.
- Novak U, Wilks A, Buell G, Mc Ewen S. Identical mRNA for preproglucagon in pancreas and gut. *Eur J Biochem* 1987;164:553-558.
- Thim L, Moody AJ. Purification and chemical characterization of a glicentin-related pancreatic peptide (pro-glucagon fragment) from porcine

- pancreas. *Biochim Biophys Acta* 1982;**703**:134-141.
15. Yanaihara C, Matsumoto T, Hong YM, Yanaihara N. Isolation and characterization of glicentin C-terminal hexapeptide in porcine pancreas. *FEBS Lett* 1985;**189**:50-56.
 16. Patzelt C, Schiltz E. Conversion of proglucagon in pancreatic alpha cells: the major end products are glucagon and a single peptide, the major proglucagon fragment, that contains two glucagon-like sequences. *Proc Nat Acad Sci USA* 1984;**81**:5007-5011.
 17. Orskov C, Holst JJ, Knuhtsen S, Baldissera FGA, Poulsen SS, Nielsen OV. Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas. *Endocrinology* 1986;**119**:1467-1475.
 18. Kreyman B, Yiangou Y, Kanse S, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR. Isolation and characterization of GLP-1(7-36)amide from rat intestine. *FEBS Lett* 1988;**242**:167-170.
 19. Holst JJ, Orskov C, Nielsen OV, Schwartz TW. Truncated glucagon-like peptide I, an insulin-releasing hormone from the distal gut. *FEBS Lett* 1987;**211**:169-174.
 20. Kreyman B, Ghatei MA, Williams G, Bloom SR. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet* 1987;**II**:1300-303.
 21. Orskov C, Bersani M, Johnsen AH, Hojrup P, Holst JJ. Complete sequences of glucagon-like peptide-1 from human and pig small intestine. *J Biol Chem* 1989;**264**:12826-12829.
 22. Seino S, Welsh M, Bell GJ, Chan SJ, Steiner DF. Mutation in the guinea-pig proglucagon gene are restricted to a specific portion of the prohormone sequence. *FEBS Lett* 1986;**203**:25-30.
 23. Siegel EG, Schulze A, Schmidt WE, Creutzfeldt W. Comparison of the effect of GIP and GLP-1(7-36amide) on insulin release from rat pancreatic islets. *Eur J Clin Invest* 1992;**22**:154-157.
 24. Elliott RM, Morgan LM, Tredger JA, Deacon S, Wright J, Marks V. Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *J Endocrinol* 1993;**138**:159-166.
 25. Nauck M, Heimesaat MM, Ørskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide-1 (7-36 amide), but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1993;**91**:301-307.
 26. Shima K, Hirota M, Ohboshi C. Effect of glucagon-like peptide-1 on insulin secretion. *Regul Peptides* 1988;**22**:245-252.
 27. Komatsu R, Matsuyama T, Namba M, Watanabe N, Itoh H, Kono N, Tauri S. Glucagonostatic and insulinotropic action of glucagonlike peptide 1-(7-37)-amide. *Diabetes* 1989;**38**:902-905.
 28. Göke R, Wagner B, Fehmann HC, Göke B. Glucose-dependency of the insulin stimulatory effect of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on the rat pancreas. *Res Exp Med Berl* 1993;**193**:97-103.
 29. Nathan DM, Schreiber E, Fogel H, Mojsov S, Habener JF. Insulinotropic action of glucagonlike peptide-1-(7-37) in diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 1992;**15**:270-276.
 30. Qualmann C, Nauck MA, Holst JJ, Orskov C, Creutzfeldt W. Insulinotropic actions of intravenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1) [7-36 amide] in the fasting state in healthy subjects. *Acta Diabetol* 1995;**32**:13-16.
 31. Nauck MA, Kleine N, Orskov C, Holst JJ, Willms B, Creutzfeldt W. Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 1993;**36**:741-744.
 32. Creutzfeldt WO, Kleine N, Willms B, Orskov C, Holst JJ, Nauck MA. Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I(7-36) amide in type I diabetic patients. *Diabetes Care* 1996;**19**:580-586.
 33. Schjoldager BTG, Mortensen DE, Christiansen J, Orskov C, Holst JJ. GLP-1 (glucagon-like peptide 1) and truncated GLP-1, fragments of human proglucagon, inhibits gastric acid secretion in man. *Dig Dis Sci* 1989;**34**:703-708.
 34. O'Halloran DJ, Nikou GC, Kreyman B, Ghatei MA, Bloom SR. Glucagon-like peptide-1(7-36)NH₂: a physiological inhibitor of gastric acid secretion in man. *J Endocrinol* 1990;**126**:169-173.
 35. Wettergren A, Schjoldager B, Mortensen PE, Myhre J, Christiansen J, Holst JJ. Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in human. *Dig Dis Sci* 1993;**38**:665-673.
 36. Willms B, Werner J, Holst JJ, Orskov C, Creutzfeldt W, Nauck MA. Gastric emptying, glucose responses, and insulin secretion after a liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1-(7-36)amide) in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;**81**:327-332.
 37. Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CMB, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JPH, Smith DM, Ghatei MA, Herbert J, Bloom SR. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 1996;**379**:69-72.
 38. Navarro M, Rodríguez de Fonseca F, Álvarez E, Chowen JA, Zueco JA, Gómez R, Eng J, Blázquez E. Colocalization of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors, glucose transporter GLUT-2, and glucokinase mRNAs in rat hypothalamic cells: evidence for a role of GLP-1 receptor agonists as an inhibitory signal for food and water intake. *J Neurochem* 1996;**67**:1982-1991.
 39. Flint A, Raben A, Astrup A, Holst JJ. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J Clin Invest* 1998;**101**:515-520.

40. Gutniak M, Orskov C, Holst JJ, Ahrén B, Efendic S. Antidiabetogenic effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1992;**326**:1316-1322.
41. Dupre J, Behme MT, Hramiak IM, Mcfarlane P, Williamson MP, Zabel P, McDonald TJ. Glucagon-like peptide I reduces postprandial glycemic excursions in IDDM. *Diabetes* 1995;**44**:626-630.
42. Juntti-Berggren L, Pigon J, Karpe F, Hamsten A, Gutniak M, Vignati L, Efendic S The antidiabetogenic effect of GLP-1 is maintained during a 7-day treatment period and improves diabetic dyslipoproteinemia in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1996;**19**:1200-1206.
43. Nauck MA, Wollschlager D, Werner J, Holst JJ, Orskov C, Creutzfeldt W, Willms B. Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 (GLP-1 [7-36 amide]) in patients with NIDDM. *Diabetologia* 1996;**39**:546-1553.
44. Gutniak MK, Larsson H, Heiber SJ, Juneskans OT, Holst JJ, Ahren B. Potential therapeutic levels of glucagon-like peptide I achieved in humans by a buccal tablet. *Diabetes Care* 1996;**19**:843-848.
45. Todd JF, Wilding JP, Edwards CM, Khan FA, Ghatei MA, Bloom SR. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1): a trial of treatment in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 1997;**27**:533-536.
46. Rachman J, Barrow BA, Levy JC, Turner RC. Near-normalisation of diurnal glucose concentrations by continuous administration of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in subjects with NIDDM. *Diabetologia* 1997;**40**:205-211.
47. Larsen J, Hylleberg B, Ng K, Damsbo P. Glucagon-Like Peptide-1 Infusion Must Be Maintained for 24 h/day to Obtain Acceptable Glycemia in Type 2 Diabetic Patients Who Are Poorly Controlled on Sulphonylurea Treatment. *Diabetes Care* 2001;**24**:1416-1421
48. Gutniak MK, Svartberg J, Hellstrom PM, Holst JJ, Adner N, Ahren B. Antidiabetogenic action of glucagon-like peptide-1 related to administration relative to meal intake in subjects with type 2 diabetes. *J Intern Med* 2001;**250**:81-87.
49. D'Alessio DA, Kahn SE, Leusner CR, Ensinnck JV. Glucagon-like peptide 1 enhances glucose tolerance both by stimulation of insulin release and by increasing insulin-independent glucose disposal. *J Clin Invest* 1994;**93**:2263-2266.
50. D'Alessio DA, Prigeon RL, Ensinnck JW. Enteral enhancement of glucose disposition by both insulin-dependent and insulin-independent processes: A physiologic role of Glucagon-like peptide 1. *Diabetes* 1995;**44**:1433-1437.
51. Valverde I, Morales M, Clemente F, López-Delgado MI, Delgado E, Perea A, Villanueva-Peñacarrillo ML. Glucagon-like peptide 1: a potent glycogenic hormone. *FEBS Lett* 1994;**349**:313-316.
52. Villanueva-Peñacarrillo ML, Alcántara AI, Clemente F, Delgado E, Valverde I. Potent glycogenic effect of GLP-1(7-36)amide in rat skeletal muscle. *Diabetologia* 1994;**37**:1163-1166.
53. Morales M, López-Delgado MI, Alcántara A, Luque MA, Clemente F, Márquez L, Puente J, Viñambres C, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I. Preserved effects upon glycogen synthase activity and glucose metabolism in isolated hepatocytes and skeletal muscle from diabetic rats. *Diabetes* 1997;**46**:1264-1269.
54. González N, Luque MA, Acitores A, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I. GLP-1 in human skeletal muscle: characteristics of action. *Diabetologia* 2000;**43**(Suppl 1):A147.
55. Delgado E, Luque MA, Alcántara A, Trapote MA, Clemente F, Galera C, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML. Glucagon-like peptide-1 binding to rat skeletal muscle. *Peptides* 1995;**16**:225-229.
56. Villanueva-Peñacarrillo ML, Delgado E, Trapote MA, Alcántara A, Clemente F, Luque MA, Perea A, Valverde I. Glucagon-like peptide-1 binding to rat hepatic membranes. *J Endocrinol* 1995;**146**:183-189.
57. Thorens B. Expression cloning of the pancreatic B cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;**89**:8641-8645.
58. Stralfors P. Insulin second messengers. *Bioessays* 1997;**19**:327-335
59. Trapote MA, Clemente F, Galera C, Morales M, Alcántara A, López-Delgado MI, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I. Inositolphosphoglycans implicated in the GLP-1(7-36)amide action in the liver. *J Endocrinol Invest* 1996;**19**:114-118.
60. Galera C, Clemente F, Alcántara A, Trapote MA, Perea A, López-Delgado MI, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I. Inositolphosphoglycans and diacylglycerol are possible mediators in the glycogenic effect of GLP-1(7-36)amide in BC3H-1 miocytes. *Cell Biochem Funct* 1996;**14**:43-48.
61. Márquez L, Trapote MA, Luque MA, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML. Inositolphosphoglycans possibly mediate the effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on rat liver and adipose tissue. *Cell Biochem Funct* 1998;**16**:51-56.
62. Márquez L, González N, Puente J, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML. GLP-1 effect in GPI/IPG system in adipocytes and hepatocytes from diabetic rats. *Diab Nutr Metab* 2001;**14**:239-244.
63. Luque MA, Márquez L, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML. A possible mediator in the glycogenic effect of GLP-1 in human skeletal muscle. *Diabetologia* 1998;**41**(Suppl 1): A19.
64. Ruiz-Grande C, Alarcón C, Mérida E, Valverde I. Lipolytic action of glucagon-like peptides in isolated rat adipocytes. *Peptides* 1992;**13**:13-16.
65. Perea A, Viñambres C, Clemente F, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I. GLP-1(7-36)amide effects on glucose transport and metabolism

- in rat adipose tissue. *Horm Metab Res* 1997;**9**: 417-21.
66. Villanueva-Peñacarrillo ML, Márquez L, González N, Díaz-Miguel M, Valverde I. Effect of GLP-1 on lipid metabolism in human adipocytes. *Horm Metab Res* 2001;**33**:73-77.
 67. Valverde I, Mérida E, Delgado E, Trapote MA, Villanueva-Peñacarrillo ML. Presence and characterization of glucagon-like peptide-1(7-36)amide receptors in solubilized membranes of rat adipose tissue. *Endocrinology* 1993;**132**:75-79.
 68. Mérida E, Delgado E, Molina LM, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I. Presence of glucagon and glucagon-like peptide-1(7-36) amide receptors in solubilized membranes of human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;**77**:1654-1657.
 69. Villanueva-Peñacarrillo ML, Mérida E, Delgado E, Molina LM, Arrieta F, Rovira A, Valverde I. Increased glucagon-like peptide 1 (7-36) amide binding in adipose tissue from non-insulin dependent and insulin-dependent diabetic patients. *Diab Nutr Metab* 1994;**7**:143-148.
 70. Valverde I, Delgado E, Mérida E, Vicent D, Trapote MA, Alcántara AI, Villanueva-Peñacarrillo ML. GLP-1(7-36) amide binding in liver membranes from streptozotocin diabetic rats. *Diab Nutr Metab* 1996;**9**:103-105.
 71. Villanueva-Peñacarrillo ML, Delgado E, Vicent D, Mérida E, Alcántara AI, Valverde I. GLP-1(7-36)amide binding in skeletal muscle membranes from streptozotocin diabetic rats. *Endocrine* 1995;**3**:685-687.
 72. Villanueva-Peñacarrillo ML, Puente J, Redondo A, Clemente F, Valverde I. Effect of GLP-1 treatment on GLUT2 and GLUT4 expression in type 1 and type 2 rat diabetic models. *Endocrine* 2001;**15**:241-248.
 73. Oben J, Morgan L, Fletcher J, Marks V. Effect of the entero-pancreatic hormones, gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like polypeptide-1(7-36) amide, on fatty acid synthesis in explants of rat adipose tissue. *J Endocrinol* 1991;**130**:267-272.
 74. Egan JM, Montrose-Rafizadeh C, Wang YH, Bernier M, Roth J. Glucagon-like peptide-1(7-36) amide (GLP-1) enhances insulin-stimulated glucose metabolism in 3T3-L1 adipocytes: One of several potential extrapancreatic sites of GLP-1 action. *Endocrinology* 1994;**135**:2070-2075.
 75. Miki H, Namba M, Nishimura T, Mineo I, Matsumura T, Miyagawa J, Nakajima H, Kuwajima M, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Glucagon-like peptide-1(7-36)amide enhances insulin-stimulated glucose uptake and decreases intracellular cAMP content in isolated rat adipocytes. *Biochim Biophys Acta* 1996;**1312**: 132-136.
 76. Yang H, Egan JM, Wang Y, Moyes CD, Roth J, Montrose MH, Montrose-Rafizadeh C. GLP-1 action in L6 myotubes is via a receptor different from the pancreatic GLP-1 receptor. *Amer J Physiol* 1998;**275**:C675-C683.
 77. O'Harte FP, Gray AM, Abdel-Wahab YH, Flatt PR. Effects of non-glycated and glycated glucagon-like peptide-1(7-36) amide on glucose metabolism in isolated mouse abdominal muscle. *Peptides* 1997;**18**:1327-1333.
 78. Redondo A, Acitores A, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML. Phosphatidylinositol 3-kinase possibly involved in the GLP-1 effect in the liver. *Diabetologia* 2000;**43**(Suppl 1):A30.
 79. Acitores A, Redondo A, Trigo MV, Sancho V, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I. GLP-1 activates PI3K and PKB in rat skeletal muscle. *Diabetologia* 2001;**44**(Suppl 1): A10.
 80. Redondo A, González N, Trigo MV, Sancho V, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML. GLP-1 induces PI3K activation in rat adipocytes. *Diabetologia* 2001;**44**(Suppl 1):A192.
 81. Zhang T-M, Ladrière L, García-Martínez JA, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ. Effect of succinic acid dimethyl ester on GLP-1 secretion and insulinotropic action of glucagon-like peptide 1. *Med Sci Res* 1996;**24**:349-350.
 82. García-Martínez JA, Cancelas J, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ. Potentiation of the insulinotropic action of GLP-1 by succinic acid dimethyl ester in fed anaesthetised rats. *Horm Metab Res* 2000;**32**:306-309.
 83. García-Martínez JA, Cancelas J, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ. Prolongation of the insulinotropic action of glucagon-like peptide 1 by the dimethyl ester of succinic acid in an animal model of type-2 diabetes. *Int J Mol Med* 2000;**6**:319-321.
 84. Valverde I, Cancelas J, Villanueva-Peñacarrillo ML, Malaisse WJ. Potentiation by methyl pyruvate of GLP-1 insulinotropic action in normal rats. *Int J Mol Med* 2001;**7**:621-623.
 85. Cancelas J, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ. Potentiation by glutamic acid dimethyl ester of GLP-1 insulinotropic action in fed anaesthetized rats. *Int J Mol Med* 2001;**8**:531-532.
 86. Cancelas J, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ. Potentiation and or prolongation of glucagon-like peptide 1 insulinotropic action by either methyl pyruvate or the dimethyl ester of L-glutamic acid in an animal model of type-2 diabetes. *Endocrine* 2001;**16**:113-116.
 87. Cancelas J, García-Martínez JA, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ. Synergistic insulinotropic action of D-glucose pentaacetate and GLP-1 in rats. *Med Sci Res* 1999;**27**:853-856.
 88. García-Martínez JA, Ladrière L, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ. Insulinotropic action of a-D-glucose pentaacetate in vivo. *Diab Nutr Metab* 1997;**10**:198-202.
 89. Shalev A, Ninnis R, Keller U. Effects of glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) on glucose kinetics during somatostatin-induced suppression

- of insulin secretion in healthy men. *Horm Res* 1998;**49**:221-225.
90. Sandhu H, Wiesenthal SR, MacDonald PE, McCall RH, Tchipashvili V, Rashid S, Satkunarajah M, Irwin DM, Shi ZQ, Brubaker PL, Wheeler MB, Vranic M, Efendic S, Giacca A. Glucagon-like peptide 1 increases insulin sensitivity in depancreatized dogs. *Diabetes* 1999;**48**:1045-1053.
91. Mizuno A, Kuwajima M, Ishida K, Noma Y, Murakami T, Tateishi K, Sato I, Shima K. Extraprepancreatic action of truncated glucagon-like peptide-1 in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats, an animal model for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1997;**46**:745-749.
92. Toft-Nielson M, Madsbad S, Holst JJ. The effect of glucagon-like peptide I (GLP-I) on glucose elimination in healthy subjects depends on the pancreatic gluco regulatory hormones. *Diabetes* 1996;**45**:552-556.
93. Orskov L, Holst JJ, Moller J, Orskov C, Moller N, Alberti KG, Schmitz O. GLP-1 does not acutely affect insulin sensitivity in healthy man. *Diabetologia* 1996;**39**:1227-1232.
94. Larsson H, Holst JJ, Ahren B. Glucagon-like peptide-1 reduces hepatic glucose production indirectly through insulin and glucagon in humans. *Acta Physiol Scand* 1997;**160**:413-422.
95. Ryan AS, Egan JM, Habener JF, Elahi D. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1-(7-37) appears not to augment insulin-mediated glucose uptake in young men during euglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;**83**:2399-2404.
96. Ahren B, Larsson H, Holst JJ. Effects of glucagon-like peptide-1 on islet function and insulin sensitivity in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;**82**:473-478.
97. Vella A, Shah P, Basu R, Basu A, Holst JJ, Rizza RA. Effect of glucagon-like peptide 1(7-36) amide on glucose effectiveness and insulin action in people with type 2 diabetes. *Diabetes* 2000;**49**:611-617.
98. Freyse EJ, Knospe S, Becher T, El Hag O, Goke B, Fischer U. Glucagon-like peptide-1 has no insulin-like effects in insulin-dependent diabetic dogs maintained normoglycemic and normoinsulinemic. *Metabolism* 1999;**48**:134-137.
99. Vella A, Shah P, Basu R, Basu A, Camilleri M, Schwenk FW, Holst JJ, Rizza RA. Effect of glucagon-like peptide-1(7-36)-amide on initial splanchnic glucose uptake and insulin action in humans with type 1 diabetes. *Diabetes* 2001;**50**:565-572.