

Revisiones

El GLP-1: acción biológica y posibles efectos terapéuticos

I. VALVERDE, J. CANCELAS Y M.L. VILLANUEVA-PEÑACARRILLO

*Departamento de Metabolismo, Nutrición y Hormonas.
Fundación Jiménez Díaz. Madrid. España.*

GLP-1: BIOLOGICAL ACTION AND POSSIBLE THERAPEUTIC EFFECTS

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) is an incretin hormone that contributes to the control of glucose homeostasis. Because of its insulintropic, insulinotrophic and insulinomimetic actions, it is being considered for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *In vitro*, GLP-1 has anabolic effects on glucose metabolism in the liver of normal and diabetic rats and in rat and human skeletal muscle and fat; moreover, in fat tissue, GLP-1 is also lipolytic and lipogenic. In these three extrapancreatic tissues, GLP-1 seems to act through specific receptors, distinct in structure and/or signaling pathway from pancreatic one, for which an inositolphosphoglycan has been proposed as a possible second messenger. The secretory response of β cells to GLP-1, modulated in normal conditions by the extracellular glucose concentration, is altered in type 2 diabetes mellitus, possibly due to the inability of the cell to recognize the hexose; however, non-glucose nutrients able to bypass the specific hexose recognition defects of the diabetic β cell, such as dicarboxylic acid esters, potentiate and/or prolong the insulintropic action of GLP-1. Moreover, GLP-1 not only plays a regulatory role in food intake, by inducing satiety, but also seems to have beneficial effects on central and peripheral neurodegenerative syndromes. The value of the potential therapeutic role of GLP-1, not only in diabetes but also in obesity and cardiac and central nervous system diseases, should not be ignored, and its mechanism of action, which is not clearly understood, requires elucidation.

Key words: GLP-1. Incretin. Diabetes. Obesity. Alzheimer.

El GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*) es una hormona con carácter de incretina que contribuye al control de la homeostasis de la glucosa, y que por su acción insulintropica, insulinotrófica y también insulinomimética, se está considerando para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *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 y la grasa de la rata y del hombre; en el tejido adiposo, el GLP-1 es, además, lipolítico y lipogénico. En estos 3 tejidos extrapancreáticos, el GLP-1 parece actuar a través de receptores específicos, distintos en estructura y/o vía de señalización del pancreático, sobre los que se ha propuesto un inositolfosfoglicano 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, 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, potencian y/o prolongan su acción insulintropica. Además, el GLP-1 no sólo ejerce un papel regulador de la ingestión de alimentos, induciendo sensación de saciedad, sino que también parece tener acciones beneficiosas en síndromes de carácter neurodegenerativo central y periférico. En cualquier caso, el valor del papel potencial terapéutico del GLP-1 no sólo en la diabetes sino también en la obesidad y en las enfermedades cardíacas y nerviosas, es un hecho que no se debe ignorar, cuyo mecanismo de acción concreto, no del todo conocido, requiere aclaración.

Palabras clave: GLP-1. Incretina. Diabetes. Obesidad. Alzheimer.

El conocimiento de los precursores de muchas hormonas, en distintas especies animales, se inicia con el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética. Así, en 1983, Bell et al¹ proporcionan la estructura química del proglucagón humano (160 aminoácidos), deducida de los nucleótidos del gen, y observan que, además de glucagón, incluye la de otros 2 péptidos similares a aquél, separados por pares de aminoácidos básicos (*glucagon-like peptides* [GLP]), denominados GLP-1 y 2. Mediante purificación y análisis secuencial de algunos de los péptidos GLP, se pudo deducir que el proceso postraduccionál del proglucagón en el páncreas difiere marcadamente del intestino², a partir, como así es, de un ARN

Correspondencia: Dra. I. Valverde.
Departamento de Metabolismo, Nutrición y Hormonas. Fundación Jiménez Díaz.
Avda. Reyes Católicos, 2. 28040 Madrid. España.
Correo electrónico: ivalverde@fjd.es

Manuscrito recibido el 4-7-2005; aceptado para su publicación el 5-9-2005.

mensajero común³. En las células α del páncreas, el proglucagón da lugar, predominantemente, a proglucagón 1-30 (también llamado péptido pancreático relacionado con la glicentina [GRPP])⁴, proglucagón 33-61 (idéntico al glucagón), proglucagón 1-61⁵, y un fragmento del extremo carboxiterminal, proglucagón 77-158⁶. En las células L del intestino, el proceso postraducciona da lugar a proglucagón 1-69, también llamado glicentina⁷, a proglucagón 33-69 u oxintomodulina⁸, y a GLP-1 (proglucagón 72-108) y 2 (proglucagón 126-158)^{2,9}. En el intestino de varios mamíferos, incluido el hombre, el GLP-1(7-36)amida es la forma predominante⁹⁻¹², 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^{13,14}, y coincide con la del glucagón en la posición de 14 aminoácidos.

Hoy día, se sabe que el GLP-1 es una hormona intestinal con carácter de incretina, tanto en personas normales como en pacientes diabéticos tipo 2¹⁵⁻¹⁷, que aumenta su secreción tras la ingestión de alimentos, fundamentalmente azúcares y grasas, y provoca una inmediata respuesta del páncreas, en el que estimula la secreción de insulina e inhibe la de glucagón^{10,11,18-23}; además, estimula la síntesis de insulina^{24,25} y tiene efectos tróficos sobre la célula β , con lo que promueve su crecimiento, su diferenciación y su regeneración²⁶. También reduce la secreción ácida del estómago y enlentece su vaciamiento²⁷⁻³⁰.

Por otro lado, en 1992, se documentó que el GLP-1, administrado en infusión intravenosa continua en sujetos sanos, disminuye el aumento de glucosa e 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 el requerimiento de insulina exógena³¹. Ello indicaba propiedades antidiabéticas del GLP-1, que ofrecía el beneficio añadido de no producir hipoglucemia, ya que su acción insulinoatrópica depende de la concentración de glucosa²¹. Como consecuencia, se inició una serie de estudios, parte de ellos de carácter clínico (vías y posibles modos de administración)³²⁻³⁹, y otros basados fundamentalmente en el ya demostrado efecto reductor del GLP-1 sobre la glucemia, independientemente de la insulina circulante^{31,40,41}, y que se centraron en su acción 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^{42,43} y diabética⁴⁴ y en el músculo y los miocitos humanos en cultivo primario⁴⁵, y que su efecto glucogénico está asociado a un incremento de la actividad glucogénica sintasa α y a una estimulación de la oxidación y utilización de glucosa. También se ha documentado, tanto en el músculo⁴⁶ como en el hígado⁴⁷, la presencia de una proteína de unión para el GLP-1, de aproximadamente 63.000 Da, probablemente distinta de su receptor

en el páncreas⁴⁸, ya que, en estos tejidos, el GLP-1, como la insulina, no parece inducir un aumento en la actividad de la adenilciclase. Pero, al igual que la insulina⁴⁹, el GLP-1 genera la producción inmediata de un inositolfosfolucano en las células HEP-G2 (línea de hepatoma humano)⁵⁰, en las BC3H (línea de miocitos murinos)⁴⁹, en hepatocitos y adipocitos de rata sana⁵² y diabética⁵³ y en miocitos humanos⁴⁵. Además, en el tejido adiposo de la rata y del hombre, donde el GLP-1 tiene una doble acción, lipogénica y lipolítica según la dosis⁵⁴⁻⁵⁶, también se ha detectado una unión específica del péptido^{57,58}. Estos efectos del GLP-1 en tejidos participantes en el aclaramiento de la glucosa circulante, iguales a los de la insulina, pueden justificar, al menos en parte, su acción antidiabética.

Por otro lado, se ha propuesto que la acción del GLP-1 podría ser más eficiente en estados que cursan con deficiencia de insulina o acción alterada de ésta. De hecho, resultados obtenidos en membranas plasmáticas de tejido adiposo de pacientes diabéticos dependientes de insulina (tipo 1) y del tipo 2 muestran que la unión específica del GLP-1 es mayor que en el de sujetos normales de peso similar⁵⁹; además, sugieren la presencia de un número mayor de receptores, también detectada en el hígado de un modelo experimental de diabetes tipo 1 en la rata⁶⁰ y en el músculo esquelético de las de tipo 1 y 2⁶¹, tejidos en los que el GLP-1 es glucogénico. A través de un estudio sobre el efecto del tratamiento prolongado con GLP-1 o insulina, mediante infusión continua, de ratas sanas y diabéticas tipo 1 y 2, se ha demostrado que el GLP-1 ejerce un control modulador del glucotransportador mayoritario en el hígado, el músculo y la grasa, en cuanto a la traducción y/o postraduccion, aunque su acción sobre la transcripción en el músculo y el tejido adiposo parece estar condicionada a la presencia adicional de insulina⁶².

Mucho se ha avanzado en el conocimiento de los efectos del GLP-1 en distintos tejidos extrapancreáticos participantes en la homeostasis del azúcar⁶³⁻⁶⁷, pero hasta la fecha se desconoce la naturaleza exacta de su receptor. Sin embargo, sí se sabe que el GLP-1, como la insulina, estimula la actividad de distintas cinasas en el hepatocito, el adipocito y el músculo esquelético, y que varias de ellas median su acción estimuladora sobre el transporte y el metabolismo de la glucosa y de los lípidos⁶⁸⁻⁷⁰.

También, mediante la administración intravenosa de GLP-1 en el hombre sano y diabético^{31,40,41,73}, y en el perro pancreatectomizado⁷⁴ y la rata diabética⁷⁵, se han confirmado *in vivo* los efectos del GLP-1 sobre el metabolismo de la glucosa en tejidos extrapancreáticos descritos *in vitro*. Aunque algunos investigadores no han conseguido detectar estas acciones *in vivo*⁷⁶⁻⁸², Vella et al⁸³ han documentado que en pacientes diabéticos tipo 1 en estado de hiperglucemia, hiperinsulinemia y en el transcurso de una administración entérica de glucosa, el GLP-1 no modifica la captación visceral del azúcar, pero sí estimula la total del organismo,

lo que indica que los tejidos muscular y adiposo son probables dianas de su acción. Además, se ha demostrado la existencia de efectos insulinomiméticos del GLP-1 en sujetos obesos resistentes a la insulina⁸⁴, y que el GLP-1 incrementa el aclaramiento de glucosa hepática en el perro, con independencia de la secreción de insulina⁸⁵.

A todo lo anterior hay que añadir el que el GLP-1 parece regular el apetito induciendo sensación de saciedad⁸⁶⁻⁸⁸. Relacionado con ello, se ha demostrado que tanto en pacientes con obesidad mórbida como en diabéticos tipo 2 la secreción de GLP-1 está disminuida. En ambas situaciones, la administración de GLP-1 puede ser beneficiosa, como se ha demostrado⁸⁹, al inducir una reducción de la ingestión de alimentos y también de la glucemia. De hecho, cuando pacientes obesos son sometidos a cirugía bariátrica, la secreción de GLP-1 aumenta notablemente no sólo la basal, sino también la respuesta tras la ingestión del alimento, con lo que mejora el metabolismo de la glucosa y el estado diabético asociado con frecuencia a la obesidad⁹⁰.

Pero, al parecer, la acción positiva del GLP-1 se extiende a sistemas más allá de los relacionados con el metabolismo del azúcar. De hecho, se ha propuesto que el tratamiento con GLP-1 beneficiaría a pacientes con enfermedad de Alzheimer y otras condiciones neurodegenerativas centrales y periféricas. A este respecto, se sabe de la existencia de receptores del GLP-1 en el cerebro, que se relacionan con su papel central en el control de la ingestión de alimentos, y que la estimulación de estos receptores neuronales por GLP-1, que es neurotrófico, regula la plasticidad y la vida celular de las neuronas⁹¹. Además, el GLP-1 reduce los valores endógenos del péptido β amiloide en el cerebro de ratón y los de su proteína precursora en neuronas en cultivo, al margen de proteger las neuronas de la apoptosis inducida por el glutamato⁹². Estas acciones del GLP-1 también las ejerce la exendina-4 (Ex-4), péptido de origen natural no mamífero, que no sólo comparte con el GLP-1 el 53% de su estructura sino que es mimético de éste también con relación a su efecto insulinotrópico y estimulador del metabolismo de la glucosa y de lípidos en tejidos extrapancreáticos^{45,71,92-94}. Además, se ha informado recientemente que la infusión de GLP-1 tras angioplastia, a pacientes con infarto agudo de miocardio y disfunción sistólica grave añadida, mejora la función global del ventrículo izquierdo, y esta acción del péptido resulta particularmente útil, sobre todo porque la tradicional terapia con glucosa-insulina-potasio es inadecuada en estos casos⁹⁵.

Por otro lado, se supo que, en el islote aislado de páncreas de rata, el GLP-1 mejoraba marcadamente la respuesta secretora de la célula β al dimetiléster del ácido succínico (SAD) (nutriente no glucídico), incluso en ausencia total de glucosa⁹⁶. Este hallazgo fue muy prometedor en relación con la diabetes tipo 2, en la que su célula β parece presentar una especie de ceguera específica hacia la hexosa, defecto que puede incluir, total o parcialmente, la subexpresión del gen

del GLUT-2, la mutación del de la glucocinasa, la hiperactividad de la glucosa-6-fosfatasa, la ausencia, heredada o adquirida, de la glicerolfosfato deshidrogenasa asociada al FAD mitocondrial, o la hiperacumulación de glucógeno⁹⁷. Tras esa primera observación, se documentó, mediante estudios *in vivo*, que la secreción de insulina inducida por GLP-1 es mayor en presencia de SAD, tanto en la rata sana⁹⁸ como en la diabética tipo 2 (generada por tratamiento con estreptozotocina al nacer)⁹⁹; con el dimetil éster del ácido glutámico y el metilpiruvato, se obtuvieron de nuevo los mismos resultados¹⁰⁰⁻¹⁰². También, la α -D-glucosa pentaacetato (GPA), que no necesita el transportador de glucosa para acceder al interior de la célula β , potencia la respuesta secretora de ésta al GLP-1 en ambos tipos de rata, normal y diabética¹⁰³, y aumenta, además, la secreción de insulina inducida por una sulfonilurea (gliquidona) y por un análogo de la meglitinida (repaglinida)¹⁰⁴. En definitiva, los resultados hasta ahora indican que determinados nutrientes, capaces de sortear los defectos de la célula β diabética (responsables de su ceguera hacia la glucosa), pueden utilizarse para potenciar y/o prolongar la acción insulinotrópica de agentes antidiabéticos como el GLP-1.

Pero la utilización terapéutica del GLP-1 se ve entorpecida por su corta vida media en el torrente circulatorio, donde es degradado por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV); así, pierde sus dos residuos aminoácidos N-terminales, y se transforma en GLP-1(9-36)amida, producto al que no se atribuye, de momento, ningún efecto fisiológico¹⁰⁵. Como esto obliga a su administración en dosis parenterales muy frecuentes, se están llevando a cabo estudios experimentales y clínicos, desde distintas vertientes, encaminados a la resolución del problema. Una de ellas es la producción, y aplicación, de análogos de GLP-1 resistentes a la enzima; otra es la de utilización de agentes inhibidores de la actividad de ésta, que pueden administrarse por vía oral. Además, la atención también se centra en la Ex-4.

La mayor estabilidad *in vivo* de la Ex-4 respecto al GLP-1 (que puede atribuirse a la ausencia de puntos sensibles a la DPP-IV en su secuencia aminoterminal¹⁰⁶ y a su reducida susceptibilidad a degradación por endopeptidasa neutra 24.11¹⁰⁷) ilustra su carácter beneficioso, y también refiere la posibilidad de que este péptido pueda administrarse oralmente. De momento, la Ex-4 sintética, exenatide^{108,109}, que ya se utiliza en investigación clínica como hipoglucemiante¹¹⁰, y otros análogos del GLP-1 más resistentes a la DPP-IV (LY307161 y NN2211), muestran, en modelos animales de diabetes y en pacientes diabéticos tipo 2, efectos antidiabéticos muy prometedores^{109,110}.

En cualquier caso, el valor del papel potencial terapéutico del GLP-1 no sólo en la diabetes, sino también en la obesidad y en las enfermedades cardíacas y nerviosas, es un hecho que no se debe ignorar, cuyo mecanismo de acción concreto, no del todo conocido, requiere aclaración.

BIBLIOGRAFÍA

- Bell GI, Sánchez-Pescador R, Laybourn PJ, Najarian RC. Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene. *Nature*. 1983;304:368-71.
- 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;261:11880-9.
- Novak U, Wilks A, Buell G, McEwen S. Identical mRNA for preproglucagon in pancreas and gut. *Eur J Biochem*. 1987;164:553-8.
- Thim L, Moody AJ. Purification and chemical characterization of a glicentin-related pancreatic peptide (pro-glucagon fragment) from porcine pancreas. *Biochim Biophys Acta*. 1982;703:134-41.
- Yanaihara C, Matsumoto T, Hong YM, Yanaihara N. Isolation and characterization of glicentin C-terminal hexapeptide in porcine pancreas. *FEBS Lett*. 1985;189:50-6.
- 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;81:5007-11.
- Thim L, Moody AJ. The primary structure of porcine glicentin (proglucagon). *Regul Pept*. 1981;2:139-50.
- Bataille D, Coudray AM, Carlqvist M, Rosselin G, Mutt V. Isolation of glucagon-37 (bioactive enteroglucagon/oxintomodulin) from porcine jejunum-ileum. Isolation of the peptide. *FEBS Lett*. 1982;146:73-8.
- 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;119:1467-75.
- Kreymann B, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet*. 1987;2:1300-4.
- Holst JJ, Orskov C, Nielsen OV, Schwartz TW. Truncated glucagon-like peptide I, an insulin-releasing hormone from the distal gut. *FEBS Lett*. 1987;211:169-74.
- Kreymann 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;242:167-70.
- 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;264:12826-9.
- Seino S, Welsh M, Bell GJ, Chan SJ, Steiner DF. Mutation in the guinea-pig preproglucagon gene are restricted to a specific portion of the prohormone sequence. *FEBS Lett*. 1986;203:25-30.
- 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;138:159-66.
- 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;91:301-7.
- Creutzfeldt W. The entero-insular axis in type 2 diabetes—incretins as therapeutic agents. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001;109 Suppl 2:S288-303.
- Komatsu R, Matsuyama T, Namba M, Watanabe N, Itoh H, Kono N, et al. Glucagonostatic and insulinotropic action of glucagonlike peptide 1-(7-37)-amide. *Diabetes*. 1989;38:902-5.
- 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;22:154-7.
- Nathan DM, Schreiber E, Fogel H, Mojsov S, Habener JF. Insulinotropic action of glucagonlike peptide-I(7-37) in diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes Care*. 1992;15:270-6.
- 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.
- 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;36:741-4.
- 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;19:580-6.
- Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:3434-8.
- Fehmann HC, Habener JF. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells. *Endocrinology*. 1992;130:159-66.
- Brubaker PL, Drucker DJ. Minireview. Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. *Endocrinology*. 2004;145:2653-9.
- 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;34:703-8.
- O'Halloran DJ, Nikou GC, Kreymann B, Ghatei MA, Bloom SR. Glucagon-like peptide-1(7-36)NH₂: a physiological inhibitor of gastric acid secretion in man. *J Endocrinol*. 1990;126:169-73.
- 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;38:665-73.
- 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;81:327-32.
- 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;326:1316-22.
- Dupre J, Behme MT, Hramiak IM, McFarlane P, Williamson MP, Zabel P, et al. Glucagon-like peptide I reduces postprandial glycemic excursions in IDDM. *Diabetes*. 1995;44:626-30.
- Juntti-Berggren L, Pigon J, Karpe F, Hamsten A, Gutniak M, Vignati L, et al. The antidiabetogenic effect of GLP-1 is maintained during a 7-day treatment period and improves diabetic dyslipoproteinemia in NIDDM patients. *Diabetes Care*. 1996;19:1200-6.
- Nauck MA, Wollschlager D, Werner J, Holst JJ, Orskov C, Creutzfeldt W, et al. Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 (GLP-1 [7-36 amide]) in patients with NIDDM. *Diabetologia*. 1996;39:1546-53.

35. 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: 843-8.
36. 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;27:533-6.
37. 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;40:205-11.
38. 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; 24:1416-21.
39. 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;250:81-7.
40. D'Alessio DA, Kahn SE, Leusner CR, Ensink 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;93:2263-6.
41. D'Alessio DA, Prigeon RL, Ensink JW. Enteral enhancement of glucose disposition by both insulin-dependent and insulin-independent processes: a physiologic role of glucagon-like peptide 1. *Diabetes*. 1995;44:1433-7.
42. Valverde I, Morales M, Clemente F, López-Delgado MI, Delgado E, Perea A, et al. Glucagon-like peptide 1: a potent glycogenic hormone. *FEBS Lett*. 1994;349:313-6.
43. 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;37:1163-6.
44. Morales M, López-Delgado MI, Alcántara A, Luque MA, Clemente F, Márquez L, et al. Preserved effects upon glycogen synthase activity and glucose metabolism in isolated hepatocytes and skeletal muscle from diabetic rats. *Diabetes*. 1997;46:1264-9.
45. Luque MA, González N, Márquez L, Acitores A, Redondo A, Morales M, et al. GLP-1 and glucose metabolism in human myocytes. *J Endocrinol*. 2002;173:465-73.
46. Delgado E, Luque MA, Alcántara A, Trapote MA, Clemente F, Galera C, et al. Glucagon-like peptide-1 binding to rat skeletal muscle. *Peptides*. 1995;16:225-9.
47. Villanueva-Peñacarrillo ML, Delgado E, Trapote MA, Alcántara A, Clemente F, Luque MA, et al. Glucagon-like peptide-1 binding to rat hepatic membranes. *J Endocrinol*. 1995;146: 183-9.
48. Thorens B. Expression cloning of the pancreatic β cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:8641-5.
49. Stralfors P. Insulin second messengers. *Bioessays*. 1997;19: 327-35.
50. Trapote MA, Clemente F, Galera C, Morales M, Alcántara A, López-Delgado MI, et al. Inositolphosphoglycans implicated in the GLP-1(7-36)amide action in the liver. *J Endocrinol Invest*. 1996;19:114-8.
51. Galera C, Clemente F, Alcántara A, Trapote MA, Perea A, López-Delgado MI, et al. Inositolphosphoglycans and diacylglycerol are possible mediators in the glycogenic effect of GLP-1(7-36)amide in BC3H-1 myocytes. *Cell Biochem Funct*. 1996;14:43-8.
52. 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;16:51-6.
53. 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; 14:239-44.
54. Ruiz-Grande C, Alarcón C, Mérida E, Valverde I. Lipolytic action of glucagon-like peptides in isolated rat adipocytes. *Peptides*. 1992;13:13-6.
55. 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.
56. 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;33:73-7.
57. 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;132:75-9.
58. 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: 1654-7.
59. Villanueva-Peñacarrillo ML, Mérida E, Delgado E, Molina LM, Arrieta F, Rovira A, et al. 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;7:143-8.
60. Valverde I, Delgado E, Mérida E, Vicent D, Trapote MA, Alcántara AI, et al. GLP-1(7-36) amide binding in liver membranes from streptozotocin diabetic rats. *Diab Nutr Metab*. 1996;9:103-5.
61. 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;3:685-7.
62. 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;15:241-8.
63. Oben J, Morgan L, Fletcher J, Marks V. Effect of the enteropancreatic 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;130:267-72.
64. 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;135:2070-5.
65. Miki H, Namba M, Nishimura T, Mineo I, Matsumura T, Miyagawa J, et al. 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;1312:132-6.
66. Yang H, Egan JM, Wang Y, Moyes CD, Roth J, Montrose MH, et al. GLP-1 action in L6 myotubes is via a receptor different from the pancreatic GLP-1 receptor. *Amer J Physiol*. 1998;275:C675-83.
67. O'Harte FP, Gray AM, Abdel-Wahab YH, Platt PR. Effects of non-glycated and glycated glucagon-like peptide-1(7-36) amide on glucose metabolism in isolated mouse abdominal muscle. *Peptides*. 1997;18:1327-33.
68. Redondo A, Trigo V, Acitores A, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML. Cell signalling of the GLP-1 action in rat liver. *Mol Cell Endocrinol*. 2003;204:43-50.
69. Acitores A, González N, Sancho V, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML. Cell signalling of the glucagon like peptide-1 action in rat skeletal muscle. *J Endocrinol*. 2004;180:389-98.

70. González N, Acitores A, Sancho V, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML. Effect of GLP-1 on glucose transport and its cell signalling in human myocytes. *Regul Pept.* 2005;126: 203-11.
71. Sancho V, Trigo MV, González N, Valverde I, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML. Effects of GLP-1 and exendins on kinases activity, glucose transport, and lipid metabolism in adipocytes from normal and type-2 diabetic rats. *J Mol Endocrinol.* 2005;35:27-38.
72. Acitores A, González N, Sancho V, Arnés L, Valverde I, Malaisse WJ, et al. Participation of protein kinases in the stimulant action of GLP-1 upon 2-deoxy-D-glucose uptake by normal rat skeletal muscle. *Horm Metab Res.* 2005;37:275-80.
73. 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;49:221-5.
74. Sandhu H, Wiesenthal SR, MacDonald PE, McCall RH, Tchিপashvili V, Rashid S, et al. Glucagon-like peptide 1 increases insulin sensitivity in depancreatized dogs. *Diabetes.* 1999;48: 1045-53.
75. Mizuno A, Kuwajima M, Ishida K, Noma Y, Murakami T, Tateishi K, et al. Extrapankreatic action of truncated glucagon-like peptide-I in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats, an animal model for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* 1997;46:745-9.
76. Toft-Nielsen M, Madsbad S, Holst JJ. The effect of glucagon-like peptide I (GLP-I) on glucose elimination in healthy subjects depends on the pancreatic glucoregulatory hormones. *Diabetes.* 1996;45:552-6.
77. Orskov L, Holst JJ, Møller J, Orskov C, Møller N, Alberti KG, et al. GLP-1 does not acutely affect insulin sensitivity in healthy man. *Diabetologia.* 1996;39:1227-32.
78. 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: 413-22.
79. 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;83:2399-404.
80. 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: 473-8.
81. 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;49:611-7.
82. 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;48:134-7.
83. Vella A, Shah P, Basu R, Basu A, Camilleri M, Schwenk FW, et al. 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;50:565-72.
84. Egan JM, Meneilly GS, Habener JF, Elahi D. Glucagon-like peptide-1 augments insulin-mediated glucose uptake in the obese state. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:3768-73.
85. Dardevet D, Moore MC, Neal D, DiCostanzo CA, Snead W, Cherrington AD. Insulin-independent effects of GLP-1 on canine liver glucose metabolism: duration of infusion and involvement of hepatoportal region. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;287:E75-81.
86. Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CMB, Meeran K, et al. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature.* 1996;379:69-72.
87. Navarro M, Rodríguez de Fonseca F, Álvarez E, Chowen JA, Zueco JA, Gómez R, et al. 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;67:1982-91.
88. Flint A, Raben A, Astrup A, Holst JJ. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J Clin Invest.* 1998;101:515-20.
89. Naslund E, King N, Mansten S, Adner N, Holst JJ, Gutniak M, et al. Prandial subcutaneous injections of glucagon-like peptide-1 cause weight loss in obese human subjects. *Br J Nutr.* 2004;91:439-46.
90. Valverde I, Puente J, Martín-Duce A, Molina L, Lozano O, Sancho V, et al. Changes in glucagon-like peptide-1 (GLP-1) secretion after biliopancreatic diversion or vertical banded gastroplasty in obese subjects. *Obes Surg.* 2005;15:387-97.
91. Greig NH, Mattson MP, Perry T, Chan SL, Giordano T, Sambamurti K, et al. New therapeutic strategies and drug candidates for neurodegenerative diseases: p53 and TNF- α inhibitors, and GLP-1 receptor agonists. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1035:290-315.
92. Perry TA, Greig NH. A new Alzheimer's disease interventional strategy: GLP-1. *Curr Drug Targets.* 2004;5:565-71.
93. Cancelas J, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ. Synergistic insulinotropic effects of succinic acid dimethyl ester and exendin-4 in anaesthetized rats. *Int J Mol Med.* 2001;8:269-71.
94. Alcántara AI, Morales M, Delgado E, López-Delgado MI, Clemente F, Luque MA, et al. Exendin-4 agonist and exendin(9-39)amide antagonist of the GLP-1(7-36)amide effects in liver and muscle. *Arch Biochem Biophys.* 1997;341:1-7.
95. Nikolaidis LA, Mankad S, Sokos GG, Miske G, Shah A, Elahi D, et al. Effects of glucagon-like peptide-1 in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction after successful reperfusion. *Circulation.* 2004;109:962-5.
96. 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;24:349-50.
97. Malaisse WJ. Alteration of pancreatic B-cell D-glucose metabolism in type 2 diabetes: the G quintet. *Endocrinologia.* 1993;40:309-13.
98. 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 anaesthetized rats. *Horm Metab Res.* 2000;32:306-9.
99. 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;6:319-21.
100. 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;7:621-3.
101. 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;8:531-2.
102. 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;16:113-6.
103. 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;27:853-6.

104. García-Martínez JA, Ladrière L, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ. Insulinotropic action of α -D-glucose pentaacetate in vivo. *Diab Nutr Metab*. 1997;10:198-202.
105. Deacon CF. Therapeutic strategies based on glucagon-like peptide 1. *Diabetes*. 2004;53:2181-9.
106. Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)—Role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept*. 1999;85:9-24.
107. Hupe-Sodmann K, McGregor GP, Bridenbaugh R, Goke R, Goke B, Thole H, et al. Characterisation of the processing by human neutral endopeptidase 24.11 of GLP-1(7-36) amide and comparison of the substrate specificity of the enzyme for other glucagon-like peptides. *Regul Pept*. 1995;58:149-56.
108. Nielsen LL, Young AA, Parkes DG. Pharmacology of exenatide (synthetic exendin-4): a potential therapeutic for improved glycemic control of type 2 diabetes. *Regul Pept*. 2004;117:77-88.
109. Holz GG, Chepurny OG. Glucagon-like peptide-1 synthetic analogs: new therapeutic agents for use in the treatment of diabetes mellitus. *Curr Med Chem*. 2003;10:2471-83.
110. Degn KB, Juhl CB, Sturis J, Jakobsen G, Brock B, Chandramouli V, et al. One week's treatment with the long-acting glucagon-like peptide 1 derivative liraglutide (NN2211) markedly improves 24-h glycemia and alpha- and beta-cell function and reduces endogenous glucose release in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004;53:1187-94.