

Efecto de un extracto hipoglicemiante de la *Petiveria Alliacea* L. sobre la unión de la insulina a eritrocitos

Delia Rojo Domínguez, Luis Bell Heredia,* Elena Cancio Martínez* y Roberto Iglesias Lores.

Laboratorio de Productos Naturales, Instituto Superior de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón", Calle 146, No. 3102, esquina a 31, Cubanacán, Playa, *Hospital Clínico-Quirúrgico "Hermanos Ameijeiras", Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 18 de febrero de 1998. Aceptado: 25 de agosto de 1999.

Palabras clave: sheilina, insulina, extracto hipoglicemiante.
Key words: sheilina, insulin, hypoglycemic extract.

RESUMEN. Se estudio el efecto de un extracto hipoglicemiante de *Petiveria Alliacea* (sheilina) sobre la unión de la insulina a eritrocitos de donantes voluntarios sanos. Los eritrocitos ($1,8 \cdot 10^9$ células) se incubaron con 50 pg de monoyodoinsulina, concentraciones crecientes del ligando no marcado (0; 0,13; 1,38; 4,2; 12,6; 37,2; 111; 333 y 1 000 ng/mL) y 50 μ L de una disolución de *Petiveria Alliacea* de 1 UD/10 mL. * Para determinar si el extracto tenía efecto dosis-respuesta se incubaron los eritrocitos, la monoyodoinsulina y dosis crecientes del producto hipoglicemiante (0,005; 0,01; 0,1; 0,5; 1 y 5 UD/mL). En la curva de desplazamiento se obtuvo un corrimiento hacia la derecha de la ED-50, en presencia del extracto; para desplazar el 50 % de la monoyodoinsulina unida, fue necesario emplear más del doble de insulina fría. Se observó un incremento de la unión específica de la insulina a los sitios de unión de la superficie celular para todas las dosis exploradas del producto. Se encontró un comportamiento dosis-respuesta con tendencia a la saturación del sistema. Estos resultados sugieren que el efecto hipoglicemiante del extracto está ligado a la acción de la insulina y probablemente ejerza una acción reductora sobre la membrana del eritrocito que incrementa el número de sitios de unión a la insulina en la membrana celular.

ABSTRACT. The effect of a hypoglycemic extract of *Petiveria alliacea* (sheilina) on the binding of insulin to erythrocytes of healthy voluntary donors is studied. Erythrocytes ($1,8 \cdot 10^9$ cells) were incubated with 50 pg of monoyodoinsulin, growing concentrations of the non-marked ligand (0; 0,13; 1,38; 4,2; 12,6; 37,2; 111; 333 and 1 000 ng/mL) and 50 mL of a 1 UD/10 mL solution of *Petiveria alliacea* L. * To determine if the extract had a doses-response effect the erythrocytes, monoyodoinsulin and growing doses of the hypoglycemic product (0,005; 0,01; 0,5 and 5 UD/mL) were incubated. In the displacement curve there was a deviation to the right of the ED-50 in the presence of the extract. To displace 50 % of the bound monoyodoinsulin more than twice the amount of cold insulin was necessary. There was an increment of the specific binding of insulin to the binding sites of the cell surface for all the explored doses of product. A dose-response behavior with a tendency to system saturation was found. These results suggest that the hypoglycemic effect of the extract is linked to insulin action, and probably exerts a reducing action on the erythrocyte's membrane which increases the number of binding sites of insulin to the cell membrane.

INTRODUCCION

En 1985, Iglesias y col. obtuvieron un extracto acuoso de la *Petiveria Alliacea* L. al que denominaron sheilina,¹ que mostró tener un poderoso efecto hipoglicemiante en modelos experimentales.

Pruebas clínicas realizadas en diabéticos insulino-dependientes mostraron una disminución de la concentración de glicemia, asociada a un descenso y en algunos casos, supresión de los requerimientos de hormona exógena. Estos resultados sugieren un efecto de la sheilina sobre el metabolismo de la glucosa en los tejidos periféricos, en los que pudiera estar involucrada la insulina.

En el mecanismo de acción de ésta, como hormona de acción universal, se identifican varias etapas: 1) unión a su receptor específico; 2) desencadenamiento de un segundo mensajero; 3) internalización y 4) metabolismo y acción en las diferentes estructuras subcelulares.^{2,3} Cada una de estas etapas tiene sus leyes propias que regulan su funcionamiento.

Las características de la unión de la insulina a su receptor específico presente en varios tipos de tejido han sido descritas.⁴ Este primer paso en el mecanismo de acción de la hormona esta alterado en numerosas entidades que cursan con insulino-resistencia, tales como diabetes tipo I, diabetes tipo II, enfermedades

*1 UD de sheilina es la masa de ella diluida en 10 mL de agua, que absorbe a una densidad óptica de 0,1 a 210 nm.

cardiovasculares, obesidad, hipertensión arterial, hepatopatías, et al.⁵⁻⁷

Muchos son los factores que provocan un incremento de la unión de la insulina a sus receptores específicos y en su mayoría, este efecto tiene similar correlación con el transporte de glucosa.⁸⁻¹⁴ Los eritrocitos humanos presentan receptores para la insulina.¹⁵ Sus propiedades están estrechamente relacionadas con las de otros tipos celulares.¹⁶⁻¹⁸ Los eritrocitos son frecuentemente utilizados en estudios clínicos dirigidos a identificar defectos en el receptor de la insulina en múltiples condiciones patológicas.¹⁹⁻²⁰ Por todo esto y por sus características biológicas, (no internaliza el ligando después de la unión al receptor, tiene metabolismo anaeróbico y resulta de fácil acceso), se decidió que era el modelo ideal para estudiar el efecto de la sheilina sobre la unión de la insulina a su receptor.

El objetivo de este estudio ha sido contribuir al esclarecimiento del mecanismo de acción de la sheilina y su relación con la acción de la insulina, teniendo en cuenta que la introducción de este fármaco en el tratamiento de la Diabetes Mellitus sería de gran repercusión económica para el país.

MATERIALES Y METODOS

Eritrocitos

Los eritrocitos se obtuvieron a partir de donantes voluntarios sanos, de ambos sexos, que no tuvieran antecedentes de Diabetes Mellitus.

Hormona

Se empleó insulina porcina purificada [80 UD; 3,2 ng/mL; Actrapid MC, (Copenhagen, Dinamarca)]. Se utilizó para marcaje del trazador y para el ligando no marcado.

I¹²⁵

Yoduro de sodio en disolución de NaOH (Amersham, UK).

Sheilina

Extracto de *Petiveria Alliacea* L.²¹

Monoyodo-insulina

Se realizó el marcaje según la técnica de la cloramina T, descrito por Roth y modificada por Nieto y Paskus.²²

Obtención de eritrocitos

Los eritrocitos se obtuvieron según la técnica de Boyum descrita por Gambhir et al.²³ Se recogieron 10 mL de sangre en tubos previamente

heparinizados [heparina 500 UI/mL, Imefa, Cuba] y se centrifugaron a 400 g durante 10 min a 10 °C. El plasma se decantó. El precipitado celular se resuspendió en disolución salina hasta completar volumen. Luego, se adicionaron lentamente 6 mL de esta mezcla, 3 mL de Ficoll-Hypaque (densidad 1,077 g/mL, Pharmacia, Uppsala, Sweden), NaCl al 0,9 % (Imefa, Cuba). Se centrifugó a 400 g durante 30 min a 10 °C. Todas las fases por encima de los eritrocitos fueron aspiradas. El precipitado se resuspendió en disolución salina (v/v) y se centrifugó en iguales condiciones. Finalmente, el precipitado de eritrocitos se resuspendió en el volumen necesario de regulador G (amortiguador G: Hepes 50 mmol/L, MgCl₂ 10 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, CaCl₂ 10 mmol/L, dextrosa 10 mmol/L, NaCl 50 mmol/L, KCl 5 mmol/L, BSA 1 %, pH = 8,0 y osmolaridad igual a 286 mmol/L) para una concentración de 4,5 · 10⁹ células/mL. El conteo celular se realizó en un contador modelo Sysmex F-800. La viabilidad celular fue superior a un 98 %, determinada por la técnica del Tripan Blue.

Estudio de la unión de la sheilina

Curva de desplazamiento de la monoyodoinsulina. Efecto sheilina

Se determinó según la técnica de Gambhir¹⁹⁻²⁰ mediante la incubación de 400 µL de la suspensión celular, con 50 µg de monoyodoinsulina en 50 µL de amortiguador G (0; 0,13; 1,38; 4,2; 12,6; 37,2; 111,0; 333,0; 1000 ng/mL) para un volumen total de 500 µL. El máximo desplazamiento (porcentaje de unión inespecífica se determinó incubando la suspensión celular con 100 µg (50 µL) de la insulina porcina fría. Se realizaron en paralelo curvas con y sin sheilina (50 µL de la dilución de 1 UD/10 mL).

Después de incubar a 12 °C durante 3,5 h, la mezcla de reacción se centrifugó a 400 g durante 10 min.

El precipitado resultante se lavó dos veces con disolución amortiguadora G. La radiactividad unida al precipitado se estimó en un contador gamma (LKB, Suecia).

Ensayos de unión total. Efecto sheilina

Los ensayos de unión de la insulina a eritrocitos se realizaron en ausencia y presencia de diluciones dobles seriadas de sheilina (0,005; 0,01; 0,1; 0,5; 1 y 5 UD de sheilina/mL). Cada dosis de sheilina se incubó con 400 µL de la suspensión celular de 50 µg de monoyodoinsulina en 50 µL de disolución amortiguadora

G. Se utilizaron como controles la unión total (Bo) en ausencia de sheilina y la unión no específica en ausencia y presencia de ella.

La radiactividad unida a las células se determinó según las formulas:

$$Unión = \frac{UT - UNE}{RT} \cdot 100 (\%)$$

$$Estándar = \frac{Estándar - UNE}{UT - UNE} \cdot 100$$

donde:

UT unión total.

UNE unión no específica.

RT radiactividad total.

RESULTADOS

Efecto dosis creciente de la sheilina en la unión

Se observó que cantidades crecientes de sheilina provocan un incremento en el porcentaje de unión específica de la insulina a los sitios de unión de la superficie celular, con tendencia a la saturación (Fig. 1). En la figura 2 se observa mejor el comportamiento dosis-respuesta, dependiente de este efecto.

Efecto de la sheilina en la curva de desplazamiento

En las curvas de desplazamiento para la insulina y para la mezcla insulina-sheilina, se demostró un incremento en la respuesta de esta última (Fig. 3).

Para un 50 % de desplazamiento (ED-50), se observa que la curva insulina-sheilina, necesita mayor cantidad de insulina no marcada para lograr el mismo efecto que la curva de insulina, lo que sugiere una acción sinérgica entre estos compuestos.

DISCUSION

Los resultados indican que la acción de la sheilina está vinculada a la acción de la insulina; su efecto parece potenciar la acción de la hormona favoreciendo su unión a los sitios específicos de la membrana celular.

Probablemente, este producto ejerce una acción importante sobre la membrana del eritrocito, en alguno de sus componentes variables (el potencial redox y la fluidez) que provocan un incremento de los sitios de unión específica para la insulina. Se conoce que modificaciones de estas variables tienen efecto significativo en la afinidad del receptor por su ligando. Parece ser, que bajo esta acción, ocurre un cambio conformacional en el dominio de unión del receptor que provoca que se expongan

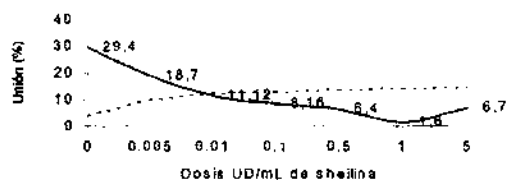


Fig. 1. Porcentaje de unión de insulina para concentraciones crecientes de sheilina. Cada valor representa la media de cinco experimentos.

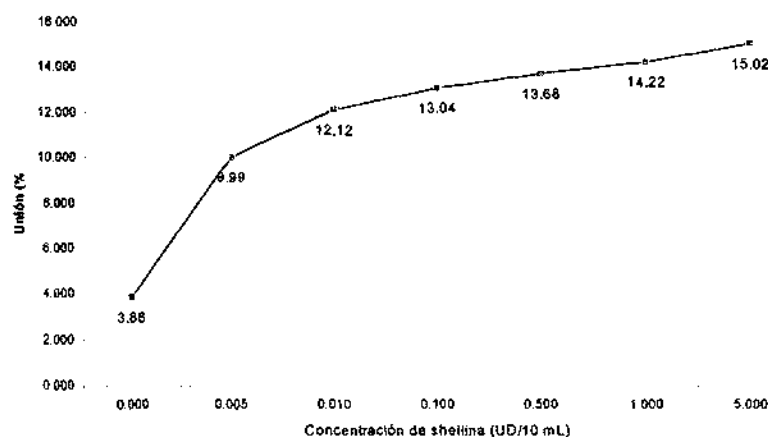


Fig. 2. Efecto dosis-respuesta de la sheilina. Cada valor representa la media de cinco experimentos.

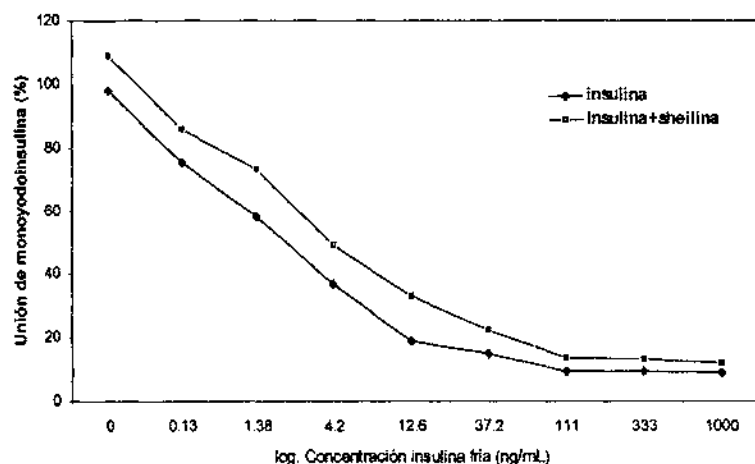


Fig. 3. Efecto de la sheilina sobre la curva de desplazamiento.

mejor, facilitando así, su interacción con el ligando. En el laboratorio de los autores se observó que en preparados de sheilina efectivamente, existe un efecto reductor considerable.

Otra hipótesis para explicar la acción hipoglicémica de la sheilina, es que estereoquímicamente coincide con el dominio de unión del receptor de membrana lo que desencadenaría sus funciones. Esta posible acción del producto se apoya además, en los resultados de un experimento realizado en el laboratorio de los autores con un perro beagle pancreatocotomizado, que logró vivir

15 d, con glicemia normal, bajo un tratamiento con sheilina, sin utilizar insulina exógena. Bajo esta hipótesis, la sheilina, competiría con la insulina por los sitios de unión específicos de la membrana celular. Este estudio demostró que la sheilina no actúa como un competidor de la insulina por los sitios de unión; en caso de ser así, la unión específica de la insulina habría disminuido y se encontró que la sheilina incrementó la unión específica de ella significativamente. El efecto dosis-respuesta demostrado es completamente opuesto a su acción como un competidor. De cualquier modo, no se

puede descontar la posibilidad de que este producto se una directamente al receptor de la insulina (sin competir con ella) y que induzca cambios conformacionales que provoquen el incremento de la unión. El efecto dosis-respuesta con tendencia a la saturación del sistema implica una acción sobre un sistema saturable, que debe ser el receptor de la insulina.

CONCLUSIONES

La sheilina aumenta la unión específica de la insulina a los sitios de unión de la superficie del eritrocito, el cual tiene un comportamiento dosis-efecto con tendencia a la saturación del sistema.

BIBLIOGRAFIA

1. Iglesias R. Cires M. *Petiveria Alliaceae* (anamú). Study of the hypoglycemic effect., *Rev. Rumana Med. Int.*, 28, 347, 1990.
2. Goldfine I., et al. The Insulin receptor: Molecular Biology and Transmembrane signaling. *Endocrine Reviews*, 8, 54, 1987.
3. Sawka-Verhelle D., et al. Insulin receptor substrate -2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine-binding domain and through a newly identified domain and through a newly identified domain comprising aminoacids, *J. Biol. Chem.*, 271, 5980, 1996.
4. Gorden P., et al. Insulin action at the cellular level: Anatomical considerations., *Diabetes-Metabolism Rev.*, 1 y 2, 99, 1985.
5. Roman O., et al. Blood Insuline in fasting conditions as a simple marker of insulin resistance in hypertensive patients., *Rev. Med. Chil.*, 123, 23, 1995.
6. Santos R.F., et al. Changes in insulin receptor tyrosine kinase activity associated with metformin treatment of type 2 diabetes., *Diabetes. Metabol.*, 21, 274, 1995.
7. Gumbiner B., et al. Differential effects of acute hypertriglyceridemia on insulin action and insulin receptor autophosphorylation., *Am. J. Physiol.*, 270, 429, 1996.
8. Mortensen E.R., et al. Guanosine nucleotides regulate hormone binding of insulin receptors., *Biochem. J.*, 3, 735, 1992.
9. Robic B., et al. The effect of guanidine substances from uremic plasma on insulin binding to erythrocyte receptors in uremia., *Horm.-Metab.-Res.*, 34, 848, 1991.
10. Erikson J., et al. Insuline can rapidly increase cell surface insulin binding capacity in rat adipocytes. A novel mechanism related to Insulin sensitivity., *Diabetes*, 41, 707, 1992.
11. Di Paolo S. Metformin ameliorates extreme insulin resistance in a patient with anti-insulin receptor antibodies: description of insulin receptor and post-receptor effects in vivo

- and *in vitro*. *Acta-Endocrinol.-(Copenh.)*, 126, 117, 1992.
12. Hunkett B., et al. Increase affinity of insulin for its receptor following conjugation to a second protein. *Med-Hypotheses*, 36, 135, 1991.
 13. Jorgen Glieman, et al. Biological Potency and Binding affinity of monoyodoinsulin with iodine in tyrosine Ary or tyrosine a 19., *Biochemical and Biophysical Research Commun.*, 87, 1183, 1979.
 14. Sacks O.B., et al. The Activity of Calmodulin is altered by phosphorylation: modulation of calmodulin function by the site of phosphate incorporation., *Biochem. J.*, 312, 197, 1995.
 15. Kobayashi M., et al. Methods of Insulin binding studies in erythrocytes., *Nippon Rinsho, Suppl.*, 48, 54, 1990.
 16. Robinson T.J., et al. Erythrocytes: A new cell type for the evaluation of insulin receptor defects in diabetes humans. *Science*, 205, 200, 1979.
 17. Grigoresca F., et al. Insulin binding and insulin-dependent phosphorylation of insulin receptor solubilized from human erythrocytes., *J. Biol. Chem.*, 258, 13708, 1983.
 18. Grigoresca F., et al. Defect in Insulin receptor phosphorylation in erythrocytes and fibroblast associated with severe insulin resistance. *J. Biol. Chem.*, 259, 15003, 1984.
 19. Desoye G., et al. Insulin binding to erythrocytes of non-pregnant women: reevaluation, underlining the importance of body weight event in nonobese subjects. *Clinica Chimica Acta*, 207, 57, 1992.
 20. Poodge C., et al. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and insulin binding to erythrocytes of normal prepubertal children and adults. *Horm.-Metab.-Res.*, 23, 545, 1991.
 21. Igesias R Patente No. 213 de 1990. Producto con actividad hipoglucemiante. Método de Obtención. Oficina Nacional de Innovaciones Información Técnica y Marcas, Cuba.
 22. Roth. Método Modificado por Nieto y Paskus. *Acta de Bioquímica Latinoamericana*. XIX, 15, 1986.
 23. Boyun A., et al. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. *Scan. J. Clin. Invest.*, 21, 79, 1986.

¿BUSCA PUBLICIDAD?



La Revista CENIC Ciencias Biológicas le puede ayudar eficazmente a difundir su mensaje, así como a viabilizar sus contactos y propiciar intercambios y relaciones futuras con la comunidad científica nacional e internacional y sus instituciones respectivas.

Aproveche esta oportunidad que a módicos precios le ofrece para que su mensaje viaje y llegue con ella, a su círculo especializado de lectores.

TARIFAS (USD)

\$200	\$100	\$70	\$120	\$50	\$150	\$300	\$350
P	1/2P	1/3P	2/3P	1/4P	3/4P	2P	2P CENTRALES
	\$850				\$500		
	CONTRACUBIERTA (cuatricomía)				REVERSO DE CUBIERTA O DE CONTRACUBIERTA (cuatricomía)		

La contratación por un año (tres números) de este servicio, le proporciona como beneficio adicional, un descuento del 15 %.

Dirija su solicitud a:

Editorial CENIC
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6990, Ciudad de La Habana, Cuba.