El mecanismo de acción de la insulina.

MARIETTA TUENA*

LA INSULINA, una de las hormonas más ampliamente estudiadas y conocidas, constituye el factor fundamental en numerosos e importantes procesos metabólicos de los organismos vivos, y de trascendencia médica evidente.

Producida en las células *beta* de los islotes de Langerhans, se almacena ahí en forma de gránulos insolubles, para luego ser secretada; asimismo, presenta modificaciones inducidas por la edad y por las condiciones patológicas del sujeto, dando características histológicas de las que puede ser inferido su estado fisiológico.

El mecanismo mediante el cual se desencadena la secreción de insulina, a pesar de las numerosas pruebas experimentales, aún no está bien dilucidado; la perfusión de páncreas aislado con sangre rica en glucosa, o la introducción de soluciones glucosadas dentro de la arteria pancreática, produce efectos que van acordes con la hipótesis que explica como causante de la secreción insulínica, la cantidad de glucosa que atraviesa el páncreas.

Su metabolismo permanece aún obscuro en muchos puntos. La hipótesis de Stteten, que postula que los efectos atribuibles a la hormona pueden ser producidos por sus productos de transformación, no conocidos hasta la fecha, y que estos constituyan los verdaderos compuestos activos no está demostrado, ya que hasta ahora solo existen pruebas indirectas de su existencia en la sangre y de su degradación en algunos tejidos como el hígado y el riñón.

Sus constituyentes químicos forman un núcleo complejo, de 2 cadenas de polipéptidos, conteniendo de 21 á 30 aminoácidos cada uno unidos por puentes de disulfuro; algunos de los aminoácidos más importantes de su constitución son; la cistina, la glicina, la asparagina, la

* Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de México.

alanina y la fenil-alanina. Mediante la técnica de sulfatación y de acetilación se ha tratado de encontrar su núcleo activo¹ observándose que los aminoácidos histidina y tirosina, inactivados, no producen disminución de la acción insulínica, y éste fenómeno sí se observa si se sulfatan todos los grupos. Insulina marcada con Tritio, parece indicar que tiende a unirse a los aminoácidos aromáticos².

La diversidad de acciones fisiológicas, que le han sido atribuidas, pueden ser condensadas en las palabras de Best que hablan claramente de las dificultades inherentes a la metodología requerida para probar su acción; aún no se ha encontrado un sistema sensible y reproducible con un mínimo de error, capaz de detectar las pequeñísimas cantidades existentes en la sangre o en los tejidos y cuyo rango cuantitativo sea de ese mismo orden. La separación de la insulina de otras proteínas contaminantes, resulta en extremo difícil; para la resolución de este problema se ha recurrido a numerosas y complicadas técnicas, cromatografía en papel y columna, electroforesis, ultracentrifugación, sin ningún resultado seguro, ni la hormona como tal, ni ninguno de sus llamados "inhibidores" ha podido ser aislado de la sangre, el plasma o los tejidos. Parece ser necesario modificar los métodos existentes o probar otros nuevos.

Para probar su acción fisiológica, se han utilizado sistemas *in vivo* y sistemas *in vivo*, éstos últimos han dado buenos resultados, por ejemplo, se ha probado inocular suero de animales inyectados con insulina a animales normales, sin obtener acción hipoglicémica; para aumentar la sensibilidad de los animales, se probó en animales adrenalectomizados e hipófisisprivos (Sellon, Feldman y Allen) haciéndose significativo el efecto hipogliceminante; Anderson usó ratas con diabetes aloxánica e hipófisisprivas, que son sensibles a dosis muy bajas de insulina, del orden de 0.125 mU. por 200 g. de rata. Thorn, con animales de iguales condiciones que los de Anderson, pasó glucosa a través de estómago por una sonda, e inyectó insulina intraperitoneal, obteniendo una curva de dosis respuesta bastante demostrativa, también con dosis bajas, ya casi cercanas a la dosis fisiológica. Börnstein trabajando con ratas aloxánicas e hipófisoadrenalectomizadas, determinó la curva postprandial de glucosa sanguínea, encontrando que es irregular durante la primera hora, permanece con poca variación durante la segunda y descende en la tercera. Después de la primera hora inyecta insulina intraperitoneal a la dosis de 0.05 á 0.08 mU por 200gs. de rata, baja significativamente la glucemia y el plasma citratado de sujetos normales inyectado a animales en esas condiciones produce una curva semejante³.

Los trabajos *in vitro*, han tenido uno de sus mejores representantes en Stadie⁴ hechos en diafragma aislado de rata, midiendo en este sistema consumo de glucosa, producción de CO₂ y síntesis de glucógeno; otros tejidos en los que se ha probado la acción insulínica son, la grasa del epidídimo de rata, que es sensible a dosis bajas de insulina, diafragma entero de ratón, que da resultados con poca variabilidad, y últimamente se ha probado en médula de rata⁵. En general, la insulina produce un aumento del consumo de glucosa, de la síntesis de glucógeno, pero no del consumo de oxígeno. Los experimentos de Stadie^{6, 7} consistieron en sumergir en una solución conteniendo insulina marcada con I¹³¹, el diafragma aislado de rata, posteriormente lavarlo en buffer e incubarlo en glucosa, sin insulina, por este medio ha sido la única ocasión, en el metabolismo de las hormonas, que puede expresarse la acción de una hormona en términos cuantitativos de síntesis de glucógeno.

La actividad insulínica del plasma, desaparece si éste es previamente tratado con cisteína y glutatión, aminoácidos conocidos como inactivadores de la insulina, esto es sugestivo de que en el plasma exista la insulina, pero no excluye la posibilidad de la existencia de otras sustancias que interfieran o coadyuven la acción. Randle y Young⁸ han estudiado las interrelaciones entre la insulina y los factores hipofisarios antiinsulínicos, así como el antagonismo de las hormonas de la corteza suprarrenal; además se ha aislado recientemente de la hormona del crecimiento un principio de actividad insulínica⁹, que tiene una acción hipoglucemiente energética y de larga duración a dosis de microgramos. Se han aislado del suero sustancias inhibitoras de la insulina, dos de ellas aisladas de sujetos diabéticos en acidosis (Stteten) o en diabéticos no controlados; otra muy importante aislada de sujetos normales, relacionada químicamente con las albúminas plasmáticas, las primeras pertenecen a las alfa₁ globulinas. La sustancia relacionada con las albúminas desaparece con la hipofisectomía, y parece identificarse con el principio antiinsulínico de la hipófisis, conteniendo en la hormona del crecimiento, y ya descrito con anterioridad, está presente en gatos depancreatectomizados, desaparece al quitar las suprarrenales, y reaparece al administrar cortisona. Lo único seguro al respecto es que existen sustancias inhibitoras de la insulina, aisladas del suero, relacionada con las alfa globulinas y las albúminas, Campbell ha designado a los inhibidores relacionados con las alfa globulinas, como fracción libre de la insulina

y a las relacionadas con las beta y gama globulinas como fracción "unida" de la insulina.

Con respecto al mecanismo de acción propiamente dicho, este ha sido abordado con un criterio diferente y fundamental, y se ha tratado de estudiar los cambios a nivel celular, desde un punto de vista bioquímico.

Hasta antes del año de 1953,¹⁰ el concepto más ampliamente aceptado era la influencia de la insulina en la formación de la glucosa 6 fosfato, o sea, la acción sobre la hexoquinasa, esta acción sería fundamental en la conversión de glucosa en glucógeno, a CO₂ y agua y en su transformación a grasas y proteínas; en 1954 Stadie demostró la influencia de la insulina en la síntesis de ATP; y Chain demostró su acción sobre el sistema TPN y TPNH; Larner y Palú¹¹ estudiaron la acción de la insulina sobre el UDPG del músculo y encontraron aumentada la UDPG glucógeno transglucosidasa. McLean¹² trabajando en tejido graso de glándula mamaria de rata, observa un aumento en la síntesis de ácidos grasos, por acción de la insulina, más claro en la mama en lactancia; esto trae como consecuencia una mayor utilización de la glucosa por el ciclo de las pentosas, en el que se requiere la utilización del TPNH. Levine, Goldstein y Stadie, estudiaron la influencia de la insulina sobre la permeabilidad de la membrana celular, en azúcares no metabolizables, en animales nefrectomizados y eviscerados; de lo que se ha concluido: que la entrada de glucosa, galactosa y algunos azúcares no metabolizables, como arabinosa y xilosa L y D, no es un proceso ilimitado y libre, sino que existe una barrera celular activa, que limita y selecciona esa penetración, y que posiblemente la insulina actúe transformando los demás azúcares en glucosa, necesaria para el metabolismo celular, y que el mecanismo de transporte de azúcares no es un proceso enzimático, porque el transporte de la galactosa fue aumentada por la insulina en un sistema en el que no existía ninguna enzima que actuara sobre la galactosa. Además Ogston¹³ observó que la insulina aumenta la penetración de los azúcares con constitución estereoquímica semejante a la D glucosa, pero que no tiene efecto en la penetración de los azúcares de constitución estereoquímica diferente; los carbonos 1, 2 y 3 parecen ser los 3 puntos de contacto en los que reside el centro activo. Posteriormente Sacks¹⁴ hizo estudios para probar la penetración de éstos azúcares en diferentes tejidos, intestino, pulmón, bazo y piel, no permiten el paso de ningún azúcar no metabolizable, a pesar de la similitud estereoquímica, esto no se modifica en presencia de la insulina; en el

corazón y el cerebro sí penetran azúcares no metabolizables y esta penetración es aumentada en presencia de insulina, esto habla de un proceso activo, el hígado permite el paso de todos los azúcares probados, sin distinción en la configuración estérica y sin influencia de la insulina, esto parece indicar un proceso pasivo.

Todo lleva a pensar que el mecanismo de transporte depende casi exclusivamente de fenómenos de permeabilidad de la membrana, determinados por la insulina, e independientes de la hexoquinasa. Sin embargo esto se refiere a la acción en un sitio, pero está lejos de comprender la acción en todos los sitios.

Los efectos anti insulina de la hormona del crecimiento y de las hormonas de la corteza suprarrenal, sobre la utilización de la glucosa en el diafragma aislado de rata, está aparentemente mediado por el factor lipoprotéico de Bornstein, pero Goldestein demostró, que el sitio de la influencia de las hormonas adrenocorticales e hipofisiarias, sobre la utilización de la glucosa, se ejerce a nivel de la glucoquinasa, pero que la insulina no actúa a ese nivel. La seguridad de estos conceptos está aún en duda.

Doell¹⁵, probó el efecto de la insulina sobre la incorporación de aminoácidos en los microsomas de hígado; los resultados parecen sugerir la existencia de un factor en el sobrenadante, que influido por la insulina, mantenga la integridad de los microsomas, y en éstos, factores determinantes de la incorporación de aminoácidos en los cuales parece haber acción insulínica. Wool y Kral, probaron con otras técnicas, que la acción de la insulina es independiente del transporte de aminoácidos a través de la pared celular. La influencia insulínica sobre el metabolismo protéico, están aún en sus comienzos, pero se tiene ahora resultados prometedores y un enorme campo de investigación abierto para abordar este interesante problema.

Randle y Smith¹⁶, probaron la influencia de la anaerobiosis, y de los venenos celulares, malonatos y fluoruros; que alteran la fosforilación oxidativa y que durante este proceso se produciera una sustancia hipotética, sobre la cual actuaría la insulina, permitiendo la entrada de glucosa a través de la pared muscular. Wick, estudió el efecto de la insulina en el consumo de la 6 fluoruro deoxi-glucosa, azúcar de configuración estérica semejante a la glucosa, pero que no es capaz de ser fosforilada por la hexoquinasa, no se observa ninguna penetración, ni aún en presencia de insulina, esta es una prueba sugestiva de que en el proceso de transporte pueden estar involucrados procesos enzimáticos, además del

proceso químico postulado por Stadie y del ya estudiado sobre la permeabilidad celular. Barnett y Ball, estudiando, bajo el microscopio electrónico el efecto de la insulina sobre la célula, han observado que estimula la pinocitosis, y que ésto redundaría en esa alteración de la permeabilidad de la membrana celular.

Bhattacharya¹⁷, estudió el efecto de la insulina sobre el metabolismo iónico y el consumo de glucosa; aumenta la relación Na:K y produce una marcada disminución de los grupos sulfhidrilo, Aikawa¹⁸, probó la influencia de la insulina sobre el metabolismo del Mg, éste aumenta en el corazón y el músculo esquelético en animales tratados.

La regulación de la insulina sobre el metabolismo de la célula hepática, está en controversia; algunos autores han postulado un proceso pasivo, y sin embargo se observa un efecto marcado de la insulina sobre las enzimas del metabolismo del glucógeno. Dunn, Altzuler y de Bodo^{19, 20} en trabajos realizados con glucosa marcada, encuentran que la insulina aumenta la utilización de la glucosa por la célula, pero que el nivel de glucógeno permanece a un nivel constante.

Hetcher²¹ piensa que la utilización de la glucosa por la célula es el resultado de una multiplicidad de pasos, y que los que han sido estudiados hasta la fecha, en los que hay un efecto indudable de la insulina, no son los únicos en el complejo mecanismo de transporte a través de la pared celular.

La membrana celular constituye la barrera estructural para la difusión de la glucosa y el sitio natural del mecanismo de transporte, como lo ha demostrado claramente Stadie, sin embargo nuestro conocimiento sobre membrana celular, se reduce a los estudios hechos en el eritrocito, sobre penetración de azúcares, en el cual no actúa la insulina hechos por Soskin y Levine en 1952, no es posible identificar el componente proteína-lípido-proteína de la membrana del eritrocito, con la estructura de la membrana de otras células, a pesar de esto, es posible postular que la membrana está constituida por una proteína, y que esta se combina con la insulina de la manera como lo hacen el antígeno con el anticuerpo o la actina con la miosina, esta unión podría provocar un acortamiento de pequeñas áreas de la membrana, que abran "poros", a través de los cuales se deslicen los azúcares. Se ha calculado el número de moléculas de insulina "unida" por gramo de músculo y el número de moléculas por micrón cuadrado de superficie de la membrana, superficie total de la membrana. La especificidad de la penetración no puede ser explicada por un mecanismo de tamaño molecular, o de carga,

sino que conduce necesariamente a pensar en un mecanismo enzimático.

Por todo lo anteriormente expuesto, queda claro que la insulina ejerce su acción sobre un complejo sistema de reacciones, y que debe considerarse su acción sobre la glucosa uno de los pasos, pero que considerada a otros niveles de integración, deberán existir otros componentes e interacciones.

Otros autores tratan de explicar la especificidad del transporte de los azúcares, planteando la posibilidad de la formación de un complejo azúcar-proteína de la membrana, que "encierre", en un sentido figurado al carbohidrato en la membrana (Rosenberg, Lefebvre, Davis), la insulina puede controlar la penetración o ser el vehículo en el que viaje el azúcar; se postula la existencia de una enzima, que sea capaz de romper la unión insulina-azúcar, y de existir, debiera estar en cantidades tales que no constituya en ningún momento un factor limitante para la utilización de la glucosa por la célula.

Como posteriormente había sido mencionado, hay tejidos que no utilizan insulina para el transporte de la glucosa, eritrocito, cerebro, tracto gastrointestinal e hígado, otros como músculo esquelético en el que se observa un efecto directo aditivo al efecto de la contracción postulándose un doble mecanismo de utilización de la glucosa, uno dependiente de la insulina y otro no. En el caso del cerebro, se ha pensado en la existencia de procesos intrínsecos del metabolismo cerebral que sintetizan insulina o compuestos con una función equivalente, en cantidad suficiente para saturar el mecanismo de transporte de glucosa. Es indudable que el mecanismo de acción de la insulina está esclarecido en una gran parte, sin embargo persisten aún por resolver algunos problemas fundamentales. En el músculo en contracción, debe liberarse un factor "humoral", cuyo aislamiento esclarecerá la naturaleza íntima del mecanismo de transporte sobre el cual la insulina actúa. La prueba de su existencia puede resolver al problema de la curación de la diabetes hasta ahora sin solución.

El hecho de que la insulina se combine con las células del órgano "blanco" abre un enorme camino a la investigación que sin duda llevará a la clara y certera elucidación de estos problemas.

REFERENCIAS

1. L. A. Slyterman et al.: *Bioch. et Bioph. Acta*; 38; 88, 1960.
2. C. Von Holt; I. Voelkel.: *Bioch. et Bioph. Acta*; 38; 1, 88, 1960.
3. Owen W., Wright P.: *Physiol Rev.* 40: 2, 219, 1960.

4. Stadie W., Zapp's.: J. Biol. Chem. 170: 55, 1947.
5. Rafaelsen,: Lancet II, 941, 1958.
6. Stadie, W.: Physiol. Rev. 34, 52, 1954.
7. Hormonal Reg. of Energy Metab. Ed. Charles C. Thomas. 163, 1957.
8. Randle y Young. J. Endocrin. 13: 335, 1956.
9. Ottaway.: Proc. Bioch. Soc. Bioch. J. 72, 2, 23, 1960.
10. Stadie et al.: Am. J. Med. Soc. 218, 265, 1949.
11. Larner J., Vilar P.: Bioch. Biophys. Acta, 39, 1: 171, 1960.
12. McLean Nature, 183: 182, 1959.
13. Ogston: Nature, 162: 963, 1948.
14. Saks, J. J.: Gen. Phys. 43, 5 pte. II; 199, 1960.
15. Doell, R. G.: Bioch. Biophys. Acta, 39: 2, 237, 1960.
16. Randle, Smith.: Bioch. J., 70: 501, 1958.
17. Bhattacharya, Nature, 183: 49, 1959.
18. Aikawa., J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 103: 2, 1960.
19. Dunn., Altszuler R., de Bodo, Nature 183: 1123, 1959.
20. De Bodo, et al.: Metab. Clin. Exp. 8, 520, 1959.
21. Vitamins and Hormones, vol. XII, 1955. Academic Press.
22. Shomaker. Metab. 8, 4984, 1959.
23. Goldstein.: Am. J. Physiol. 179: 209, 1953.
24. Levine.: Am. J. Physiol. 163: 70, 1950.