

EFEECTO COMBINADO DE INSULINA E INHIBIDOR-ALFA₂Combined effects of insulin and alpha₂-inhibitor.

LUIS VARGAS y MARCELO CHARLÍN

*Departamento de Fisiopatología, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica
Santiago, Chile.*

Recibido para su publicación el 25 de Febrero de 1965

RESUMEN

Se estudia el posible antagonismo entre inhibidor- α_2 e insulina mediante la determinación de la captación de glucosa del diafragma aislado de la rata blanca.

Se emplean las dosis activas para cada uno de los principios, adicionándose insulina bovina tanto al plasma total, antes de preparar la globulina- α_2 , como simultáneamente en el momento de disolver las fracciones para ser incorporadas al medio de cultivo del diafragma. En ninguna de estas condiciones se logró demostrar la existencia de una neutralización del efecto de la insulina. La insulina de origen humano tampoco demostró ser antagonizada por la globulina- α_2 humana.

La inmersión del diafragma en solución de Gey más globulina- α_2 seguida de adición de insulina e incubación (técnica de Stadie), tampoco mostró antagonismo entre insulina e inhibidor.

Se concluye que el inhibidor- α_2 , si bien tiene una acción opuesta a la de la insulina, no es un antagonista de la insulina, justificándose su designación de inhibidor de la captación de glucosa.

INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que la globulina- α_2 de sujetos humanos normales ocasiona una disminución de la captación de glucosa por tejidos y órganos aislados de la rata, tales como diafragma (1,2), grasa epididimaria (3) y testículo (4). Se ha denominado "inhibidor- α_2 " a la sustancia responsable de esta disminución. Como la acción del inhibidor en esta prueba es opuesta a la que caracteriza a la insulina, era de interés conocer si esta sustancia ejerce una acción antagonista a la de la insulina in vitro. Con el objeto de estudiar este posible antagonismo se planearon los siguientes experimentos en que se midió la captación de la glucosa en la preparación del hemi-diafragma aislado de la rata: 1) estudio de la distribución de la insulina, agregada in vitro

al plasma humano entre las diferentes fracciones proteicas preparadas por el método de Cohn-Lever (5); 2) adición simultánea de insulina y de globulina- α_2 en diferentes dosis, al medio de incubación del diafragma aislado; y 3) mantención del diafragma aislado en presencia de globulina- α_2 durante un tiempo antes de agregar la insulina e iniciar la incubación (técnica de Stadie).

Se esperaba que los experimentos del grupo 1 darían información acerca de la distribución de la insulina exógena en los distintos componentes proteicos del plasma y sobre el posible antagonismo entre la insulina exógena y la fracción IV-V-VI que contiene el inhibidor- α_2 . El objeto de los experimentos del grupo 2 consistía en estudiar el eventual antagonismo in vitro entre el inhibidor y la insulina y en caso positivo obtener alguna idea sobre las características de este antagonismo. Finalmente los experimentos del grupo 3 estaban destinados a estudiar si el diafragma aislado era capaz

* Este trabajo fue financiado en parte con la ayuda de la Fundación Rockefeller y la Organización Mundial de la Salud (Grant Nº R/00051).

de retener el inhibidor- α_2 y si esta retención previa le confiriera al inhibidor cierta prioridad sobre la acción de la insulina agregada posteriormente.

MATERIAL Y MÉTODO

Los experimentos se realizaron en preparaciones de hemidiafragma de ratas blancas, utilizando la técnica de Randle en la forma comunicada anteriormente (1). Los cambios en la captación de glucosa se calcularon por la diferencia entre la observada en el experimento y en el testigo, expresada en mg de glucosa captada por g de diafragma húmedo y por hora de incubación. Los valores positivos (+) de esta diferencia corresponden a aumento de la captación y los negativos (-) a disminución.

La glucosa se determinó mediante el procedimiento de Somogyi-Nelson (6). La incubación se llevó a cabo en baño de Dubnoff a 37°C durante 90 minutos con 120 agitaciones por minuto. Como medio de cultivo se empleó el de Gey y Gey (7).

La sangre se obtuvo de individuos sin ayuno, alrededor de las 10 A.M., por punción venosa y se recibió en solución anticoagulante cítrico-glucosada en la forma antes descrita (1). La adición de insulina al plasma total se practicó inmediatamente después de haber separado el plasma de los eritrocitos, mediante centrifugación. Se emplearon dosis de insulina variables entre 500 y 5 000 μ U/ml. Para la separación de las diversas fracciones se procedió según la técnica descrita por Lever *et al.* (5).

Los experimentos en los cuales se adicionó simultáneamente insulina y globulina- α_2 , la incorporación de la insulina a la fracción plasmática se hizo en el momento en que se agregaba al medio de cultivo. La cantidad adicionada se calculó en cada caso de modo que se mantuviera la concentración original del medio de cultivo de Gey.

La mayoría de los experimentos se hicieron con insulina Lilly de origen bovino, partiendo de una solución que contenía 40 U/ml,

de la cual se preparó inmediatamente antes del experimento, una solución madre que contenía 0,1 U/ml, y que sirvió para preparar las diluciones correspondientes.

En algunos experimentos se empleó insulina cristalizada de Boots Drugs de 20 U/mg o insulina humana cristalizada de 25 U/mg, proporcionada gentilmente por el Dr. I. A. Mirsky.

Todo el material de vidrio empleado en los experimentos fue sometido previamente a tratamiento con silicón (Siliclad). La globulina- α_2 se obtuvo de la fracción IV-V-VI mediante separación electroforética continua sobre columna de celulosa o cortina de papel (7, 8). La concentración de globulina- α_2 que se utilizó en los experimentos fue de 1 mg/ml, con la cual hemos conseguido comúnmente inhibición de la captación de glucosa. En algunos experimentos se ajustó esta concentración a 2 y 5 mg/ml.

Los experimentos de la serie 3 se llevaron a cabo en la siguiente forma: un cuarto de diafragma se sumergió en solución de globulina- α_2 (1 mg/ml) durante 2 minutos y se incubó a 37°C; en seguida se lavó con 5 ml de solución de Gey durante 30 segundos y se secó entre dos hojas de papel Whatman y se sometió a nueva incubación en la forma habitual, en solución de Gey adicionada de 500 μ U/ml de insulina. Este procedimiento corresponde a la técnica propuesta por Stadie *et al.* (9), con algunas modificaciones referentes a los tiempos de contacto y a la forma de realizar el lavado, así como una disminución de la concentración de insulina a la centésima parte.

RESULTADOS

Distribución de la insulina agregada previamente al plasma entre las diversas fracciones proteicas.

En la Tabla I aparecen resumidos los resultados obtenidos en los experimentos en los cuales se estudió la distribución

TABLA I

Distribución de la Insulina adicionada in vitro a plasma humana normal, entre las fracciones proteicas de Lever. Diferencia de la captación de glucosa (Δ), en mg por gramo de diafragma fresco y hora, entre el experimento en blanco y el correspondiente que contenía la fracción proteica. (Media aritmética \pm su error típico).

Fracción	T e s t i g o s		I n s u l i n a 5 mU/ml	
	Número de exp.	Δ	Número de exp.	Δ
I - III	20	+ 0,87 \pm 0,39	18	+ 1,12 \pm 0,41
II	22	- 0,12 \pm 0,24	22	+ 1,50 \pm 0,28
IV-V-VI	22	- 0,61 \pm 0,27	22	+ 1,10 \pm 0,27

El número de hemi-diafragmas empleados en cada experimento fue de 5 a 6 en el blanco y de 5 a 6 en la fracción proteica, con o sin insulina.

TABLA II

Efecto de la adición simultánea de insulina y de globulina- α_2 humana al medio de cultivo, sobre la captación de glucosa por el diafragma aislado de rata.

Exp. N°	Material adicionado	Concentración		Δ *	P **
		μ U/ml	mg/ml		
1	Insulina	100	—	— 0,05 \pm 0,24	> 0,30
	α_2	—	1,0	— 0,66 \pm 0,27	> 0,20
	Insul. + α_2	100	1,0	— 0,71 \pm 0,21	> 0,10
	Insulina	500	—	+ 1,95 \pm 0,23	< 0,01
	Insul. + α_2	500	1,0	+ 3,47 \pm 0,12 ***	< 0,001
2	α_2	—	1,0	— 0,69 \pm 0,21	> 0,05
	Insul. + α_2	1.000	1,0	+ 1,82 \pm 0,36	> 0,05
3	Insulina	1.000	—	+ 3,02 \pm 0,33	< 0,01
	α_2	—	2,0	— 0,08 \pm 0,18	> 0,80
	Insul. + α_2	1.000	2,0	+ 3,77 \pm 0,24	< 0,001
4	Insulina	2.500	—	+ 0,16 \pm 0,21	> 0,70
	α_2	—	1,6	— 0,91 \pm 0,19	< 0,05
	Insul. + α_2	2.500	1,6	+ 1,39 \pm 0,20 ***	< 0,01
5	Insulina	2.500	—	+ 1,81 \pm 0,13	< 0,001
	α_2	—	5,0	— 0,37 \pm 0,37	< 0,60
	Insul. + α_2	2.500	5,0	+ 2,97 \pm 0,48	< 0,01
	Insulina	5.000	—	+ 3,22 \pm 0,45	< 0,01
	Insul. + α_2	5.000	5,0	+ 3,96 \pm 0,20	< 0,001

* Δ tiene igual significado que en Tabla I. En cada experimento se emplearon 5 hemi-diafragmas en el blanco y 5 en el que contenía la sustancia adicionada.

** Con respecto al experimento en blanco.

*** Potenciación estadísticamente significativa $P < 0,01$ del efecto insulínico.

entre las proteínas plasmáticas, de la insulina agregada al plasma, comparada con testigos en los cuales se estudió la actividad de las respectivas proteínas sin adición de insulina. Los resultados muestran que la insulina adicionada se recupera principalmente en la fracción IV-V-VI y en la fracción II, que corresponde a la globulina γ . Si se estudia la diferencia entre el efecto de cada fracción sin y con insulina, aparece claro que la mayor actividad insulínica se encuentra en las fracciones IV-V-VI y que su presencia en ella no entraña una neutralización de su efecto. Conviene recordar que en esta fracción se encuentra contenido el inhibidor- α_2 .

Efecto de la presencia simultánea de insulina y de inhibidor- α_2 .

La Tabla II resume los resultados de los experimentos en que se incubaron hemi-diafragmas de rata en medios a los cuales se había agregado insulina, inhibidor- α_2 o ambos en diferentes concen-

traciones. Los datos muestran que la concentración de 100 μ U de insulina por ml no modifica la captación de glucosa, pero que a partir de 500 μ U/ml, el efecto es indiscutible. La dosis de 1 mg de inhibidor- α_2 produjo constantemente una disminución de la captación, aunque en cada experimento la diferencia no alcanzó a ser significativa. Si se comparan los efectos producidos por dosis de 500 μ U/ml de insulina o superiores, en presencia o en ausencia de inhibidor- α_2 puede apreciarse que la agregación del inhibidor no produce una disminución del efecto de la insulina y que, al contrario, parece favorecerlo en ciertos grupos experimentales donde el efecto de la insulina en conjunto con el inhibidor- α_2 produjo una captación de glucosa significativamente mayor que la de la insulina sola (experimentos 1 y 4)

En otro experimento, no mencionado en la tabla respectiva, se ensayó insulina de origen humano utilizando un octavo de diafragma. En este experimento se usa-

TABLA III

Ausencia de antagonismo entre inhibidor- α_2 e insulina, en condiciones de contacto previo del diafragma con el inhibidor- α_2 (técnica de Stadie).

Condiciones	Número de diafragma	Captación de glucosa mg/g/hora	P
Experimento en blanco	6	5,14 \pm 0,36	
Contacto previo con α_2 ; 1 mg/ml	6	4,59 \pm 0,55	> 0,4
Id. + insulina 500 μ U/ml	6	6,86 \pm 0,10	< 0,01

ron 500 μ U/ml de insulina y 0,5 mg/ml de globulina- α_2 . La insulina sola produjo una captación de + 5,0 mg/g/hora y la globulina- α_2 de -1,4 mientras que la asociación de ambas produjo un resultado de + 7,3.

Este último experimento se realizó con un medio de cultivo enriquecido en Mg, cuya concentración llegaba a 5 mM, condición en la cual el efecto inhibitorio de la globulina- α_2 está aumentado (13). En el testigo de este experimento en que se utilizó un medio no enriquecido en Mg, tampoco se observó antagonismo. Efectivamente la insulina produjo un cambio de + 5,1 y la insulina asociada con globulina- α_2 de + 6,0.

Influencia del contacto previo del diafragma con inhibidor- α_2 sobre el efecto de la insulina.

En la Tabla III aparecen los resultados obtenidos en los experimentos en los cuales se colocó previamente el inhibidor- α_2 en contacto con el diafragma en concentración de 1 mg/ml en la forma establecida en material y métodos. Los resultados de esta tabla muestran que el contacto previo con inhibidor- α_2 no modificó la acción de la insulina.

Efecto antagónico de la sinalbúmina y la insulina.

Como un testigo de los resultados antes estudiados, se investigó en condiciones experimentales equivalentes a las empleadas en los experimentos de administración

TABLA IV

Antagonismo entre sinalbúmina e insulina.

Condiciones	Número de diafragma	Captación de glucosa mg/g/hora
Experimentos en blanco	6	3,8 \pm 0,3
Insulina (1 000 μ U/ml)	6	6,5 \pm 0,6
Sinalbúmina (50 mg/ml)	6	3,2 \pm 0,2
+ Sinalbúmina (50 mg/ml)	6	4,7 \pm 0,8 *

* P < 0,05, en comparación con el valor obtenido en los experimentos con insulina sola.

simultánea, el efecto de la agregación de 50 mg/ml de sinalbúmina al medio de cultivo del diafragma, sobre la acción de la insulina en dosis de 1000 μ U/ml.

La sinalbúmina usada en este experimento fue preparada según la técnica de Debro *et al.* (10) en la forma propuesta por Vallance-Owen (11). Los resultados aparecen resumidos en la Tabla IV. La neutralización de la actividad insulínica ejercida por la sinalbúmina fue del 66%. Ellos demuestran que la sinalbúmina inhibe de una manera clara el efecto de la insulina, lo que confirma que en las condiciones experimentales de agregación simultánea es posible reconocer el efecto de sustancias antagónicas y, por consiguiente, que el método resulta apropiado para la investigación del antagonismo entre el inhibidor- α_2 y la insulina.

DISCUSIÓN

Los resultados experimentales permiten concluir que en las condiciones experimentales empleadas, el inhibidor- α_2 no neutraliza el efecto de la insulina bovina o humana sobre la captación de glucosa del diafragma aislado de rata, contrariamente a lo que produce la sinalbúmina. Esto demuestra que hay una clara diferencia entre el antagonista sinalbúmina y el denominado inhibidor- α_2 .

Llama la atención que la fracción IV-V-VI, que también contiene sinalbúmina,

no haya revelado capacidad para antagonizar la insulina. Al contrario, puede afirmarse que la mayor parte de la insulina adicionada al plasma se encuentra en la fracción IV-V-VI, un resultado un tanto inesperado. Esto puede interpretarse en el sentido de que la fracción I-III que contiene las lipoproteínas- β , que normalmente transportan a la insulina-unida, estaba saturada de insulina.

Los datos comunicados aquí son concordantes con resultados obtenidos por Berman y Wertheimer (12) con un inhibidor semejante al inhibidor- α_2 , encontrado también en la fracción proteica IV-V-VI de Cohn, pero en el suero de ratas sometidas a ayuno durante 72 horas, el cual tampoco antagonizó a la insulina adicionada al medio de incubación del diafragma.

SUMMARY

The possible "in vitro" antagonism between α_2 -inhibitor and insulin was studied by means of the determination of the glucose uptake by the isolated rat hemi-diaphragm. Three lines of research were followed: 1) the addition of insulin to the whole plasma in order to find in which Cohn-Lever's protein fraction would it be recovered (Table I); 2) the simultaneous incorporation of the α_2 -globulin and insulin into the buffer (Table II), and 3) the previous immersion of the diaphragm in a solution of α_2 -globulin (1 mg/ml), followed by the incubation in buffer with insulin (500 μ U/ml), as a modification of the Stadie's technique

(Table III). Neither in experiments 1), 2) nor 3) an antagonism toward insulin was demonstrated. Experiments with human insulin showed the same results.

It is concluded that the α_2 -inhibitor, with a typical opposite insulenic effect, is not an antagonist of insulin. For this reason it seems appropriate to keep the designation of inhibitor instead of antagonist for this type of substance.

REFERENCIAS

- 1.—VARGAS, L., TAYLOR, K. W. y RANDLE, P. J. — *J. Biochem.* **77**: 43, 1960.
- 2.—VARGAS, L. y CHARLÍN, M. — *Arch. Biol. Med. Exper.* **1**: 3, 1964.
- 3.—VARGAS, L. y CHARLÍN, M. — *Excerpta Med., Amst. International Congress Series N° 48, Abstract N° 892*, 1962.
- 4.—VARGAS, L., COLOMA, L. y CHARLÍN, M. — *6° Congreso Asoc. Latinoamer. Ciencias Biológicas, Resumen N° 324, Viña del Mar, Chile, 1964.*
- 5.—LEVER, W. F., GURD, F. R. N., UROMA, E., BROWN, R. K., BARNES, B. A., SCHMID, K. y SCHULTZ, E. L. — *J. Clin. Invest.* **30**: 99, 1951.
- 6.—SOMOGYI, M. — *J. Biol. Chem.* **160**: 61, 1945.
- 7.—GEY, G. O. y GEY, M. R. — *Am. J. Cancer* **27**: 45, 1936.
- 8.—CHARLÍN, M. y VARGAS, L. — *Acta Physiol. Latinoamer.* **14**: 154, 1964.
- 9.—STADIE, W. C., HAUGAARD, N., MARSH, J. B. y HILLS, A. G. — *Am. J. Med. Sci.*, **218**: 265, 1949.
- 10.—DEBRO, J. R., TARVER, H. y DORNER, A. — *J. Lab. Clin. Med.* **50**: 728, 1957.
- 11.—VALLANCE-OWEN, J. y LILLEY, M. D. — *Lancet* **1**: 802, 1961.
- 12.—BERMAN, E. R. y WERTHEIMER, E. — *Am. J. Physiol.* **198**: 1075, 1960.
- 13.—VARGAS, L. y CHARLÍN, M. — *Arch. Biol. Med. Exper.* **1**: 1, 1964.