

Posible efecto de la bromocriptina sobre el receptor de insulina

M. E. Jiménez-Mejías, J. M. Guerrero-Montávez y A. Aznar-Martín*

Cátedra de Bioquímica
Facultad de Medicina
Sevilla (España)

(Recibido el 20 de abril de 1983)

M. E. JIMENEZ-MEJIAS, J. M. GUERRERO-MONTAVEZ and A. AZNAR-MARTIN. *Possible Effect of Bromocriptine on the Insuline Receptor*. Rev. Esp. Fisiol., 40,133-140, 1984.

The administration of 0.00011 mg/g weight/day of bromocriptine (CB₁₅₄) for 7 days to Wistar rats, improved the peripheral glucose uptake without significant changes in plasma insulin level, during the intravenous glucose tolerance test (0.33 g/kg).

The mode of the bromocriptine action on binding of ¹²⁵I insulin to erythrocyte insulin receptors has been evaluated.

The total number of sites was greater with bromocriptine (513.1 ± 124.1 pM/l, CB₁₅₄ 815.6 ± 107.9 pM/l) ($p < 0.01$). The high affinity/low capacity compound of insulin receptor, in CB₁₅₄ rats (51.8 ± 16.8 pM/l) was higher than in normal rats (18.3 ± 8.9 pM/l) ($p < 0.005$).

Additional studies indicated that CB₁₅₄ had no effect on the rate of association and dissociation of ¹²⁵I insulin from rats erythrocyte insulin receptors. The degradation of insulin or the erythrocyte receptor sites do not change, after the treatment with CB₁₅₄.

Key words: Bromocriptine, Insuline receptor.

La bromocriptina es un alcaloide ergotamínico cuya principal característica es una acción estimuladora sobre los receptores dopaminérgicos de la hipófisis y de los sistemas nerviosos central y periférico (8, 9, 11, 30, 37, 38, 44, 45).

La acción de la bromocriptina sobre

el metabolismo de los hidratos de carbono es un tema muy debatido. Mejora la tolerancia a la sobrecarga de glucosa en sujetos acromegálicos, si bien este efecto no corre parejo con el descenso de los niveles plasmáticos de insulina y glucagón (2, 5, 10, 12, 19, 33, 39, 44).

Su administración a pacientes con diabetes mellitus, tiene un efecto muy heterogéneo (1, 4, 6, 7, 14, 18, 39, 41). Su eficacia sobre la tolerancia a la glucosa no guarda relación con el tipo clí-

* Correspondencia: Dr. A. Aznar-Martín. Cátedra de Patología y Clínica Médicas (II). Departamento de Medicina Interna. Hospital Universitario. Sevilla-9 (España).

nico de la diabetes y tampoco es paralela a la tasa plasmática de hormona de crecimiento, no acompañándose de modificaciones en los niveles de glucagón e insulina (46).

Por todo ello, nos propusimos estudiar si la bromocriptina induce alteraciones en el metabolismo glucídico. En una primera fase se observó el efecto de la bromocriptina sobre las glucemias basal y tras sobrecarga intravenosa de glucosa. Posteriormente, se consideraron sus posibles acciones sobre la liberación de insulina y sobre sus receptores, puntos que se describen en el presente trabajo.

Material y métodos

Se utilizaron ratas Wistar machos intactos (330-450 g), con período día/noche (14-10 h), 24° C de temperatura ambiental y 55-60 % de humedad relativa, con dieta *ad libitum* hasta el momento del experimento. Se distribuyeron en diferentes subgrupos homogéneos, a fin de realizar los distintos experimentos, los cuales comenzaron a la misma hora y en las mismas condiciones. A los animales de un subgrupo se les administró bromocriptina en polvo (CB-154, Sandoz) diluida en el agua de bebida, durante un período de siete días, y a una dosis de 0,00011 mg/g peso/día, equivalente en el hombre a 7,5 mg/día.

Tanto al subgrupo considerado control como al tratado con bromocriptina se les sometió a una sobrecarga i.v. de glucosa (0,33 g glucosa/kg peso), apreciándose la tasa de glucosa disponible («K») según el método Quickel y estudiándose glucemias basales y tras sobrecarga e insulinemias. La cuantificación de la glucosa se realizó por el método de la glucosa-oxidasa (Test-Combination Glucosa GOD-Perid; Boehringer-Mannheim), utilizándose como desproteinizante del plasma una solución de ace-

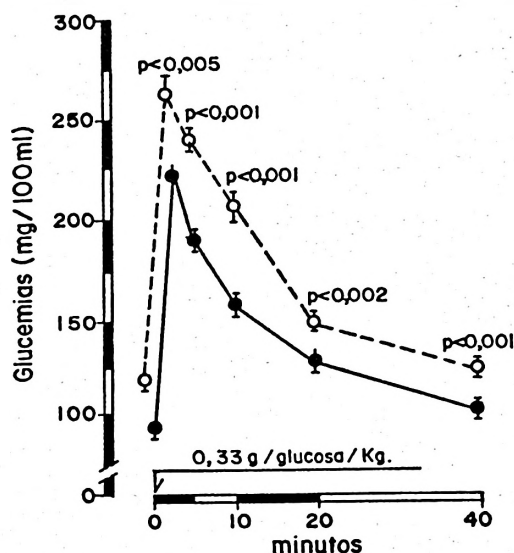
tato de uranilo (Urac®, Boehringer). La insulinemia se valoró por radioinmunoanálisis, con kit obtenido comercialmente (Insik 5, Cea-SORIN).

Para el estudio de la interacción insulina-receptor se siguió el método descrito por GAMBHIR *et al.* (24), el cual consiste en la obtención y separación de los hematíes mediante gradiente de densidad con Hypaque-Ficoll y centrifugación a 1.600 rpm; incubación de los hematíes a 15° C durante 210 min; y separación de los complejos insulina-receptor formados. Se utilizó insulina porcina monoiodada-I¹²⁵ (actividad específica 190-200 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), siguiendo la técnica de FREYCHET (23); e insulina porcina cristalizada no marcada («fría») de Novo.

A los resultados se les aplicó el test de la t de Student, para la significación estadística de las diferencias. Al porcentaje de unión de insulina a su receptor se le aplicó el test de SCATCHARD (40) utilizándose la representación de HILL (26) para determinar el índice de cooperatividad y, la afinidad del receptor y las modificaciones de éste, cuando aumenta el grado de ocupación, según el método de DE MEYTS (15).

Resultados

Efecto de la bromocriptina sobre las glucemias e insulinemias basales y tras sobrecarga intravenosa de glucosa. Se utilizaron 20 ratas, distribuidas en dos grupos de 10, uno control y otro al que se le administró bromocriptina a dosis y tiempos descritos anteriormente, no existiendo diferencias estadísticas entre los pesos promedios de ambos grupos. Mostraron una glucemia basal promedio de $118,3 \pm 7,4$ mg/100 ml (control) y $92,5 \pm 10,2$ mg/100 ml (tratado), diferencia que era estadísticamente significativa. Tras la sobrecarga i.v. de glucosa, las glucemias se elevaron en todos



Figuras artículo n.º 1

Fig. 1. Niveles de glucemia ($\bar{x} \pm ds$) tras sobrecarga i.v. de glucosa.

Grupo control (○) ($K = 1,919$) y grupo sometido a tratamiento con bromocriptina (●) ($K = 2,197$).

Cantidad de glucosa disponible: índice K.

los animales. El incremento fue mayor en el grupo control que en el tratado con bromocriptina en todos los puntos testados de la curva, encontrándose que entre ambos grupos existía una diferencia significativa (fig. 1).

No se observaron diferencias en las insulinemias, valoradas por RIA, dando la insulina basal del grupo control $83,7 \pm 11,7 \mu\text{U/ml}$, y la del tratado $83,2 \pm 11 \mu\text{U/ml}$. Tras la sobrecarga i.v. de glucosa tampoco se apreciaron diferencias entre ambos grupos, para cada uno de los tiempos considerados.

Efecto de la bromocriptina sobre la interacción insulina-receptor. Mediante la incubación de hematíes a 15°C y a diferentes tiempos (30, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 min), y en presencia de concentraciones trazadoras de insulina- I^{125} , se estudió la interacción insulina-

receptor en cuanto al tiempo de equilibrio. El equilibrio aparente se alcanzó a tiempo similar (210 min) en las dos situaciones, permaneciendo estable durante los 360 min que duró el experimento, y observándose una igual velocidad de asociación en ambos grupos.

También se estudió el efecto de la bromocriptina sobre la reversibilidad de la unión insulina-receptor. A una incubación que había alcanzado una situación de equilibrio aparente, se le añadió un exceso de insulina no radiactiva, produciéndose una disociación progresiva de los complejos receptor-insulina- I^{125} formados. Ambos grupos se comportaron de manera análoga, disminuyendo el porcentaje de insulina- I^{125} unida a su receptor conforme pasó el tiempo, observándose, para cada tiempo considerado (hasta 240 min), unas cinéticas de disociación de valores superponibles.

La degradación de la insulina unida, estudiada mediante la pérdida de su actividad biológica, en cuanto a su capacidad para reasociarse, en preparaciones frescas de membranas hepáticas, después de un período de incubación de 90 min, en el grupo control fueron de 31,3 % frente a 32 % obtenido en el grupo tratado.

No se modificó la degradación del receptor mediante la incubación de los hematíes, sin hormona a tiempos 0, 60, 120, 180, 240 min, añadiendo insulina- I^{125} una vez transcurridos éstos, y procesando posteriormente los tubos de la forma habitual.

El porcentaje de unión específica de insulina-receptor del hematíe (unión total — unión inespecífica) (unión inespecífica = 4,29 %), fue estudiado mediante la incubación de hematíes con una concentración determinada de hormona trazadora y concentraciones crecientes de insulina no marcada. En ausencia de insulina fría el porcentaje de unión específica en el grupo control fue de $6,9 \pm 1,9 \%$ y en el grupo tratado de

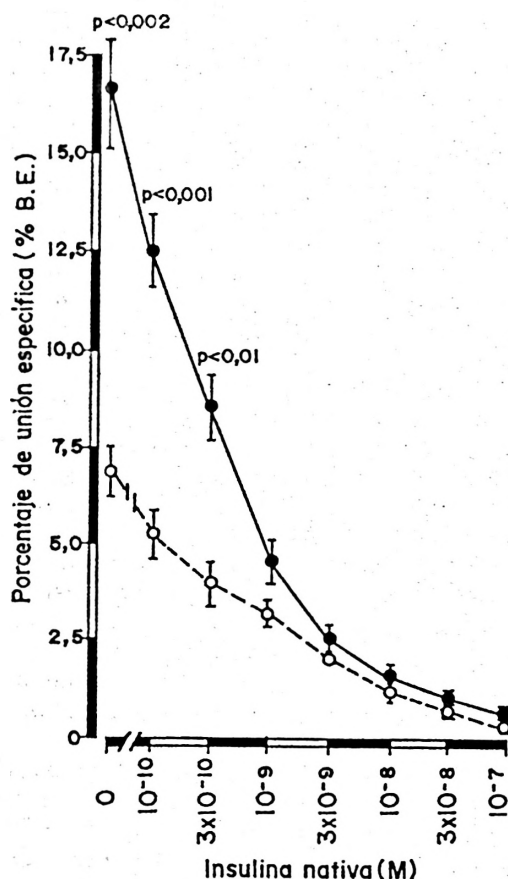


Fig. 2. Porcentaje de unión específica de la insulina con su receptor en el hematíe de la rata, a diferentes concentraciones de insulina fría. Grupo control (o), y grupo tratado (●).

$16,6 \pm 3,5 \%$, siendo este aumento estadísticamente significativo. Con concentraciones crecientes de insulina no marcada (10^{-10} , 3×10^{-10} , 10^{-9} , 3×10^{-9} , 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} M) la unión específica fue progresivamente menor en ambos grupos, reduciéndose las diferencias entre dichos grupos, de forma que solamente las diferencias porcentuales para las concentraciones 10^{-10} y 3×10^{-10} M eran estadísticamente significativas (figura 2).

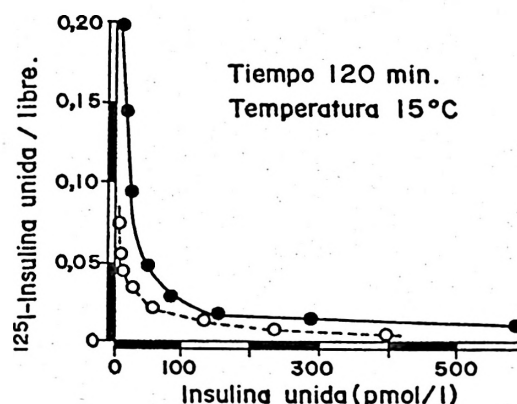


Fig. 3. Cálculo de la constante de afinidad y de disociación por el análisis de Scatchard. Grupo control (o) y grupo sometido a tratamiento con bromocriptina (●)

Estos datos se sometieron a un análisis por el método de Scatchard, para efectuar una comparación del comportamiento del receptor de insulina y su número entre las ratas control y las sometidas a tratamiento. Se obtuvo, para ambos grupos, un patrón curvilíneo de concavidad superior indicando la existencia de dos componentes en el receptor (fig. 3). Los valores de insulina unida para el grupo control fueron en todo momento inferiores a 675 pM/l ($\bar{x} = 513,1 \pm 124,1 \text{ pM/l}$) y para el grupo tratado superiores a los 700 pM/l , ($\bar{x} = 815,6 \pm 107,9 \text{ pM/l}$), siendo el incremento de un $58,9 \%$ ($p < 0,01$).

El componente caracterizado por alta afinidad/baja capacidad mostró un valor promedio de $18,3 \pm 8,9 \text{ pM/l}$ en el grupo control, siempre inferior a 31 pM/l . Por el contrario, el grupo tratado mostró valores siempre superiores a 45 pM/l ($\bar{x} = 51,8 \pm 16,8 \text{ pM/l}$). Este aumento ($179,5 \%$) con respecto al grupo control era estadísticamente significativo ($p < 0,005$).

Por el método de Scatchard se calcularon también las constantes de afinidad

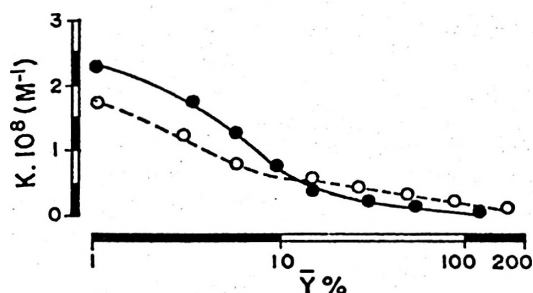


Fig. 4. Representación de De Meyts, para perfiles de afinidad.

Grupo control (o) y grupo tratado (●). Ambos grupos muestran perfiles de afinidad similares, sin diferencias significativas.

y de disociación. Para el grupo control se obtuvo una constante de disociación media de $4 \pm 0,7 \times 10^{-8}$ y para el grupo tratado $4,6 \pm 0,3 \times 10^{-8}$ para los receptores totales. Para el componente de alta afinidad/baja capacidad fue en el grupo control de $2,4 \pm 0,8 \times 10^{-10}$, y para el grupo tratado de $2,4 \pm 0,7 \times 10^{-10}$. Se calculó asimismo la constante de afinidad para los receptores totales y de alta afinidad/baja capacidad en los distintos experimentos. Los receptores totales mostraron una constante de afinidad de $2,5 \pm 0,4 \times 10^7$ en el grupo control y de $2,1 \pm 0,1 \times 10^7$ en el tratado, y para el componente de alta afinidad $0,5 \pm 0,2 \times 10^{10}$ y $0,4 \pm 0,2 \times 10^{10}$, respectivamente, no existiendo diferencias significativas.

Mediante la representación de HILL (26), se procedió a estudiar el grado de cooperatividad entre ambos componentes, encontrándose una cooperatividad negativa, ya que los índices obtenidos estaban por debajo de la unidad (0,509 y 0,485, grupos control y tratado respectivamente).

Por último, se efectuaron perfiles de afinidad según el método de DE MEYTS (fig. 4) para cada uno de los experimentos realizados. Ambos perfiles medios

tenían el mismo comportamiento, correspondiendo a ese grado de ocupación bajo al componente de alta afinidad/baja capacidad. A medida que se ocupaba el componente de baja afinidad/alta capacidad, la afinidad disminuía un poco más rápidamente en el grupo tratado, para llegar a unos valores muy similares cuando el grado de ocupación era elevado ($K_{yc} 0,066 \times 10^8 M^{-1}$, $K_{yp} 0,062 \times 10^8 M^{-1}$). Estas diferencias no eran significativas.

Discusión

La administración de bromocriptina a ratas, durante 7 días, indujo un mejoramiento en la utilización de la glucosa, con un aumento del índice «k». El posible efecto de este agonista dopaminérgico sobre la homeostasis de la glucosa habría de indagarlo entre una alteración y/o potenciación del efecto de la insulina. La disminución de la glucemia en situación basal, y una mejor utilización de ésta tras sobrecarga i.v. de glucosa (0,33 g/kg peso), no se acompañó de modificaciones significativas en las insulinemias, datos que concuerdan con los obtenidos por LANDGRAF (29) en páncreas aislados y perfundidos, cuya secreción de insulina glucosa-inducida no se modificaba por la administración de bromocriptina a dosis farmacológicas. Tampoco DEL POZO *et al.* (16, 17) observó alteraciones de la insulinemia en 15 sujetos normales tras la administración de bromocriptina.

En cuanto a la unión de la insulina a su receptor, en estos ensayos con ratas normales, es semejante a la obtenida por otros autores (24, 31, 35, 43, 46, 47), para otros sistemas celulares y en otros animales, testándose como un excelente modelo experimental para el estudio de la alteración insulina-receptor.

La administración de bromocriptina indujo un aumento en el porcentaje de

unión específica entre la insulina y su receptor (139,8 %) que podría ser debido a un aumento de la afinidad del receptor, y/o a un aumento del número de receptores. El aumento en la afinidad del receptor podría ser debido a un aumento de la velocidad de asociación y/o disminución en la disociación, o bien a alteraciones en la degradación de insulina o de su receptor eritrocitario. En ambos grupos el equilibrio de asociación se alcanzó al mismo tiempo, y se mantuvo constante durante los 360 min que duró el experimento ($T = 15^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 8,0$), condiciones idóneas para alcanzar el estado de equilibrio en estudios con receptores eritrocitarios de insulina, según otros autores (24). La bromocriptina no indujo alteraciones en la velocidad de disociación, en la degradación de la insulina, ni del receptor, no modificándose la afinidad de la insulina por su receptor.

Al someter los datos obtenidos a un análisis de Scatchard se obtuvo una gráfica curvilínea de concavidad superior, cuya interpretación es compatible con la existencia en el receptor de dos componentes: uno de alta afinidad/baja capacidad y otro de baja afinidad/alta capacidad, como han demostrado profusamente otros autores (21, 22, 28, 33-36). Así, se comprobó que la bromocriptina inducía un aumento del número total de receptores, tanto en el componente de baja afinidad como en el de alta afinidad, siendo el incremento más evidente en este último componente. Este incremento no es explicable por un fenómeno de *Down regulation* (3, 25, 42, 43), ya que los valores de insulinemia no han descendido, ni se podría explicar por alteraciones en los niveles de hormonas contrainsulares (HGH, glucagón, cortisol, catecolaminas y somatostatina) ya que la bromocriptina no afecta a los niveles de glucagón y muy levemente a los de cortisol y catecolaminas en el hombre (13, 17, 30, 32, 43).

Otra posibilidad derivada del análisis de Scatchard sería la existencia de una interacción insulina-receptor de tipo cooperatividad negativa, distintas en cada uno de los grupos. Sin embargo, al someter los resultados a un análisis por el método de Hill, en ambos grupos se testaron índices de cooperatividad negativa similares.

Hallazgos semejantes, aceleración en la asimilación de la glucosa tras la administración intravenosa e incremento del número total de receptores en el eritrocito, han sido señalados por HOLLE *et al.* (27), tras la administración de biguanidas.

Resumen

La administración de bromocriptina a ratas (0,00011 mg/g peso/día), durante 7 días, induce una mejoría en la utilización periférica de la glucosa, sin incremento de la insulinemia, tras sobrecarga i.v. de glucosa (0,33 g/kg peso). Sobre la interacción de insulina-receptor de hematíes da un incremento en el número total de receptores (control $513,1 \pm 124,1$ pM/l; tratado $815,6 \pm 107,9$ pM/l). El componente caracterizado por alta afinidad/baja capacidad muestra unos valores estadísticamente superiores en el grupo tratado ($51,8 \pm 16,8$ pM/l al control $18,3 \pm 8,9$ pM/l), que representa un aumento de 179,5 % ($p < 0,005$).

La bromocriptina no tiene efecto sobre la velocidad de asociación y disociación, en la degradación del receptor, ni de la insulina.

Bibliografía

1. ALBERTI, K., HOCKADAY, T. y TURNER, R.: *Lancet* II, 515-522, 1973.
2. ALLAIN, H., VAN DER DRIESCHE, J. y HINAULT, P.: En «La bromocriptine». Colloque de Paris 1980. Sandoz Edition, París, 1980, pp. 89-104.
3. BAR, R., GORDEN, P., ROTH, J. y SIEBERT, C.: *J. Clin. Endocr. Metab.*, 44, 1210-1213, 1977.

4. BARNETT, A. H., CHAPMAN, C., GAILER, K. y HAYTER, C. J.: *Postgrad. Med. J.*, **56**, 11-14, 1980.
5. BARTKE, A. y LACKRITZ, R.: *Fertil. Steril.*, **35**, 4-7, 1981.
6. BASKIN, D. y WILSON, CH.: *N. Engl. J. Med.*, **306**, 178, 1982.
7. BAXTER, M., GOHHER, M. y COORE, H.: *Biochem. Soc. Transact.*, **6**, 968-969, 1978.
8. BERGERON, J. J. M., LEVINE, G. y SIKSTROM, R.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 5051-5055, 1977.
9. BESSER, G. M., THORNER, M. O. y WASS, A. H.: *Proc. Symp. Roy. Coll. Physic.*, **1**, 78-88, 1976.
10. BIGGS, J. S. G., HACKER, N., ANDREWS, E. y MUNRO, C.: *Med. J. Australian*, **2**, 23-25, 1978.
11. BORESTEIN, P., SORET, C. y GRAILLE, D.: *Sem. Hop.*, **57**, 801-809, 1981.
12. BROOKS, A. P., STEWART, G. W., y BAIRD, J. D.: *Brit. Med. J.*, **280**, 1070, 1980.
13. BYBEE, D., WIESEN, M., ARONIN, N., KRIEGER, D. T., FROHMAN, L. A. y KOPIN, I. J.: *J. Clin. Endocr. Metab.*, **54**, 648-650, 1982.
14. CUSHMAN, S. W. y SALANS, L. B.: *57th. Ann. Meet. Endocr. Soc.*, **84**, 92, 1975.
15. DE MEYTS, P.: *J. Supramol. Struct.*, **4**, 241-245, 1976.
16. DEL POZO, E., BARRAGH, A. y LANCAJAN, J.: *Clin. Endocrinol.*, **6**, Suppl. 1, 47-56, 1977.
17. DEL POZO, E. y OHNHAUS, E. F.: *Hormone Res.*, **7**, 11-15, 1976.
18. FEDELE, D., MOLINARI, M., MENECHEL, A., VALERIO, A., MUGGEO, M., y TIEGO, A.: *J. Endocrinol. Invest.*, **3**, 149-153, 1980.
19. FELIG, P.: En «Diabetes. Its Physiological and Biochemical Bases» (Vallence-Owen, J. P. ed.). MTP Press, Lancaster, 1976, pp. 93-116.
20. FERRARI, C.: *Clin. Endocr.*, **5**, 575-578, 1976.
21. FREEMAN, C., KAROLY, H. y ALDEMAN, R.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **54**, 1572-1580, 1983.
22. FREYCHET, P.: *Diabet. Metab.*, **1**, 51-57, 1975.
23. FREYCHET, P., ROSELLING, G., RANCON, F., FOUCHERAU, M. y BOER, Y.: *Hormone Metab. Res.*, **5**, 72-78, 1974.
24. GAMBHIR, K. K., ARCHER, J. A. y BRADLEY, C. J.: *Diabetes*, **27**, 701-708, 1978.
25. HELDERMAN, J. H. y RASKIN, P.: *Diabetes*, **29**, 551-557, 1980.
26. HILL, A. V.: *Biochem. J.*, **7**, 471-475, 1913.
27. HOLLE, A., MANGELS, W. y DREYER, M.: *N. Engl. J. Med.*, **305**, 563-566, 1981.
28. KAHN, C. R., NEVILLE, D. M. y ROTH, J.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 244-249, 1973.
29. LANDGRAF, R.: *21th. Symp. Dtsch. Ges. Endokrin.*, Suppl. 193. Abstr. 65, 1975.
30. LIGHTNER, E. S., y WINTER, J. S. D.: *J. Pediatrics*, **98**, 404-406, 1981.
31. MARSHALL, S.: *Diabetes*, **32**, 319-325, 1983.
32. MOSES, A. C., MOLITCH, M. E., SAWIN, C. T., JACKSON, I. M. D., BILLER, B. J., FURNALLETTO, R. y REICHLIN, S.: *J. Clin. Endocr.*, **53**, 752-758, 1981.
33. MUGGEO, M., BAR, R. S., ROTH, J., KAHN, R. y GORDEN, P.: *J. Clin. Endocr. Metab.*, **48**, 17-25, 1979.
34. MUGGEO, M., SAVIOLAKIS, G. A., BUSINARO, V., VALERIO, A., MOGHETTI, P. y CREPALDI, G.: *J. Clin. Endocr. Metab.*, **56**, 733-738, 1983.
35. OLEFSKY, J. M., CHANG, H. y STANFORD, M. S.: *Diabetes*, **27**, 946-958, 1978.
36. OLEFSKY, J. M. y REAVEN, G. M.: *J. Clin. Invest.*, **54**, 1323-1328, 1974.
37. PARKES, J. D.: *Ars. Med. (Nivelles)*, **35**, 517-527, 1980.
38. PELKONEN, R., GRAHNA, B., HIRVONEN, E., KARONEN, S. L., SALMI, J., TIKKANAN, M. y VALTONEN, S.: *Clin. Endocr.*, **14**, 335-348, 1981.
39. QUABBE, H. J.: *Clin. Endocr.*, **16**, 107-119, 1982.
40. SCATCHARD, G.: *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA*, **51**, 660-672, 1949.
41. SCOBIE, I. N., KESSON, C. M., RATCLIFFE, J. G. y MACCUISH, A. C.: *Clin. Endocr.*, **18**, 179-185, 1983.
42. SOMAN, V. R. y DE FRONZO, R. A.: *Diabetes*, **29**, 159-163, 1980.
43. SPANHEIMER, R. G., BAR, R. S., GINSBERG, B. H., PEACOCK, M. L. y MARTINO, I.: *J. Clin. Endocr. Metab.*, **54**, 40-47, 1982.
44. SPARK, R. F., BAKER, R., BIENFAG, D. C. y BERGLAND, R.: *JAMA*, **247**, 311-316, 1982.
45. STIER, CH. T., COWDEN, E. A. y ALLISON, E. M.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **22**, 366-370, 1982.
46. THOMAS, M., VO HUU TRI, RIBEIROF, GUIRRE, PERRAULT: *Ann. Med. Int.*, **128**, 685-690, 1977.
47. WACHSLITCH-RODBARD, H., GROSS, H. A., RODBARD, D., EBERT, M. H. y ROTH, J.: *N. Engl. J. Med.*, **300**, 882-887, 1979.

