FUNCIONAMIENTO DE LA EXENDINA-4 COMO TRATAMIENTO PARA LA DIABETES MELLITUS TIPO 2

Clave del proyecto: CIN2015A10148

Autores:

Águila Rangel David Alejandro

García Torres José Miguel

Sánchez Tejeda Juan Francisco

Tinajero Ayala González Arce Rafael

Asesora:

Vidales Dávila Patricia Guillermina

Tipo de investigación:

Documental

Área:

Ciencias Biológicas, Químicas y de la Salud.

Disciplina:

Ciencias de la Salud

Escuela “Tomás Alva Edison”

Clave 1257

Fecha de entrega:

20 de febrero de 2015

Resumen

La diabetes mellitus es un riesgo a la salud a nivel mundial, por lo que en los últimos años se han realizado investigaciones sobre sus posibles tratamientos. En particular, se ha encontrado una molécula hipoglucemiante proveniente de la saliva del monstruo de Gila. Se postuló que la efectividad de dicha molécula, denominada exendina-4, se debía a su similitud con el glucagón. En este trabajo, se planteó comprobar la efectividad y mecanismo de acción de la exendina por medio de un análisis computacional, en donde se compararía la exendina, el glucagón, y el receptor del glucagón. El programa utilizado en este proyecto fue ArgusLab, y los compuestos analizados fueron descargados desde el banco de datos de la Protein Data Bank. Se realizó un análisis en donde se compararon estructural y funcionalmente la exendina-4 y el glucagón. El estudio demostró y corroboró su parecido, así como también el mecanismo de acción que se planteó en los primeros estudios de la exendina-4.

Abstract

Diabetes mellitus is a risk to health worldwide. This has caused that in recent years, several researches have been conducted regarding possible treatments for this disease. A few years ago, a hypoglycemic molecule from saliva of the Gila monster was found. It was concluded that the effectiveness of the molecule, called exendin -4, was due to its similarity with glucagon. In this project, the objective was to verify the effectiveness and mechanism of action of the exendin by means of a computational analysis, where exendin would be compared with glucagon, and the glucagon receptor. The program used in this project was ArgusLab, and the biochemical structures analyzed were downloaded from the database of the Protein Data Bank. The analysis had the purpose of comparing and contrasting structurally and functionally the exendin -4 against glucagon. The study proved and confirmed their similarity and mechanism of action that was stated in the early studies of exendin -4.

Índice

1. Introducción 3

1.1 Marco Teórico 3
1.2 Problema 9
1.3 Objetivos 9
1.4 Hipótesis 10

2. Metodología 10

3. Resultados y Discusión 11

4. Conclusiones 13

5. Referencias 14

6. Anexo. 15

Introducción

Monstruo de Gila

Este reptil es endémico de México, considerado dentro del grupo de los saurios más venenosos del mundo; se ha descubierto que la saliva de monstruo de gila (*Heloderma horridum)* puede contener una proteína, la cual puede reemplazar a las hormonas intestinales que son activadas en el proceso de digestión. La saliva posee una hormona similar a la hormona fabricadora del péptido-1 (aquel que normaliza la glucosa del cuerpo). Esta hormona similar se llama exendina-4 (la cual podría ser una alternativa para regular los niveles de azúcar en la sangre).

Se conocen muchas teorías acerca del uso y aprovechamiento de esta hormona, todas hablan de métodos que se deben tomar en cuenta para el tratamiento de la diabetes y como resultado dan alternativas para su cura. Dentro del proyecto, se trabajaran tres en específico.

Teorías

La primera teoría habla sobre la efectividad de los fármacos antidiabéticos orales. En ella se explica que los fármacos hipoglucemiantes tienen la finalidad de reducir los niveles de azúcar en la sangre. De acuerdo con Alfar *et al* (2000), existen 4 tipos de fármacos: el primero de ellos son las sulfonilureas. “Su mecanismo de acción primario es estimular la secreción de insulina por la célula beta pancreática, a través de su unión a un canal potasio-dependiente de ATP”, es decir estimula la producción de insulina del páncreas. Tiene algunos efectos secundarios como una cantidad excesiva de insulina en la sangre, y por lo tanto una hipoglucemia.

Otros antidiabéticos que son altamente comercializados son las biguanidas. De acuerdo con los doctores Alfaro, Simal y Botella en 2002, “Las biguanidas actúan fundamentalmente a dos niveles: a) en el músculo, aumentando la entrada de glucosa a las células y en el hígado, b) disminuyendo la producción de glucosa al disminuir la neoglucogénesis, la glucogenólisis o ambas” Un efecto secundario es la pérdida de peso, contrario a lo que hacen las sulfonilureas. Otros efectos pueden involucrar dolor abdominal, náuseas y vómitos.

Los inhibidores de la alfa-glucosidasa disminuyen la absorción de carbohidratos, y por lo tanto no se tienen altos niveles de glucosa cuando se acaba de comer.
Las tiazolidineidionas, similares a las biguanidas, actúan disminuyendo la resistencia que las células imponen a la insulina. Es un método más potente que la de las biguanidas, además de que sus efectos secundarios son relativamente escasos.
Esos son 4 tipos de antidiabéticos que se usan con frecuencia para tratar la diabetes mellitus, tanto tipo 1 como 2.

Otra teoría menciona que la presunta cura de la diabetes es la de las células madre, actualmente ya se sabe que estas células pueden contribuir en la curación del cáncer, por lo que ahora se pretende que puedan ser también una parte importante para poder erradicar la diabetes en una persona.
En la diabetes tipo II, las personas no producen la insulina necesaria y la cantidad de células beta que se encuentran en su organismo oscila entre el 40 y 60% de la cantidad que normalmente se debe producir.

> "Los avances en el trasplante de islotes pancreáticos humanos aislados han sido impresionantes: las personas con diabetes tipo I pueden volver a tener niveles de glucemia normales, sin la necesidad de terapia de insulina. Sin embargo, esta liberación de la dependencia de la insulina tan sólo dura algunos meses o años". (Weir, 2008, pp. 29 - 31).

Se debe recordar que para personas afectadas por esta deficiencia, lo más importante es tener una nueva célula productora de insulina. Las células madre pueden significar una vía o alternativa a este problema, pues ya se sabe que son capaces de producir un número incontable de células a nivel de islote pancreático. De hecho, la revista consultada *Diabetes Voice* (2014*),* nos dice que se han realizado pruebas experimentales en ratones que han producido un aumento en las células beta maduras, lo que puede significar que sí es la cura para la diabetes. Sin embargo, algunos investigadores siguen en desacuerdo de probar esto con los seres humanos, pues todavía no han descartado que esta vía pueda ser también causante del incremento de

células cancerosas o tumores en el organismo. Es importante mencionar que ésto se cree mas probable que pueda suceder en la diabetes tipo I.
La teoría enfatiza la mención sobre la regeneración del páncreas y de las células beta debido a que los experimentos en roedores han arrojado resultados muy positivos, como se mencionó anteriormente. A pesar de esto, en otros experimentos de la misma especie sobre las células acinares pancreáticas, se concluyó que tal vez éstas pudieran regenerar a las células beta del páncreas, pero no de una manera natural.
Esta teoría es muy interesante, pues las células madre parecen ser una muy buena solución para distintos problemas de salud de la actualidad; entre ellos se encuentra la diabetes tipo II. También es muy claro que es difícil comprobar si esta pudiera ser la causa de neoplasias o tumores a nivel del organismo.

La tercer teoría es la más enfocada a la proteína dentro de la saliva del (*Hellodema horridum), d*e acuerdo con la doctora Andrea El-Ouaghlidi, (especialista en el tratamiento de personas diabéticas de todo tipo, del laboratorio *Diabeteszentrum Bad Lauterberg,* en Harz, Alemania*)* existe una forma alternativa de tratar la diabetes mellitus tipo 2. Esta forma es por medio del uso de la saliva del monstruo de Gila reptil que habita la zona norte de México y sur de EEUU.
Según los estudios que se realizaron en los mismos laboratorios, la saliva contiene un compuesto similar a las hormonas intestinales que son activadas al momento de la ingesta de alimento. Estas hormonas producen un péptido denominado: péptido-1 (GLP-1); el cual es responsable de normalizar la cantidad de glucosa en la sangre enviada al torrente sanguíneo desde el intestino delgado así como estimular la activación de las células beta del páncreas. Este producto, en conjunto con la insulina, originada en las células beta, son los encargados de la regulación de los niveles de glucosa en sangre. “El rasgo más prometedor del GLP-1 es el potencial de obtener una normalización plena del control de glucosa en sangre sin que se corra el riesgo de hipoglucemia.” (El- Ouaghlidi, 2004).
El monstruo de Gila posee un compuesto similar a la hormona péptida denominado exendina-4. Después de haber sido estudiada, la exendina-4 demostró tener comportamientos similares al GLP-1 en el cuerpo humano reduciendo casi en su

totalidad la hiperglucemia y se encontró que la estimulación de las células productoras de insulina fue mayor que otros medicamentos dedicados al estímulo de las mismas.

Con esto como antecedente, la doctora El-Ouaghlidi y su colaborador Michael Nauck, proponen que la exendina-4 puede usarse de manera intravenosa para el control de hasta una semana de los niveles de glucosa en sangre del cuerpo. La ventaja de esta sustancia sobre el GLP-1 es que al no ser exactamente el mismo compuesto, la acción de la hormona dipetil peptidasa IV (DPP-4), encargada de la degradación natural del GLP-1, se ve disminuida. Esto quiere decir que los niveles de exendina-4 se mantendrían relativamente estables por lo que una sola dosis sería necesaria para una semana. A la par, la exendina al ser un compuesto natural, se adecua a la necesidad de activación por lo que se estimula solamente la cantidad necesaria de células beta y al mismo tiempo, previene hipoglucemias en los casos de pacientes con bajo tratamiento.

La diabetes no es fácil de tratar, pero tampoco es imposible. Este descubrimiento ya rindió frutos, ya que actualmente existe un medicamento llamado BYETTA que está producido con el agente activo (exendina-4).

Hipoglucemiantes

Algunos de los medicamentos hipoglucemiantes trabajan por medio de la estimulación de células Beta en los islotes de Langerhans. Esto quiere decir que aumenta los niveles de producción natural de insulina siempre y cuando ésta, aún si es fabricada de manera natural. En el caso contrario, se inyecta insulina directamente al cuerpo. Ésta normalmente es fabricada en cultivos de bacterias y después aislada en el laboratorio para utilizarse posteriormente.

La exendina es un péptido similar al GLP-1. Este último es el responsable de la estimulación de las Células Beta del páncreas en el momento de la ingesta de alimentos. Esto quiere decir que la exendina, justo como el GLP- 1 es un estimulante de producción de glucosa.

La ventaja principal que se tiene es la de ser un agente externo al cuerpo. Esto porque no existe una hormona como tal capaz de degradarla más rápidamente; por lo tanto, su tiempo de acción es mayor y tiene un mayor impacto en el número de células blanco.

La desventaja que presenta es que la obtención de este péptido es muy difícil, el cual está regulado por diferentes normas y que aparte de todo resulta tóxico si no es manipulado bajo las medidas de seguridad necesarias. Éstas últimas son rigurosas debido a que el péptido *per se* no es tóxico, pero sí presenta toxicidad al estar junto con los compuestos de la saliva.

Conflictos en la producción.

La exendina-4, como se ha planteado anteriormente, se extrae de la saliva del monstruo de Gila. Sin embargo, en México es un delito el uso de animales con fines de producción. A esto se le conoce como aprovechamiento de la vida silvestre. Además, el monstruo de Gila está protegido por el apéndice 1 del CITES (convención internacional para el tratado de especies de flora y fauna silvestre), ley que estipula que el aprovechamiento de esta especie debe ser meramente en cautiverio: “Reconociendo que la fauna y flora silvestres, en sus numerosas, bellas y variadas formas constituyen un elemento irremplazable de los sistemas naturales de la tierra, tienen que ser protegidas para esta generación y las venideras. “ (CITES, 1973).

Otra regulación legal que evita la producción e investigación de esta proteína es la norma NOM 059 de la SEMARNAT; la cual protege a la especie señalando que se prohíbe su captura para el cautiverio a excepción de zoológicos e investigación. Se debe de tener en cuenta esta situación, puesto que es un factor que posiblemente no tenga buenos resultados en sus usos.

Debido a lo anterior, este trabajo se basará en el funcionamiento y la acción de la proteína (exendina), ya que no se trabajará experimentalmente con ella.

Toxicidad de la Exendina-4

Por lo general la exendina-4 no tiene un nivel alto de toxicidad, la única complicación que hace a la exendina-4 tóxica es la sustancia en la que se encuentra de forma natural. La saliva de monstruo de gila (*Heloderma spectrum*) es una mezcla de sustancias toxicas para los tejidos humanos, estas sustancias incluyen a la exendina-1 o helodermina la cual es una cerina proteasa que inhibe los canales de Calcio a nivel cerebral, afectando también la recepción de rianodina intracelular afectando la

liberación de calcio intracelular de los depósitos en respuesta al voltaje cerebral, asemejándose a la kalicreína.

Otro componente del veneno heloderma es la fosfolipasa A2 la cual cataliza e hidroliza a los fosfolípidos. Las fosfolipasas son las encargadas de dar la toxicidad y letalidad a los venenos. Para los helodermas, las fosfolipasas poseen efectos neurotóxicos y mitotóxicos. Por otro lado en las serpientes, esta fosfolipasa inhibe específicamente al tromboxano inductor de la agregación plaquetaria.

El veneno además contiene hialuronidas las cuales hidrolizan al ácido hialurónico, y se encargan de dispersar el veneno inyectado a través del torrente sanguíneo de la víctima.

Además de la toxicidad de la saliva de dicho reptil, la saliva posee la habilidad de incrementar la secreción de enzimas pancreáticas, así como el péptido intestinal vasoactivo y secretinas. Esta posee una combinación de las Exendinas-1 (helodermina), Exendina-2 (helospectina), y las caracterizadas exendinas-3 y 4, que tienen parentesco con el glucagón, lo que las hace benignas si se separan del resto de los componentes de la saliva. . Sin embargo existe una probabilidad del 41-49% de que los pacientes adquieran anticuerpos anti-exendina-4 como mecanismo de defensa a las sustancias del veneno.

Se conocen muy pocos efectos secundarios, el mayor temor acerca de los posibles eventos adversos esta principalmente en la población que sufre de diabetes tipo 2, pero según la doctora González Albarrán, endocrinóloga del hospital Ramón y Cajal de Madrid, no hay eventos adversos muy radicales que causen riesgo de hipoglucemia, facilitando su posibilidad de administración intravenosa semanal.

Sin embargo se conocen eventos adversos distintos a algunos que causen hipoglucemia, a través de estudios clínicos en fase III controlados con pacientes con diabetes tipo 2, muestran eventos adversos como nauseas, vómitos, diarrea y cefalea, pero ningún evento adverso de mayor gravedad. Como esta es una sustancia encontrada en un veneno de reptil, el cuerpo puede llegar a crear una barrera defensiva de anticuerpos los cuales son anti exendinas, incluyendo las exendinas-1,2,3 y 4 terminando en una inmunidad y falta de reacción ante esta sustancia y los medicamentos derivados de ella.

Problemática

Dentro de todas las enfermedades conocidas por el hombre, pocas son tan famosas como la diabetes mellitus conocida comúnmente como diabetes. Esta enfermedad es ocasionada por un grupo de problemas metabólicos, que consisten en altos niveles de azúcar en la sangre durante periodos de tiempo muy prolongados, fuera de causas hereditarias la diabetes se causa por deficiencia de producción de insulina en el páncreas o la falta de respuesta de células del cuerpo a la insulina producida.
Esta enfermedad tiene en sí tres variedades: la diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y diabetes gestacional. En el presente trabajo se estudiará solo la diabetes de tipo 2, la cual comienza con una resistencia ante la insulina de parte de las células del cuerpo ya que las células no responden bien ante la insulina, el agravamiento da como resultado una alta demanda del cuerpo por insulina. Este tipo en específico se debe al sobrepeso corporal y la falta de actividad física.

> "Hoy en día la diabetes es una de las enfermedades presentes con mayor frecuencia en el mundo. Se calcula que el promedio de casos con diabetes a nivel mundial, rebasa las cifras de 347 millones de afectados. Así como se predice que dicha enfermedad podría ser la séptima causa de mortalidad para el 2030 […] En 2014, más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones eran obesos." (OMS, 2015).

Objetivo

Considerando todas las teorías mencionadas acerca del tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, se analizará mediante un estudio computacional la homología estructural, secuencial y funcional de la exendina-4 con el glucagón, como tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, ya que con ello se podrá:

1. Determinar si existen diferencias en los grupos funcionales del péptido semejante al glucagón.
2. Relacionar la efectividad en los pacientes consumidores.
3. Comparar los resultados

Hipótesis

La exendina-4 con estructura similar a la del glucagón, podrá sustituirlo en sus receptores inhibiendo la acción hormonal que tiene, con ello se considerará como alternativa viable para luchar en contra de la diabetes tipo 2, sin sufrir efectos secundarios perjudiciales a la salud.

Metodología

Se investigó sobre las teorías expuestas para contrarrestar la diabetes tipo 2 en este trabajo. Se investigó acerca de la exendina. ¿Qué es? ¿Quién la produce? ¿Por qué es efectiva? ¿Qué procesos fisiológicos afecta? ¿Qué otros tratamientos son similares? ¿Qué afectaciones tiene al cuerpo humano?
Se descargó en un primer paso la exendina desde el PROTEIN DATA BANK, al igual que el GLP-1. En la página del PROTEIN DATA BANK se comparó superficialmente estos dos compuestos. Se obtuvieron los resultados, los cuales se analizaron en una primera etapa..
En la segunda etapa, se descargó el receptor del glucagón y mediante el uso del programa ArgusLab, se realizó el acoplamiento molecular.

La proteína 3C59 del Protein Data Bank es el receptor del glucagón en donde ésta se une al sitio activo. La exendina incorporada para este trabajo fue la proteína 1JRJ del Protein Data.
El análisis *in silico* se realizó con la interfase ArgusLab 4. El alineamiento secuencial y estructural se realizó mediante los métodos Needleman Wundch y FATCAT rígido del Protein Data Bank (PDB).

El acoplamiento molecular se realizó mediante el programa ArgusLab 4. La validación de la estructura cristalográfica se realizó de la gráfica de Ramachandran del reporte de validación del PDB.

Resultados y discusión

Los resultado obtenidos del primer análisis, se muestran en la imagen 1. Se observa que en la página del PROTEIN DATA BANK se pueden realizar comparaciones superficiales de las proteínas, obteniendo el porcentaje de similitud entre ambos compuestos. Al comparar el receptor del glucagón contra la exendina, se obtiene un 35% de similitud. Por otro lado, si la exendina se compara contra el péptido, se obtiene una similitud del 90%.

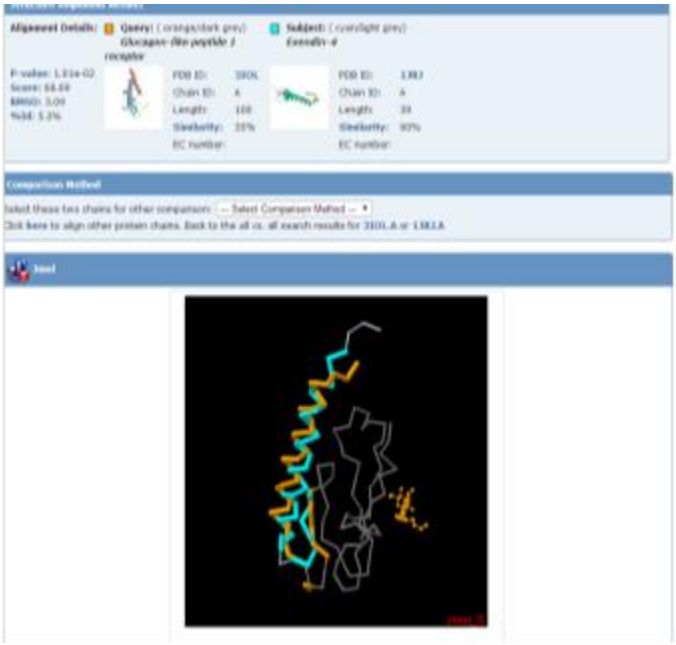


Imagen 1. Análisis preliminar de la página del PDB

.

La diferencia entre estos datos se explica de la siguiente manera: El conjunto receptor-glucagón tiene varias cadenas añadidas. Es decir, no solo es una cadena, sino que tiene otros componentes que la hacen más grande, es decir, el receptor incluído, presentando un área de mayor extensión comparada. Mientras que la exendina comprende una sola cadena y por tanto, menos área que comparar.

La variación en los porcentajes de similitud se debe al análisis del área obtenida, el dato que indica que la exendina se parece en un 90% al conjunto demuestra que la exendina se parece mucho a la parte del péptido que actúa en los receptores de glucagón.

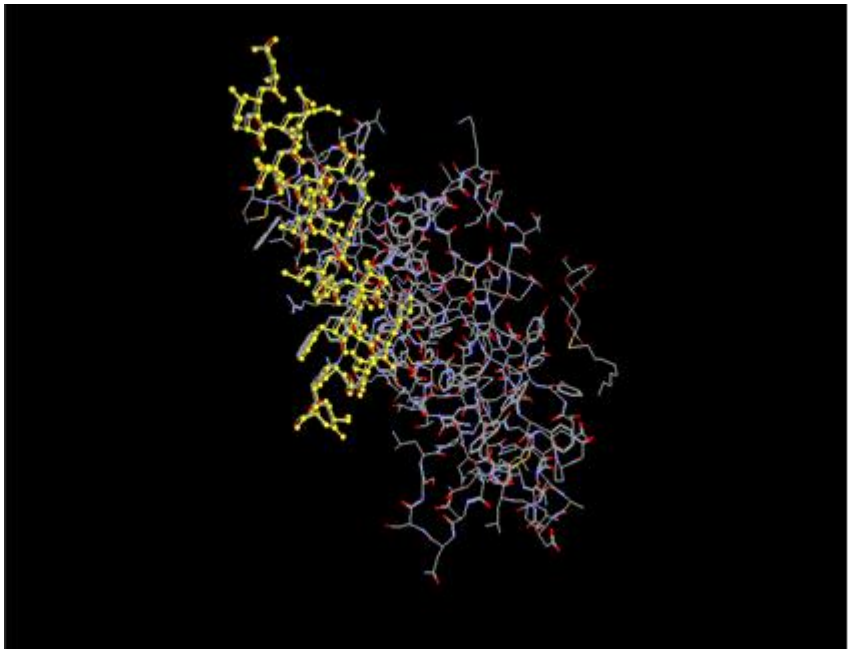


Imagen 2. Exendina (amarillo) unida al receptor del glucagón (gris).

Los resultados obtenidos del acoplamiento, confirman la similitud de la exendina con el glucagón, así como la capacidad de unirse al receptor (Imagen 2). Con respecto al acoplamiento estructural de la exendina con el receptor del glucagón, se anexan varias imágenes en anexos. Se presenta además, el sitio activo del receptor, junto con el acoplamiento de la exendina a este sitio activo, entre otros.

El acoplamiento molecular mostrado en la imagen 2, muestra que la exendina 4 y el glucagón ocupan el mismo lugar en el sitio activo del receptor de glucagón. Es decir, la exendina puede actuar, o bloquear el receptor del glucagón, debido a su parecido estructural.

Estos datos explicarían porqué la exendina 4 tiene actividad antidiabética actuando como modulador negativo al inhibir la glucogénesis hepática, evitando la hiperglucemia;

ya que ocupa el sitio activo del glucógeno y evita que éste active al hepatocito para incorporar glucosa al torrente sanguíneo.

Conclusiones

Se concluye que la cadena 1 de la exendina, formada por 39 aminoácidos, al ser comparada con la del glucagón (también de 39 aminoácidos) por el método Needleman Wundch, comparten un 90% de similitud estructural.

Se concluye en este trabajo que *in silico,* la exendina 4 y el glucagón ocupan el mismo lugar en el sitio activo del receptor del glucagón.

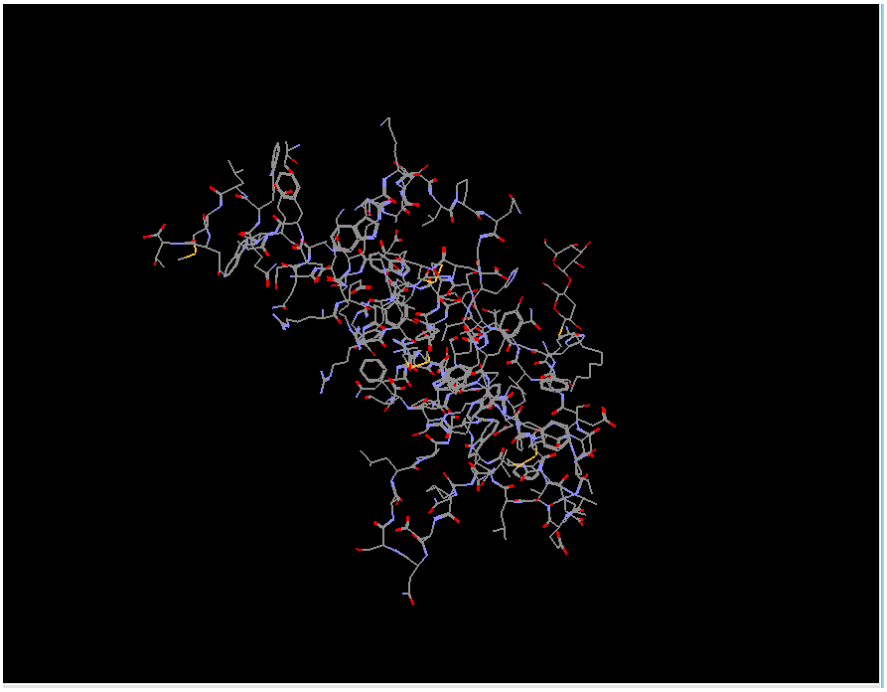
Se comprobó el mecanismo de acción de la exendina y se demostró que la similitud secuencial y funcional con el glucagón, es lo que fundamenta su uso como tratamiento viable en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

A pesar de tener resultados exitosos, se considera que la exendina – 4 es un tratamiento poco viable en México, debido a las regulaciones impuestas hacia el monstruo de Gila, así como también el hecho de que la síntesis de esta molécula es complicada y su producción a gran escala parecería ser insuficiente para tratar a toda la población diabética en el país. Sin embargo, se espera que este reciente descubrimiento permita realizar más investigaciones sobre principios activos naturales viables y aplicables para el mejoramiento de la vida humana.

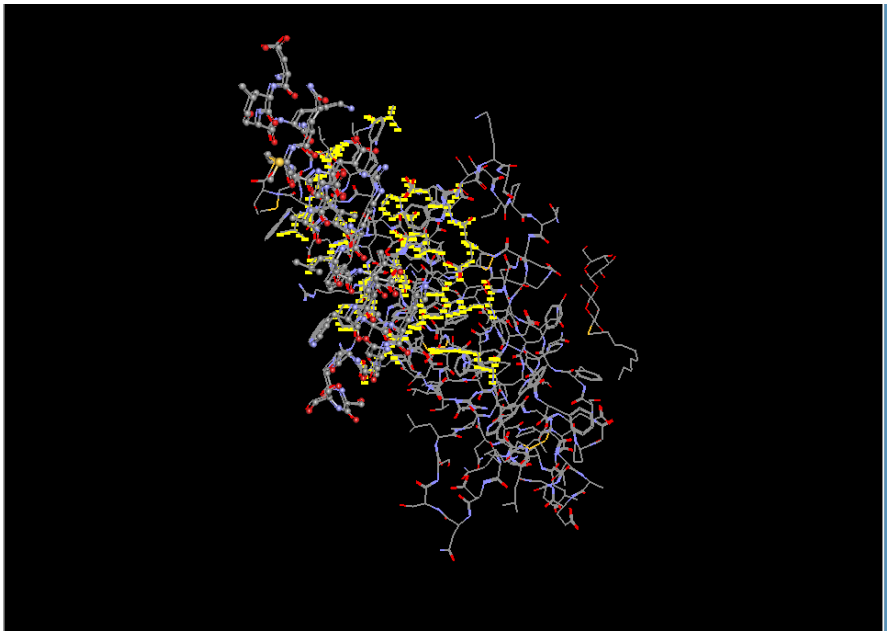
Referencias

- Alfaro, J., Simal, A., Botella, F. (2000) “Tratamiento de la diabetes mellitus.” *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. 24(2): 33-43.
- Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre. [CITES] (2015) *Apéndices I, II y III de la CITES*. Recuperado desde: http://www.cites.org/esp. Consultado el día 14 de febrero de 2015.
- El-Oughlidi, A., Nauck, M., A. (2014, Julio). “Péptido 1 similar al glucagón: nuevas terapias para la diabetes tipo 2”. *Diabetes Voice*, 49**(2)**: 24-26.
- Fernamber. (s.f.) “Lesiones por picaduras y mordeduras de animales”. *Toxicología Clínica*, 481-484pp.
- Frati Munari, A. C. (2006). *La exenatida: Un nuevo antidiabético*. *Retrieved January* 11, 2015, from Medigraphic website: http://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2006/mim065l.pdf
- Frati, A.C., Matínez, E. (2006, Septiembre-Octubre). *La exenatida: un nuevo antidiabético*. Medicina Interna de México, 22 (5), 450-454.
- Organización Mundial de la Salud. [OMS]. (2015) *Datos y cifras sobre la diabetes.* Recuperado el 14 de febrero de 2015 de: http://www.who.int/diabetes/facts/es/.
- Thompson, M. *ArgusLab*. [en línea] Versión 2.0. Obtenido desde: http://www.arguslab.com/arguslab.com/ArgusLab.html. Programa computacional.
- Weir, G. (2008). “Las células madre, ¿la clave de la futura cura de la diabetes?” *Revista Diabetes Voice, 53* **(2):** 29-31.

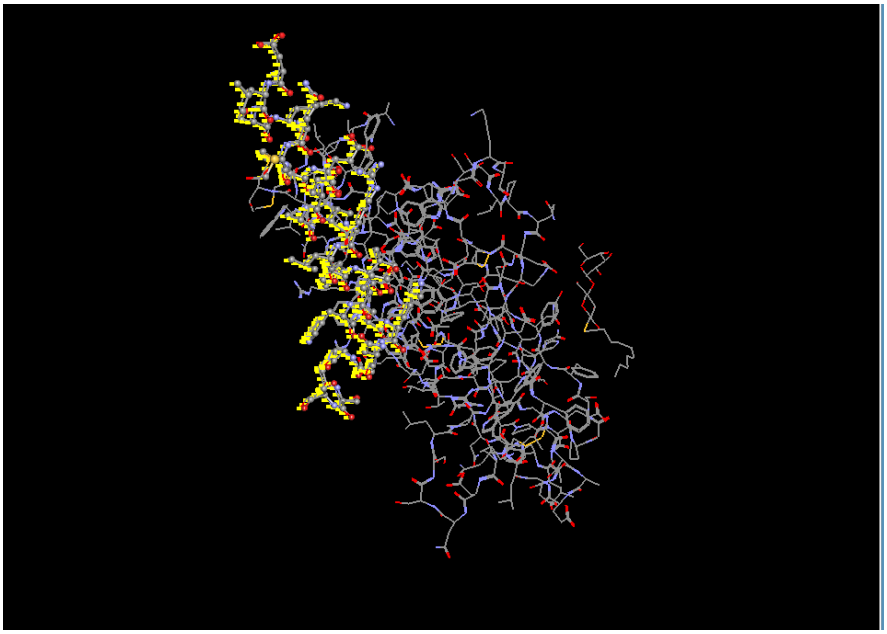
Anexos



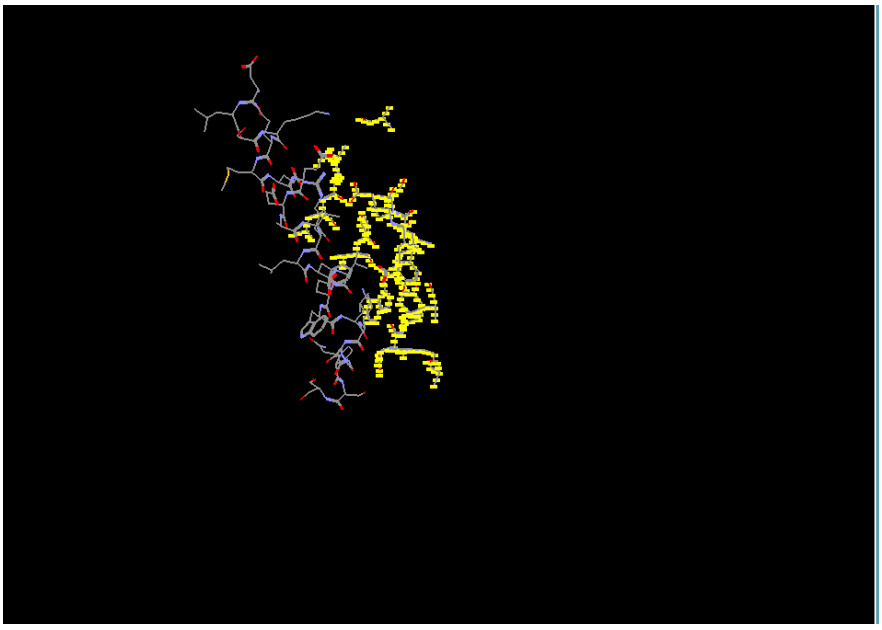
Anexo 1. Estructura química del receptor del glucagón.



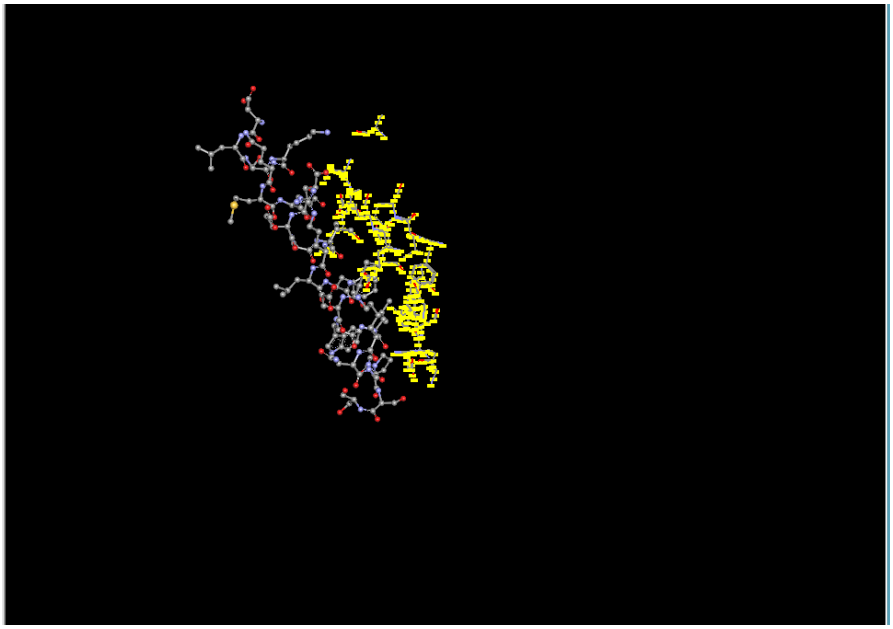
Anexo 2. En amarillo el sitio activo dentro de la molécula del receptor.



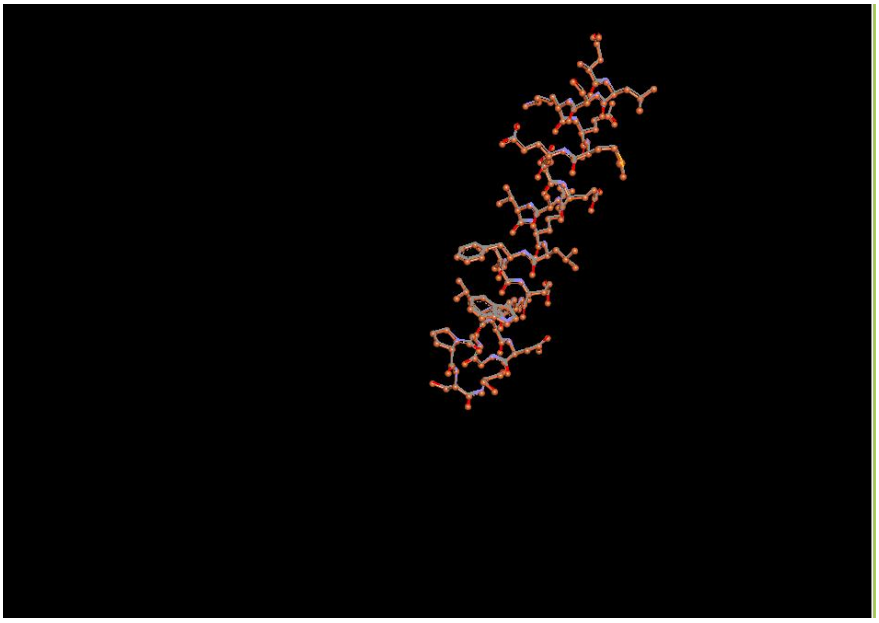
Anexo 3. En amarillo el glucagón actuando sobre su receptor.



Anexo 4. En amarillo únicamente el sitio activo del receptor interactuando con el glucagón.



Anexo 5. Sitio activo del receptor del glucagón en amarillo, interactuando con la exendina.



Anexo 6. La exendina (rojo) sobrepuesta con el glucagón (gris) para comparar su parecido estructural.