

75/B  
Tomo XLII

N.º 1 y 2

1939

**ANALES**  
DE LA  
**ASOCIACIÓN DE QUÍMICA Y FARMACIA**  
DEL  
**URUGUAY**  
(REVISTA)



Dirección y Administración :

**CALLE EJIDO, 1589**

**MONTEVIDEO (Uruguay)**

Imprenta Artística de Dornaleche Hnos.

Calle Cerro Largo, 783

1940

# Reacciones biológicas diferenciales entre la insulina común y las protaminas insulinas, insulina zinc protamina e insulina cristalizada.

POR

VICTOR COPPETTI

QUÍMICO FARMACÉUTICO

Y

Dr. JOSÉ P. SAPRIZA

Grandes esfuerzos han sido realizados en estos últimos tiempos, para retardar la velocidad de absorción de la insulina y hacerla más prolongada para asemejarla a la secreción interna del páncreas. Este último año se ha trabajado intensamente sobre dos insulinas: una, la cristalizada y las otras una mezcla de insulina y protamina buffer, a un pH que la mantiene en suspensión muy fina y bastante estable.

Varias observaciones de autores americanos, parecen probar que la protamina-insulina es de acción retardada y más prolongada que la insulina ordinaria; todas estas experiencias han sido efectuadas en el hombre normal y en el diabético.

Entendiendo que estas comprobaciones son más fáciles en el conejo, animal de experiencia, que se comporta respecto al descenso glicémico, igual que el hombre, sin que se presenten los errores que necesariamente se observan en los enfermos, que tienen que estar regulados anteriormente y sujetos a infinidad de factores que intervienen para que no se comporten de la misma manera en momentos distintos, y aprovechando además, el enorme número de animales que se pueden observar al mismo tiempo en iguales condiciones, nos indujo a experimentar estas distintas insulinas, a fin de comprobar su poder hipoglicemiante y aportar datos más concretos sobre tan discutido tema científico y de gran valor práctico.

Para nuestras experiencias comparativas, nos hemos procurado insulinas de reputadas marcas, cuya titulación la hemos comprobado con el nuevo etalón de la Sociedad de las Naciones, y con el fin de que todos los elementos de ensayo, así como la insulina cristalizada preparada por

nosotros, siguiendo el método que a continuación describimos, tuvieran el mismo valor en unidades internacionales.

El método de preparación de la insulina cristalizada que hemos adoptado, entre otros, es el de A. Scott (*The Biochemical Journal* 1934, página 1592) al fosfato cloruro de zinc, con modificaciones de técnica, especialmente en el punto isoeléctrico óptimo, para una buena y rápida cristalización, que permite operar directamente sobre cantidades de insulina bruta provenientes de 240 kg. de páncreas, obteniéndose un rendimiento aproximado de 1600 unidades internacionales por kg. en la primera cristalización y luego 200 a 250 U. I. que son recuperables de las aguas madres, lo que equivale más o menos a 15.5-16 gramos y 2.00 a 2.50 respectivamente de insulina cristalizada de 24 unidades internacionales por milígramo.

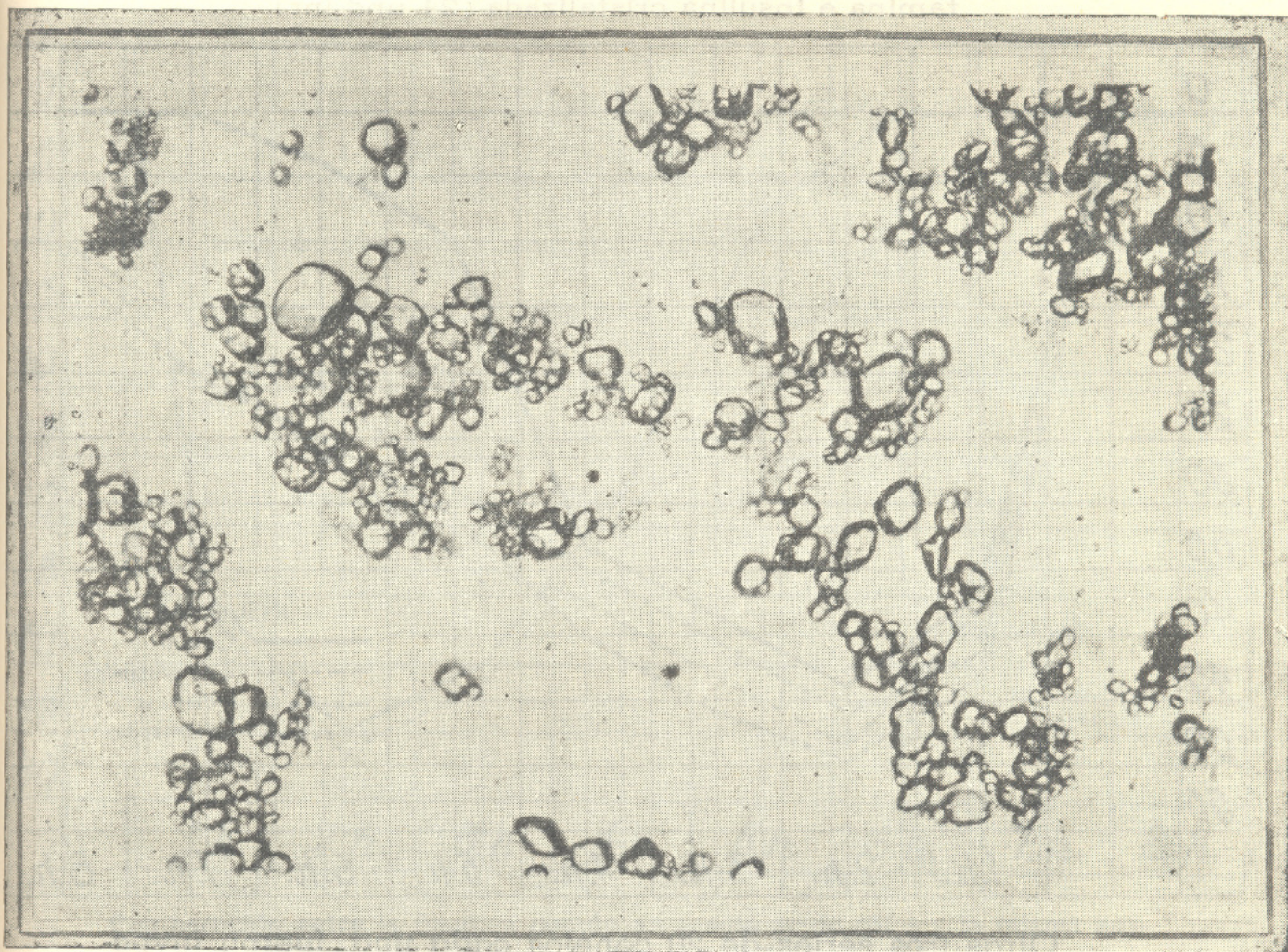
La técnica principal de obtención de la insulina bruta es la corriente, publicada por diversos autores en revistas y obras de la materia, y nosotros comenzamos la cristalización en una de las fases de la purificación a pH 5 y en concentraciones de insulina de 600 a 700 unidades por c.c. de líquido, en presencia de la acetona, en un punto isoeléctrico de 7.1 a 7.2 y con cantidades muy débiles de cloruro de zinc, — gms. 0.10 por ciento de líquido de cristalización, — que corresponden luego a gms. 0.04 por cada gramo de insulina cristalizada (24.000 unidades).

La cristalización es rápida, obteniéndose en las primeras 48 horas la casi totalidad de la insulina y de las aguas madres se recupera el resto, por precipitación a pH 5, disolución en agua clorhídrica del precipitado y nueva cristalización.

Estos cristales son grandes, como puede observarse en la microfotografía adjunta (aumento 300 diámetros), pero cuando se altera el pH, la cristalización se modifica; los cristales son más pequeños, aglomerados, algo deformados, pero no obstante su pureza y valor en unidades es sensiblemente el mismo. La cristalización de la insulina no se produce sin la adición de cloruro de zinc, lo que demuestra como lo ha indicado Scott, que su presencia es indispensable, formando parte de su molécula, lo que se constata y confirma al encontrarse en la insulina cristalizada cantidades de gms. 0.02 % de zinc no separable por los métodos indicados por dicho autor. En cuanto a la pu-

reza de la insulina cristalizada obtenida por este método industrial, hemos observado en 28 series de 240 kg. de páncreas por serie, que sus cristales son siempre semejantes, que se producen con gran regularidad en cuanto al tiempo de cristalización, que corresponden a una titulación

#### CRISTALES DE INSULINA



Aumento 300 diámetros

entre 23 y 24 unidades por miligramo determinada por el etalón internacional, y su punto isoelectrico es de pH 5.

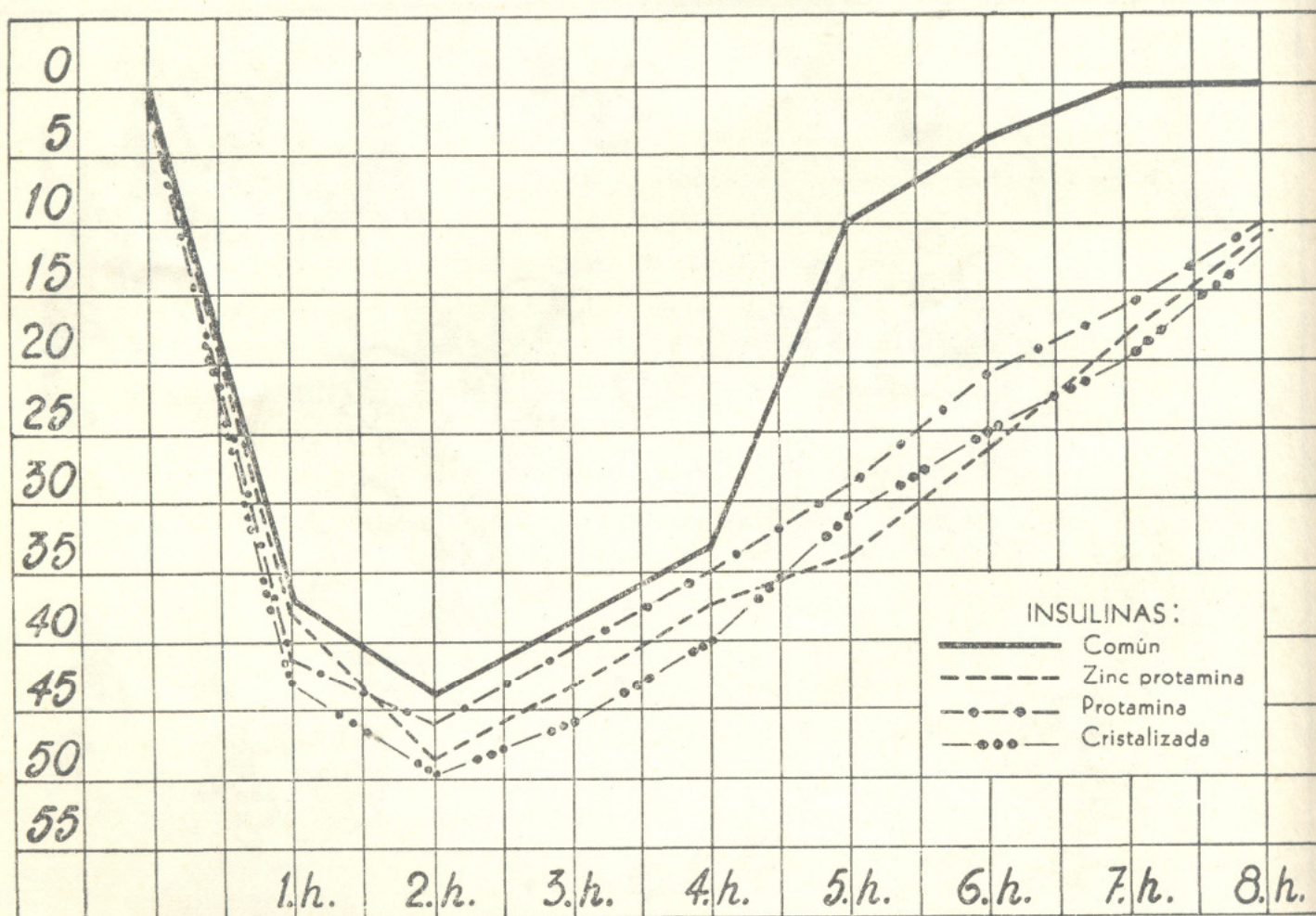
Con esta insulina es que realizamos los ensayos biológicos de comparación que pasamos a detallar.

Hemos tomado series de 20 conejos de nuestro criadero, en ayuno de 24 horas y de peso alrededor de 2 kg. Verificamos las glicemias iniciales por el método de Hagedorn-Jensen y luego les inyectamos a cada uno una uni-

dad de insulina común y cada hora durante ocho horas continuadas, efectuamos las glicemias en las mismas condiciones.

## PLANCHA I

Relaciones biológicas diferenciales  
Entre la Insulina común, Insulina - protamina - Insulina zinc protamina e Insulina cristalizada (24 und int)

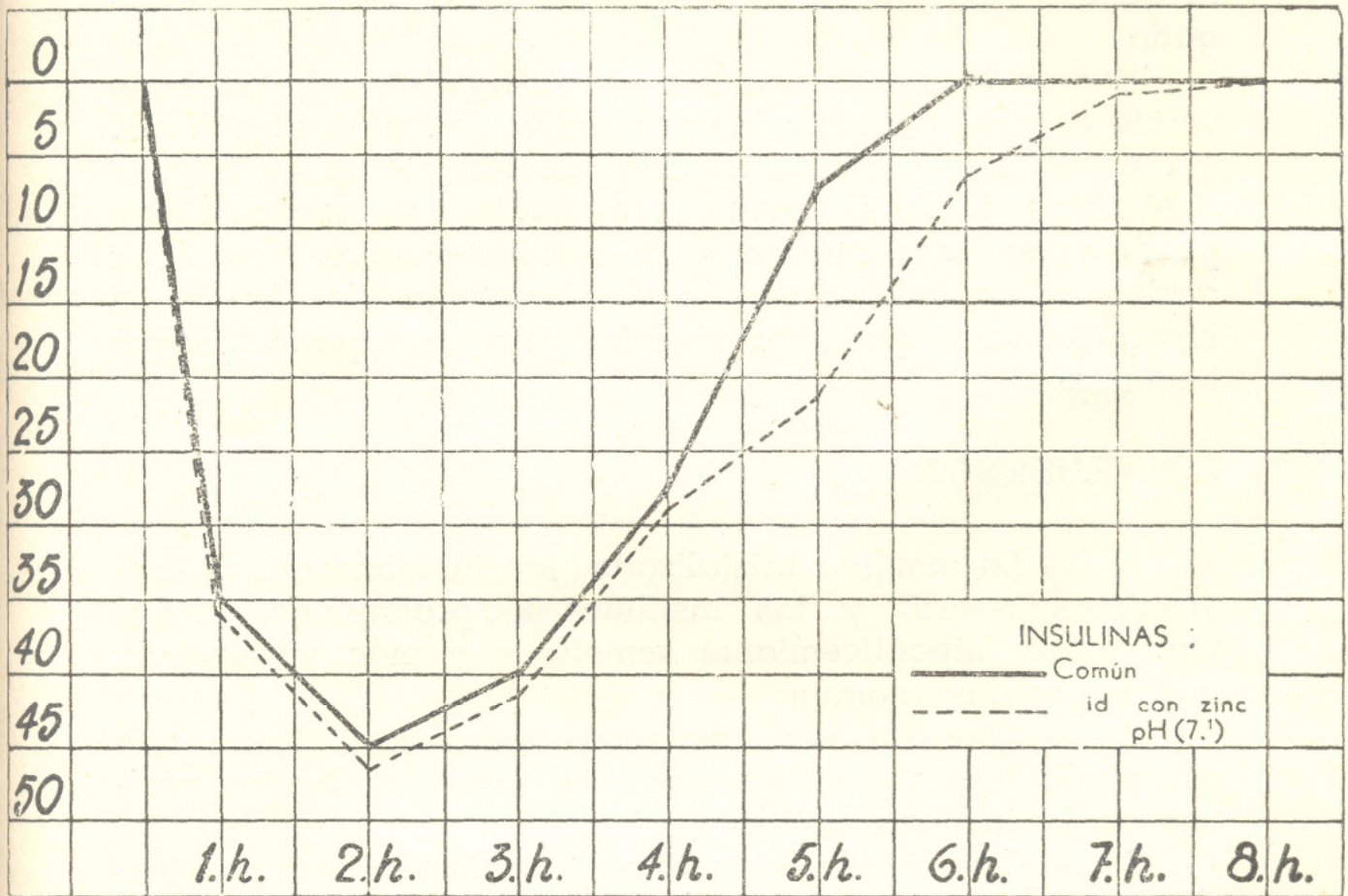


Otras tres series de 20 conejos cada una, fueron inyectados respectivamente en cada serie, con una unidad de insulina-protamina diluída en el bouffer a pH 7.1; otra serie con una unidad de insulina-zinc-protamina y otra con insulina cristalizada disuelta en medio clorhídrico a pH 3. Los mismos conejos fueron rotados a los 15 días y en igualdad de condiciones inyectados con una unidad de las insulinas arriba indicadas y verificadas las glicemias en la misma forma y tiempo que las anteriores.

De los resultados se ha obtenido la media de las dos glicemias correspondientes a los ensayos con la misma insulina de las dos series de 20 conejos cada una y las grá-

ficas expresan, la media del tanto por ciento del descenso glicémico de 40 conejos, siendo en las distintas series la glicemia inicial de gms. 1.35 de promedio. El tanto por ciento lo establecemos entre la diferencia de la glicemia inicial y la glicemia de las distintas horas y dividiendo ésta por la glicemia inicial.

PLANCHA 2



Comparación entre la Insulina común en medio ácido pH 3 y la misma adicionada de Cloruro de zinc mg. 0.008 y un pH. 7.1

Como podrá observarse en el cuadro N° 1, las cuatro insulinas son activas y además, su acción no es retardada como parece desprenderse de algunos trabajos publicados; las cuatro descienden en la primera hora la glicemia, alrededor de 40 a 45 % continuando su acción hipoglicemiante a las dos horas. Por tanto, no estamos de acuerdo en que la protamina, como el zinc, como el pH del medio, como la cristalización de la insulina, impidan la rapidez de absorción. A las tres horas, se empieza a notar la ascensión glicémica y a las cinco horas se acentúa la dife-

rencia entre la insulina común y las otras tres, observándose que a las seis horas, la ascensión de la insulina común en el conejo es casi nula, continuándose sin embargo en las otras insulinas. A las siete horas, es nula en la insulina común, continuándose en las otras insulinas el descenso glicémico alrededor del 20 %. A las ocho horas se observa en algunos conejos reascensión glicémica a pesar del ayuno y en las otras tres insulinas no ha llegado a la glicemia inicial, es decir, que su acción es más prolongada.

Hemos efectuado también el ensayo en una serie de veinte conejos con la insulina común con un buffer a pH 7.1 y con mg. 0.008 de zinc por unidad con el fin de ver si el zinc y el pH del medio, prolongaban su acción. Como puede verse en el cuadro N.º 2, a las seis horas termina la acción de la insulina común y se continúa algo la acción hipoglicemiante por esta mezcla, pero sin aportar mayor beneficio.

### CONCLUSIONES:

1.º — La insulina cristalizada, las insulinas-protaminas (insulinas retard) y las insulinas-zinc-protaminas, tienen una acción hipoglicemiante semejante y más prolongada que la insulina común.

2.º — Que no son insulinas retardadas, desde que obran rápidamente en las primeras horas en límites vecinos de la insulina común.

3.º — Que siendo la insulina cristalizada, una sustancia de alta pureza y sus soluciones a pH 3 perfectamente estables, y demostrando que su acción es tan rápida y prolongada como las diversas insulinas protaminas, reúne sin modificaciones, todas las ventajas que aportan los compuestos de insulina que se destinan al mismo fin terapéutico.

### Bibliografía

- 1—H. C. Hagedorn, Norman Jensen, Kraup y Wodstrup.  
Protamine Insulinate.  
J. A. M. A. - V. 107, pág. 177, año 1936.
- 2—Howard Root, Pricell White, Marble y Stotz  
J. A. M. A. - V. 106, pág. 180, año 1936.

- 3—Scott D. A.  
Crystalline Insuline.  
The Biochemical Journal, V 29, pág. 1048, año 1935.
- 4—Scott D. A. and Fischer A.  
Crystalline Insuline.  
The Biochemical Journal, V. 29, pág. 1048, año 1935.
- 5—Sindoni Antony.  
Protamine Insulin versus ordinary insulin.  
J. A. M. A. V. 108, pág. 1320, año 1937.
- 6—Dres. Bordoni Posse y J. Estable.  
Primeros ensayos clínicos con insulina de acción retardada.  
Trabajo de la clínica médica del Prof. Bordoni Posse, de Montevideo. 1937.
- 7—Altshuler S. S. and Leiser Rudolf.  
Clinical Experience with an improved crystalline insulin.  
J. A. M. A., V. 1907, pág. 1626, año 1936.
- 8—Freud Hugo and Adler Sidney.  
Effect of standard protamine and crystalline insulin, blood sugar levels.  
J. A. M. A., V. 107, pág. 573, año 1936.
- 9—Drisdale M. D.  
Protamine insulin in Juvenile Diabetes.  
J. A. M. A., V. 108, pág. 1250, año 1937.
- 10—Paul Maines and Clarence J. M. Mullen.  
The clinical investigation of an improved crystalline insulin.  
J. A. M. A., V. 107, pág. 959, año 1936.
- 11—Randall G. Sprague et Blum B. B., Negler and Wilder R.  
Clinical observation with insulin protamine compound.  
J. A. M. A., V. 106, pág. 1701, año 1936.
- 12—Allen F.  
Some difficulties arriving in the use of protamine insulinate.  
J. A. M. A., V. 107, pág. 430, año 1935.
- 13—Bulin R.  
L'insuline cristallisée.  
Presse Médicale N.º 28, pág. 529, año 1937.
- 14—Pagniez P.  
L'insulinate de protamine.  
Presse Médicale N.º 65, pág. 1294, año 1935.
- 15—Sable H. E. Boulin R.  
L'Insuline-retard.  
Presse Médicale N.º 6, pág. 97, año 1937.