

## Insulinoterapia

ELOY L. MANDRILE y GRACIELA M. BONGIORNO DE PFIRTER

*Cátedra de Farmacognosia, Departamento de Ciencias Biológicas,  
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata,  
Calles 47 y 115, La Plata 1900, Argentina*

RESUMEN. Se ha efectuado una recopilación de antecedentes históricos y aspectos actuales de la insulinoterapia, señalando la estructura, propiedades, metabolismo, obtención, producción industrial y tipos de insulina, con especial referencia a insulinas humanas semisintéticas y biosintéticas.

SUMMARY. "Insulinotherapy". A review of histological antecedents and present aspects of insulinotherapy has been made, pointing out the structure, properties, metabolism, obtention, industrial production and types of insulin, with special reference to semisynthetic and biosynthetic human insulins.

El día primero de marzo de mil novecientos ochenta y cinco cerró sus puertas la empresa Eli Lilly Argentina S.A., laboratorio que en 1923 iniciara internacionalmente la producción industrial de insulina de origen animal. Este laboratorio llevaba cuarenta y cinco años de actividad en nuestro país, por lo que la conclusión de su accionar fue motivo de intranquilidad pública y de atención periódica, lo cual nos impulsó a efectuar una revisión histórica y del conocimiento actual sobre esta droga.

Al cumplirse el vigesimoquinto aniversario del descubrimiento de la insulina, el 25 de setiembre de 1946 se reunió la mayoría de quienes contribuyeron al moderno tratamiento de la diabetes en el

Centro Médico de la Universidad de Indiana. Provenientes de distintas partes del mundo, concurren una semana antes a la Universidad de Toronto junto a los miembros de la Asociación Americana de Diabetes, solemnemente convocados para conmemorar el trascendental descubrimiento de Banting y Best\*.

Frederick Grant Banting (1891 - 1941) fue un hábil médico cirujano e ilustre hombre de ciencia que recibiera el Premio Nobel de Medicina en 1923; en oportunidad de la reunión antes mencionada, Charles Herbert Best, codescubridor de la insulina, dijo de él: "La lealtad es esa cualidad del carácter que lo une a uno con devoción a una causa digna de valor, bien sea amistad, patriotismo o la

PALABRAS CLAVE: Insulinoterapia; Insulina

KEY WORDS: *Insulinotherapy; Insulin*

\* En la reunión participó nuestro Premio Nobel Bernardo A. Houssay, dando a conocer sus experiencias en la etiología de la diabetes<sup>3</sup>.

búsqueda de la verdad. Curiosidad es esa preocupación vehemente que compele a explorar la oscuridad de lo desconocido en busca de la luz. El afortunado que posee la bendición de esos atributos no busca otra recompensa que la de la infinita satisfacción del logro. La lealtad y la curiosidad son de importancia fundamental para el éxito, bien sea en los negocios o en la investigación científica, y estas cualidades eran parte integrante del carácter de Banting, quien fue leal a sus amigos en sus días más humildes, a los que nunca olvidó ni cuando su fama fue mundial. Banting fue leal a la universidad donde estudió, a la cual cedió los derechos de patente de su descubrimiento para emplearlos en la promoción de la investigación científica<sup>3</sup>. Consideramos que este párrafo ilustra mucho más que una copiosa biografía de este notable hombre de ciencia<sup>1</sup>.

Charles H. Best, eminente fisiólogo y autor de varios textos sobre fisiología, acompañó a Banting iniciando las investigaciones sobre numerosos aspectos del problema, lo mismo que de otros estudios concernientes al descubrimiento

de la histaminasa, del factor dietético colina y del empleo de la heparina para evitar la trombosis.

La primera evidencia experimental de que Banting y Best habían aislado un principio antidiabético potente fue obtenida el 27 de julio de 1921 en la Universidad de Toronto, cuando después de inyectar a un perro pancreatetectomizado, 5 ml de un extracto crudo de páncreas, observaron un claro descenso de su glucemia<sup>2</sup>.

La participación del grupo de Indianápolis en este tipo de investigaciones, tuvo lugar más tarde (1922); es necesario destacar que la Universidad de Toronto formalizó un contrato con el Laboratorio Lilly que coordinara esfuerzos orientados a la producción industrial de insulina, lo que pone de manifiesto la amplitud y visión del desarrollo científico aplicado por la conducción de esa universidad. Así es que a fines de 1922 ya estaba concretada la estrecha colaboración entre los dos grupos.

A continuación expondremos un breve resumen cronológico de las principales investigaciones sobre insulina.

**Trabajos experimentales (1921-1922)**

1921	Paulesco	Publica sus trabajos sobre secreción pancreática <sup>4</sup> .
1921	Banting-Best	Demuestran el efecto hipoglucemiante de extractos pancreáticos
1922	Collip	Técnica de purificación del extracto
1922	Banting-Best	Primera inyección de insulina al diabético Léonard Thompson Insulina amorfa (I.O.)

**Producción industrial de insulina de origen animal (1922-1928)**

1922		Contrato entre la Universidad de Toronto y Eli-Lilly
1923		Ensayos clínicos (British Medical Journal)
1924	Eli-Lilly	Se inicia la dispensación en farmacias
1926	Abel	Cristalización de la insulina animal Insulina cinc (I.Z.)
1928	Root	Comunica la resistencia a la insulina

**Insulinas lentas (1935-1950)**

1935	Hagedorn	Insulina cinc globina (I.G.Z.) Insulina cinc protamina (I.P.Z.)
1941	Ulrich	Asociación de (I.O.) y (I.P.Z.)

1945	Sanger	Establece la secuencia de amino ácidos y estructura
1949	Hagedorn	I. isofano - (igual actividad) N.P.H. (pH Neutro, Protamina, Hagedorn)
1950	Hallas Moller	Posibilidad de mezclas de insulinas (suspensiones de insulinas cíclicas)

**Insulinas humanas de extracción o síntesis total (1960-1970)**

1960	Berson Yalow	Inmunoreactividad de la insulina humana
1961	Katzoyannis	Síntesis de insulina humana
1962		Extracción, aislamiento y cristalización de insulina humana.
1967	Steiner	Proinsulina
1972	Deckert	Poder inmunógeno de insulina humana cristalizada
1974	Ciba-Geigy	Producción de insulina humana sintética total (I.S.H.)
1979	Teuscher	Alergia a la insulina humana

**Insulinas animales altamente purificadas (1970-1977)**

1972	Eli-Lilly	Insulina "single peak" (S.P.)
1973	Hoechst	Insulina CR y CS (Fracciones cromatográficas)
1974	Nordisk	Insulina monocomponente de origen porcino (single component) M.C.
1977	Endopancrina	Insulina Monopic
1977	Novo	Insulina monocomponente de origen porcino y bovino

**Insulinas semi-sintéticas y biosintéticas (1977-1984)**

1977	Novo	Elaboración experimental de insulina humana semi-sintética (I.H. semi-sint.)
1977	Goodman, Rutter	Introducción del gen de insulina de rata en bacterias
1978	Goeddel (Genen tech)	Síntesis bacteriana de I.S.H. por recombinación de A.D.N.
1979	Novo	Anuncia la industrialización y los primeros ensayos clínicos de I.H. semi-sintética
1980	Lilly	Ensayos clínicos iniciales de insulina biosintética
1980		Simpósio sobre insulina biosintética en Wiesbaden
1981	Owens (Novo)	Primeros resultados de I.H. semi-sintética (EASD Amsterdam)
1982		Dispensación de I.H. semi-sintética
1983-84		Dispensación de I.H. bio-sintética

**Estructura**

Es la primera hormona polipeptídica de cuya estructura molecular se tuvo conocimiento (Sanger F., P.N. 1958).

Secretada por las células beta de los islotes de Langerhans como proinsulina, de vida muy corta, se transforma por proteólisis en insulina y un péptido conector C. Esta escisión se debe a la acción de una proteasa vecina a la tripsina y a la carboxipeptidasa B. La proinsulina (Fig. 1) es una molécula formada por una cadena de 63 aminoácidos y de un P.M. aproximado a 9000, que al sufrir

dos cortes a nivel de Arg 31 y Arg 63 libera el péptido C y genera la insulina (P. M. 6000). Esta hormona está formada

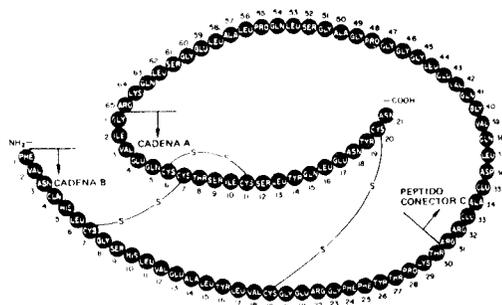


Figura 1. Proinsulina humana.

por dos cadenas polipeptídicas, la cadena A o glicilica, con 21 aminoácidos, y la cadena B o fenilalanílica, con 30 aminoácidos; estas cadenas están unidas entre sí por dos puentes disulfuro cisteína 7 y 20 de la cadena A con 7 y 19 de la B. La cadena A presenta un puente disulfuro entre cisteína 6 y 11<sup>5</sup>.

Debe señalarse que los puentes disulfuro son farmacológicamente esenciales pues su reducción (Acido per fórmico) suprime la actividad. La insulina cristalizada con zinc (Insulina Zinc Cristalina) forma un sistema hexagonal con seis moléculas de la estructura señalada, unidas a dos átomos de zinc combinados con los grupos carboxilos de los aminoácidos terminales.

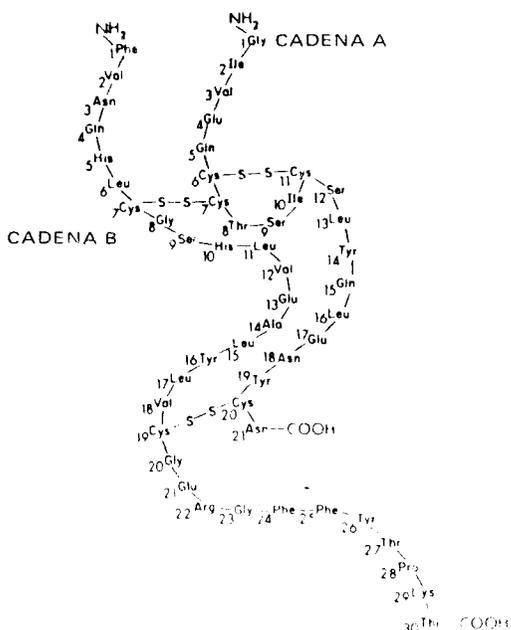


Figura 2. Insulina humana.

La estructura de la insulina (Fig. 2) procedente de distintos mamíferos varía muy poco, consistiendo la diferencia en cambios de los aminoácidos en las posiciones 8, 9 y 10 de la cadena A y la posición 30 de la cadena B, lo que no trae a-

parejado variaciones en su potencia; la obtenida de cerdo, vacuno, caballo, conejo, perro, rata, ovino y hombre tienen la misma actividad farmacológica y el contenido insulínico del páncreas es similar para todas las especies (aproximadamente 4 Unidades Internacionales por gramo)<sup>6</sup>.

### Biosíntesis de la Insulina

En la representación esquemática de la biosíntesis de insulina (Fig. 3) y de su liberación por las células de los islotes de Langerhans, ideada hoy por Steiner D.F.<sup>7</sup> y reproducida por Lehninger A.L. en su texto de Bioquímica, se puede observar en las indicaciones cronológicas que los gránulos maduros no son liberados hasta que el nivel de glucosa en sangre se eleva significativamente por encima del valor normal, como por ejemplo después de una comida, momento en que el contenido de las vesículas secretoras situadas más cerca de la membrana plasmática de las células se vierte al torrente

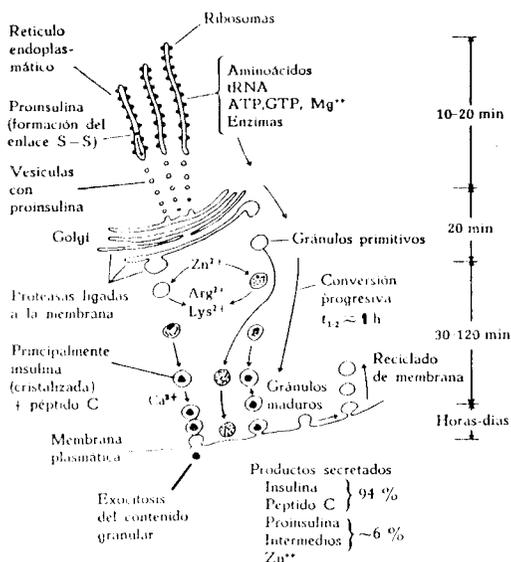


Figura 3. Representación esquemática de la síntesis de insulina por una célula perteneciente a un islote de Langerhans.

circulatorio. Entonces la concentración de glucosa desciende hasta su nivel normal, una hora o dos después de la comida. El promedio de vida de las moléculas de insulina en la sangre es de sólo 3 a 4 minutos, por tanto la liberación de insulina por el páncreas constituye una respuesta muy sensible a las fluctuaciones del nivel de glucosa sanguínea<sup>8</sup>.

### Rol de la insulina en la regulación del metabolismo de la glucosa.

El simple esquema de la Fig. 4 nos permite recordar la acción hipoglucemiante de la insulina en los mamíferos, facilitando la utilización de la glucosa por las vías clásicas<sup>9</sup>.

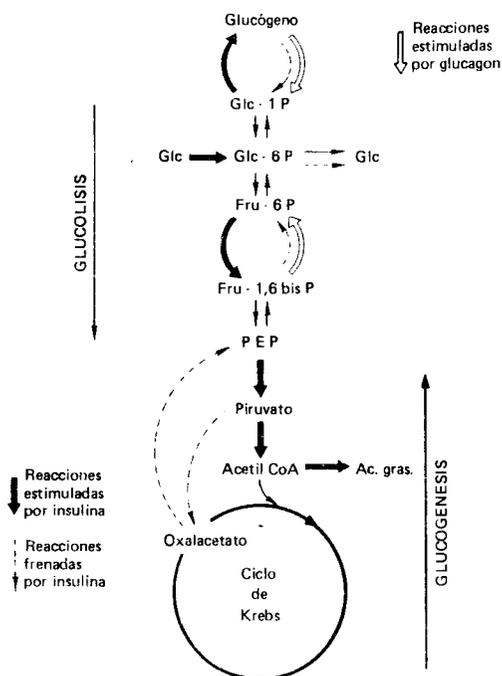


Figura 4. Acción hipoglucemiante de la insulina en mamíferos.

### Insulina Humana semi-sintética

La insulina semi-sintética tiene origen en una modificación de la estructura química de la insulina porcina, por sustitución de un aminoácido con el objeto

de obtener igual secuencia que en la insulina humana.

Se justifica la elección de Insulina porcina porque su estructura primaria difiere de la Insulina humana natural sólo en el aminoácido C terminal de la cadena B (posición B 30) que es alanina en la insulina del cerdo y treonina en la del hombre.

Todas las otras fuentes eventualmente explotables poseen insulinas de estructuras químicas que difieren de la insulina humana en varios aminoácidos.

Se extrae la insulina porcina, seguida por alta purificación mediante técnicas ya aplicadas a la obtención de Monocomponente (MC) 1974, la que es cristalizada y purificada por separación molecular y cromatografía de intercambio iónico. Luego se produce la sustitución, por reacción de conversión enzimática de alanina por treonina en B 30. Una nueva purificación cromatográfica nos lleva a la Insulina Humana semisintética<sup>10</sup>.

### Insulina Humana biosintética

Los avances registrados en el conocimiento de los microorganismos y en las técnicas de manipulación genética encuentran hoy una aplicación rutinaria en la producción de drogas. Las cadenas de reacciones químicas que constituyen el sistema metabólico de un microorganismo representan los medios de producción.

La clase más abundante de fármacos está integrada por aquellos para los cuales toda la información genética requerida, o su fracción más destacada, se encuentra en el genoma (dotación entera de genes) intacto de la célula (producción de antibióticos).

Otra clase es la de aquellos en que la información que codifica el metabolito no procede del ADN del organismo de partida, sino que dicha información se

introduce en la célula.

El gen que determina la estructura de la droga se sintetiza químicamente o se aísla de otro organismo. A continuación se induce su penetración en la célula, una vez situado allí la cadena metabólica, preexistente para la expresión genética, construye la molécula deseada.

Con el desarrollo de estos métodos para la transferencia de genes específicos de una célula a otra, y la inducción de la expresión de los mismos en el nuevo huésped, se logró la biosíntesis de la insulina<sup>11</sup> (Fig. 5).

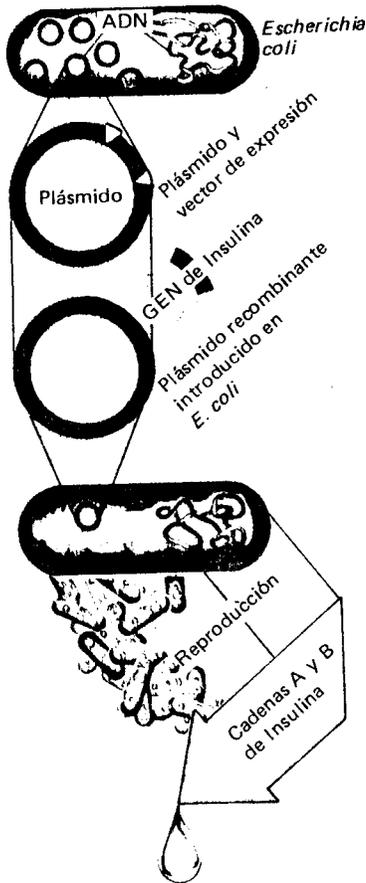


Figura 5. Síntesis biológica de la insulina.

Un esquema de los trabajos del equipo de R. Crea, A. Kraszewski, T. Hirose

y K. Itakura del City of Hope National Medical Center ilustra mejor el proceso; como vimos, la insulina está formada por dos cadenas polipeptídicas de 21 AA (corta A) y de 30 AA (larga B). Este grupo obtuvo los genes que codifican la formación de los dos polipéptidos, utilizando 18 fragmentos de unos pocos nucleótidos, cada uno para el gen de cadena larga y 11 fragmentos para el gen del polipéptido más corto. Para introducir los dos genes sintéticos en el genoma de las bacterias *Escherichia coli*, se recurre a un vector de expresión construido a partir de un plásmido. A tal fin, se combinó el gen sintético con un plásmido y con un segmento del operón lac del genoma de *E. coli* (El operon lac está formado por tres genes unidos físicamente, que intervienen en el metabolismo de la lactosa y por elementos genéticos que controlan su transcripción y traducción)<sup>12</sup>. El gen sintético se insertó cerca del final del gen que codifica la enzima beta-galactosidasa, ésta interviene en el metabolismo de lactosa, y es la región de control que contiene los mecanismos reguladores para la expresión del gen y la traducción del ARN mensajero a las cadenas peptídicas. A continuación se introduce el plásmido recombinante en las células de la bacteria *E. coli*, que sintetizan las dos cadenas polipeptídicas a modo de apéndice caudal unido a la enzima. Los dos polipéptidos se separan de la enzima y se unen para constituir la molécula de insulina.

Se producen unas diez mil moléculas de insulina por célula bacteriana y de unos dos mil litros de caldo para fermentación se pueden separar 100 g de insulina. Para obtener una cantidad equivalente de hormona animal se necesitan más de 700 kg de glándulas pancreáticas<sup>13</sup>.

### *Comparación entre insulinas semi-sintéticas y biosintéticas (Insulinas de secuencia humana de amino ácidos)*

Las propiedades físicas, químicas y biológicas y todos los ensayos de identidad utilizados (cromatográficos, HPLC, difracción con Rayos X, isoelectroenfoque, permeación sobre geles, etc.) no revelan diferencias con la Insulina humana natural: las insulinas humanas sintéticas son "química, física e inmunológicamente equivalentes"<sup>14</sup>.

Esta identidad con la insulina humana natural hace esperar un metabolismo de la droga próximo a ésta y una disminución de su antigenicidad y mayor eficiencia en los raros casos de insulinoresistencia.

En la insulina semisintética, sin embargo, no se reduce la antigenicidad; recordemos que es de origen porcino y se sustituye alanina por treonina en B 30, para lograr igual secuencia de AA que la humana.

La insulina biosintética (Insulina Humana) pone a cubierto al paciente insulino dependiente del eventual agotamiento de la fuente de obtención de la insulina de origen animal; este argumento es avalado por las estadísticas de 1970 que mostraban que son necesarios 280 millones de porcinos para asegurar el tratamiento de 5.800.000 diabéticos insulino dependientes y 147 millones de bovinos para satisfacer la necesidad de los 10 millones de diabéticos restantes<sup>15</sup>.

La actividad biológica de ambas es equivalente, pero los criterios de purificación varían, lo que redundará en algunos casos descriptos de alergia local o sistémica.

### *Fines de la insulino terapia*

A corto plazo el paciente deber permanecer asintomático, sin ninguna sensación indefinida de malestar, sed, poliuria,

y fatiga que van asociados con niveles de glucemia normales.

A largo plazo, el objetivo es evitar las complicaciones posteriores: a) nefropatía, neuropatía y retinopatía y b) macroangiopatía (enfermedad de los grandes vasos).

La evidencia sugiere que un buen control de la glucemia disminuye considerablemente el riesgo de desarrollar microangiopatía (enfermedad de los vasos pequeños) y neuropatía. También pueden influir otros factores, como los antecedentes genéticos. El efecto sobre la macroangiopatía es menos favorable hasta el momento.

La diabetes en sus dos formas –insulino dependiente y no insulino dependiente– es originada por una secreción y/o acción disminuida de la insulina. Una secreción fisiológica y acción normal de insulina consiste en una descarga de insulina con cada comida (Fig. 4) y un nivel de secreción bajo que permanece constante en los períodos entre comidas con niveles mayores en los sujetos insulino resistentes.

La administración de insulina subcutánea no puede reproducir el gradiente periférico-portal que existe en los no diabéticos, en los que la insulina se segrega en la vena porta y una cantidad variable se elimina por el hígado; sin embargo el objetivo por ahora es producir un nivel periférico de insulina normal.

Como vimos, durante los últimos 60 años se ha dispensado un conjunto de preparados de insulina con diferente duración de acción, procedentes de distintas especies de mamíferos y de variables grados de pureza; el profesional cuenta hoy con la insulina humana para un mejor tratamiento del paciente diabético, y en un futuro próximo dispondremos también de la proinsulina obtenida por recombinación bacteriana.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Best, Ch. H. (1947) *Boletín Médico Científico*. 5: 16-8
2. Banting, F.G., Ch. H. Best, J.B. Collip, W.R. Campbell y A.A. Fletcher (1922) *Can. Med. Assoc. J.* 12: 141-6
3. Houssay, B.A. (1936) *Carbohydrate metabolism* 214: 971-82
4. Paulesco, N.C. (1921) *C.R. Soc. Biol. (Paris)* 85: 555-7
5. Sanger, F. (1960) *Br. Med. Bull.* 16: 183-8
6. Katzoyannis, P.G. (1966) *Science* 154: 1509-14
7. Steiner, D.F. (1974) *Fed. Proc.* 33: 2107-12
8. Orci, L., D. Baetens, M. Ravazzola, Y. Stefan y F. Malaisse-Lagae (1976) *Life Sci.* 19: 1811-6
9. Mc Intyre, N., C.D. Holdsworth y D.S. Turner (1964) *Lancet* 2: 20-1
10. Ruttenberg, M.A. (1972) *Science* 177: 623-6
11. Skyler, J.S. y S. Raptis (1981) *Diabetes Care* 4: 139-264
12. Goeddel, D.V., D.G. Kleid y F. Rolivar (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 106-10
13. Keen, H., J.C. Pickup y B.W. Bilous (1980) *Lancet* 11: 398-401
14. Chance, R.E., E.P. Kroeff, J.A. Hoffman y B.H. Franck (1981) *Diabetes Care* 4: 147-54
15. Owens, D.R., M.K. Jones y T.M. Hayes (1981) *Br. Med. J.* 282: 1264-6